

DANILO MONTEIRO DE PAULA

**ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE *GJB2* EM INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA
AUDITIVA NEUROSENSORIAL NÃO SINDRÔMICA**

**BELÉM
2012**

DANILO MONTEIRO DE PAULA

**ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE *GJB2* EM INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA
AUDITIVA NEUROSENSORIAL NÃO SINDRÔMICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

**BELÉM
2012**

DANILO MONTEIRO DE PAULA

**ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE *GJB2* EM INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA
AUDITIVA NEUROSENSORIAL NÃO SINDRÔMICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Banca Examinadora:

Orientador Prof. Dr. Manoel da Silva Filho

Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos

Prof^a. Dr^a. Greice Lemos Cardoso

Apresentado em ____ / ____ / ____

BELÉM
2012

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)

Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

Paula, Danilo Monteiro de

Análise de mutações no gene GJB2 em indivíduos com deficiência auditiva neurossensorial não sindrômica / Danilo Monteiro de Paula – 2012.

Orientador: Manoel da Silva Filho

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2012.

1. Surdez – Aspectos genéticos. 2. Distúrbios da audição – Aspectos genéticos. 3. Mutação (Biologia) – Aspectos genéticos. I. Título.

CDD 22. ed. 617.8

DEDICATÓRIA

*À minha tão amada genitora,
Áurea Monteiro de Paula*

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus e a toda espiritualidade que iluminaram o meu caminho durante esta caminhada. À minha mãe, Áurea Monteiro de Paula, que de forma especial e carinhosa deu-me força e coragem, apoiando-me nos momentos de dificuldades. Quero agradecer também, ao meu glorioso Santo Antonio de Pádua, por guiar todos os meus passos.

Aos meus queridos avós, Ana de Paula e Francisco de Paula, que embora não tenham tomado conhecimento deste trabalho, iluminaram de maneira especial os meus pensamentos, levando-me a buscar mais conhecimento.

À minha querida e adorada irmã, Jéssica de Paula.

À família Vilar, em especial a minha amada esposa Leticia de Paula, pelo seu companheirismo e muita paciência. Te amo!

Agradeço de forma muito grata e grandiosa a toda família do Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA e a seus coordenadores: Prof. Dr. Sidney Santos, Prof. Dr. João F. Guerreiro, Profa. Dra. Ândrea Santos e Prof. Dr. Ney Santos.

Agradeço também, Às Dras. Luciana Serrão de Castro, Greice Cardoso e Elzemar Rodrigues, minhas grandes amigas. Um muito obrigado pela dedicação e ajuda nestes meses de trabalho.

Ao meu grande companheiro de todas as horas Kleber U. Xavier.

Com muito carinho as minhas famílias Calixto e a família Monteiro de Paula.

Ao Prof. Dr. Manoel da Silva Filho, orientador, professor, amigo, um muito obrigado pela dedicação e ajuda por esses anos de companheirismo.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, por toda a infraestrutura disponível.

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (**FAPESPA**), pelo auxílio financeiro, bolsa de mestrado.

E finalmente, agradeço a todos os meus amigos que me ajudaram direto ou indiretamente para o desenvolvimento deste projeto. Um **MUITO OBRIGADO** a todos vocês.

*“De que adianta o conhecimento mais profundo se
tivermos os corações mais superficiais?”*

(LEONARD RAVENHILL)

RESUMO

A surdez é o defeito sensorial mais frequente nos seres humanos, podendo ter diferentes causas ambientais ou hereditárias. Em países desenvolvidos, estimativas sugerem que em cada 1000 nascidos dois manifestam algum tipo de surdez e mais de 60% desses casos são de origem genética. No Brasil, muito pouco ainda é conhecido sobre surdez hereditária, acredita-se que quatro em cada mil recém-nascidos manifestem algum tipo de deficiência auditiva e que a frequência da surdez causada por fatores genéticos seja da ordem de 16%, enquanto os 84% restantes dos casos sejam causado por fatores ambientais e de etiologia desconhecida. As várias formas de surdez hereditária já identificada são muito raras, com exceção de uma causada por mutações no gene *GJB2* que codifica a conexina 26. As conexinas representam uma classe de família de proteínas responsáveis pela formação de canais de comunicação entre células adjacentes (*Gap Junctions*), esta comunicação entre células adjacentes é fundamental para o crescimento e para a diferenciação de tecidos. Até o presente foram descritas 102 mutações do *GJB2* que estão associadas com surdez hereditária. Três mutações se destacam por apresentarem frequência elevada em grupos populacionais específicos: 35delG entre europeus e brasileiros; 167delT entre Judeus askenazitas; e 235delG entre asiáticos. Neste trabalho, foi realizada a análise molecular de toda a sequência codificadora do gene *GJB2* (Conexina 26) em uma amostra populacional constituída de 30 indivíduos não aparentados com surdez esporádica pré-lingual não sindrômica provenientes da população de Belém do Pará. O DNA foi obtido através de amostras de sangue periférico e analisado por meio da técnica convencional de PCR seguida do sequenciamento automático. Mutações no gene da Conexina 26 foram observadas em 20% da amostra (6/30). As mutações 35delG e R143W foram observadas em um único paciente (1/30), as duas no estado heterozigoto e relacionadas com a surdez do paciente. Duas outras mutações foram observadas em diferentes indivíduos: G160S em 1 paciente correspondendo a 3,3% (1/30); e V27I foi observado em 4 indivíduos com frequência alélica de 0.08; contudo as mutações G160S e V27I não estão relacionadas com a surdez. Neste trabalho as frequências observadas de mutações são equivalentes a frequências observadas em outras populações anteriormente estudadas. Esses resultados indicam que mutações no gene *GJB2* são importantes causas de surdez em nossa região e não se pode excluir que a possibilidade da surdez apresentada por alguns indivíduos possa ser decorrente, principalmente, por fatores ambientais como processos infecciosos ocorridos durante a gestação, ou nos primeiros meses de vida.

Palavra Chave: Surdez. Gene *GJB2*. Mutações. Conexinas.

ABSTRACT

Deafness is the most frequent sensorial defect in human beings and it may have different causes since environmental to hereditary. In developed countries the estimates suggest that in each 1000 births some kind of deafness is expressed and more than 60% of the cases have a genetic origin. In Brazil, the hereditary deafness is not well-known. It is believed that four in each thousand newborns express some kind of hearing defect and that the frequency of deafness caused by genetic factors is estimated in 16%, while the 84% remaining cases are caused by environmental factors and have an unknown etiology. The many forms of hereditary deafness already identified are very rare, except for the one which is caused by mutations in the GJB2 gene which codifies the connexin 26. The connexins represent a class of a protein family which is responsible for the formation of communications channels between adjacent cells (Gap Junctions), this communication is fundamental for the growth and differentiation of the tissues. Until now there have been described 102 mutations of GJB2 gene which are associated to the hereditary deafness. Three mutations stand out because they have high frequency in specific population groups: 35delG among Europeans and Brazilians, 167delT among Ashkenazi Jews, and 235delG among Asians. In this study, we performed a molecular analysis of the entire coding sequence of the GJB2 gene (Connexin 26) in a population sample consisted of 30 unrelated individuals with prelingual nonsyndromic sporadic deafness from the population of Belém do Pará. DNA was obtained by peripheral blood samples and analyzed by the conventional PCR followed by automatic sequencing. Mutations in the Connexin 26 gene were found in 20% of the sample (6/30). The mutations 35delG and R143W were observed in one patient (1/30), both in the heterozygous and related to the patient's deafness. Two additional mutations were observed in different individuals: G160S in a patient corresponding to 3.3% (1/30), and V27I was observed in 4 patients with allele frequency of 0.08; however mutations G160S and V27I are not related deafness. In this work the observed frequencies of mutations are equivalent to the frequencies observed in other populations previously studied. These results indicate that mutations in the GJB2 gene are important causes of deafness in our region and it cannot be excluded that the possibility of deafness presented by some individuals may be caused, mainly, by environmental factors such as infectious processes occurring during pregnancy or the first months of life.

Keywords: Deafness. *GJB2*. Mutations. Connexin.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da orelha do humano	14
Figura 2: Estrutura da orelha interna do ser humano	16
Figura 3: Vias auditivas desde a cóclea até o córtex auditivo, com suas vias aferentes	18
Figura 4: Estrutura Da Junção Comunicante (Gap Junctions)	28
Figura 5: Estrutura do Conexon	29
Figura 6: Estrutura da Conexina	30
Figura 7: Localização do gene GJB2 no cromossomo 13	33
Figura 8: Eletroferograma da mutação 35delG no estado heterozigoto.	47
Figura 9 - Eletroferograma de um indivíduo sem a mutação 35delG.	47
Figura 10 - Eletroferograma da mutação R143W no estado heterozigoto	48
Figura 11 – Eletroferograma de um indivíduo sem a mutação R143W	48
Figura 12 – Eletroferograma de um indivíduo com a mutação G160S.	49
Figura 13 – Eletroferograma de um indivíduo sem a mutação G160S.	49
Figura 14 – Eletroferograma de um indivíduo com a mutação V27I no estado heterozigoto	50
Figura 15 – Eletroferograma de um indivíduo com a mutação V27I no estado homozigótico	50
Figura 16 – Eletroferograma de um indivíduo sem a mutação V27I.	50

LISTAS DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Genes Autossômicos Recessivos envolvidos com formas não- síndrômicas da surdez	26
Quadro 2: Genes Autossômicos dominantes envolvidos com formas não- síndrômicas da surdez	27
Quadro 3: Mutações descritas no gene GJB2 relacionadas com surdez não- síndrômica.	34
Quadro 4: Principais mutações descritas no gene GJB2 relacionadas com surdez não- síndrômica e associadas com o padrão de herança autossômica recessiva	35
Quadro 5: Sequencia de Indicadores Utilizados para a Amplificação e Sequenciamento do gene GJB2	45
Tabela 1: Mutações encontradas no gene <i>GJB2</i> e relacionadas com a deficiência auditiva neurossensorial não- síndrômica de origem genética	46
Tabela 2- Distribuição de frequências genotípicas para as mutações 35delG, V27I, G160S e R143W encontradas no gene GJB2, em 30 indivíduos com surdez do estado do Pará.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

dB	Decibel , unidade física de intensidade de sinal.
DFNB	Perda auditiva não sindrômica de transmissão autossômica recessiva
DFNA	Perda auditiva não sindrômica de transmissão autossômica dominante
DFN	Perda auditiva não sindrômica de transmissão ligada ao cromossomo X
DEL	Deleção
IPRF	índice percentual de reconhecimento de fala
LDF	limiar de detecção de fala
LRF	limiar de reconhecimento de fala
PC	Personal communication
PEAT	Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico
KDa	KiloDalton
mV	milivolt, 10^{-3} volts
GJB2	gap junction beta-2 protein
mL	mililitro, 10^{-3} litros
μ L	Microlitro
rpm	Rotações por minute
nm	nanometro
ng	nanograma
NaCL	Cloreto de Sódio
KCI	Cloreto de Potássio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato disódico
PH	Potencial de Hidrogênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
M	Molar
PCR	Reação em cadeia pela Polimerase
GJB3	Gap junction beta-3 protein
GJA1	Gap junction protein, alpha 1

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	13
1.2	ANATOMOFISIOLOGIA DO SISTEMA AUDITIVO PERIFÉRICO	13
1.3	ANATOMOFISIOLOGIA DO SISTEMA AUDITIVO CENTRAL	17
1.4	EXAMES QUE DETECTAM A DEFICIÊNCIA AUDITIVA	19
1.5	ASPECTOS GERAIS DA DEFICIÊNCIA AUDITIVA	19
1.6	EPIDEMIOLOGIA	23
1.7	DEFICIÊNCIA AUDITIVA DE ETIOLOGIA GENÉTICA	24
1.8	JUNÇÕES COMUNICANTES E CONEXINAS	28
1.9	A CÓCLEA E OS MECANISMOS <i>GAP JUNCTION</i>	30
1.9.1	O LOCUS DFNB1 E O GENE GJB2	32
1.9.2	A MUTAÇÃO 35DELG (OU 30DELG)	38
1.9.3	AS MUTAÇÕES 167DELT E 253DELC	39
2.	OBJETIVOS	41
2.1	Objetivo Geral	41
2.2	Objetivos Específicos	41
3.	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Amostra Estudada	42
3.2	Avaliação Clínica	42
3.3	Extração de DNA.	43
3.4	Reação em cadeia pela Polimerase	44
3.4.1	Amplificação do gene <i>GJB2</i>	44
3.5	Sequenciamento do DNA	44

4.	RESULTADOS	46
5.	DISCUSSÃO	52
6.	CONCLUSÃO	55
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
	ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS:

A audição do latim *auditione* é a capacidade de captar e traduzir informações para o cérebro dos sons emitidos pelo ambiente. O som é produzido por vibrações mecânicas que podem ocorrer em meios diferentes como: líquido, sólido ou gasoso. Essas vibrações se propagam por meio de ondas. Quando um corpo vibra, as ondas sonoras correspondem às ondas de variações de pressão, ou seja, de compressão, o que significa o aumento de pressão quando as moléculas colidem uma com as outras; e/ou rarefação, que é a diminuição de pressão quando as moléculas se afastam. As diversas variações na frequência das ondas permitem que sons com diferentes tonalidades sejam detectados pela orelha humana. A frequência das ondas sonoras define um som como: grave, médio ou agudo. A frequência é expressa em ciclos por segundo ou Hertz (Hz) sendo inversamente proporcional ao comprimento de onda. A amplitude das ondas sonoras corresponde à intensidade do som, sendo fraco ou forte, expressa em decibéis (dB) (MOMENSONHN-SANTOS *et al*, 2005).

A orelha do ser humano é o órgão responsável por captar as ondas sonoras dando início ao processo de percepção e interpretação do som do ambiente. Sabe-se que a orelha humana não consegue captar sons com frequências abaixo de 20 Hz, denominados de infra-sons, ou frequências muito altas, acima de 20 KHz os ultra-sons. No entanto, as frequências audíveis pela orelha humana estão na faixa de 20 Hz e 20.000 Hz embora, devamos levar em considerações as variações de cada indivíduo (RUSSO, 2005).

Ouvir e decodificar um estímulo acústico é uma habilidade que depende tanto da capacidade biológica do indivíduo, quanto das experiências que o seu ambiente lhe proporciona. A capacidade biológica refere-se à integridade dos sistemas auditivos envolvidos no processo de captação até a análise e a interpretação dos estímulos acústicos, envolvendo os sistemas auditivos periféricos e central.

1.2 ANATOMOFISIOLOGIA DO SISTEMA AUDITIVO PERIFÉRICO.

O sistema auditivo periférico dos seres humanos tem as funções de recepção, detecção, condução e transdução do sinal acústico em impulsos neuroelétricos. É subdividido em três partes, a conhecer: orelha externa, localizada na porção petrosa do osso temporal, constituída

pelo pavilhão auricular e o meato acústico externo, que auxiliam na coleta das ondas sonoras e em sua condução até a membrana timpânica, amplifica o som, auxilia na localização da fonte sonora e protege a orelha média e interna; a orelha média, que é constituída pelo antro mastoídeo, cavidade timpânica preenchida por ar, comunica-se com a nasofaringe através da tuba auditiva (figura 1), possui em seu interior um sistema de pequenos ossículos (martelo, bigorna e estribo) que são responsáveis por transmitir as vibrações timpânicas até a orelha interna; e orelha interna, também localizada na parte petrosa do osso temporal, é responsável pelos órgãos da audição (cóclea) e do equilíbrio (canais semicirculares), dividi-se sistematicamente em 03 (três) partes: o labirinto endolinfático ou membranoso, o labirinto perinlinfático ou ósseo e a cápsula ótica (RUSSO, 2005). A orelha humana é um órgão altamente sensível e complexo que nos capacita a perceber, identificar e interpretar ondas em uma gama ampla de frequência (16 a 20.000 Hz). A captação do som até a sua percepção e interpretação é uma grande transformação de energia, a qual inicia pela sonora, transformando-se em mecânica, em seguida em hidráulica e finalizando com a energia elétrica dos impulsos nervosos que chegam até o cortex cerebelar.

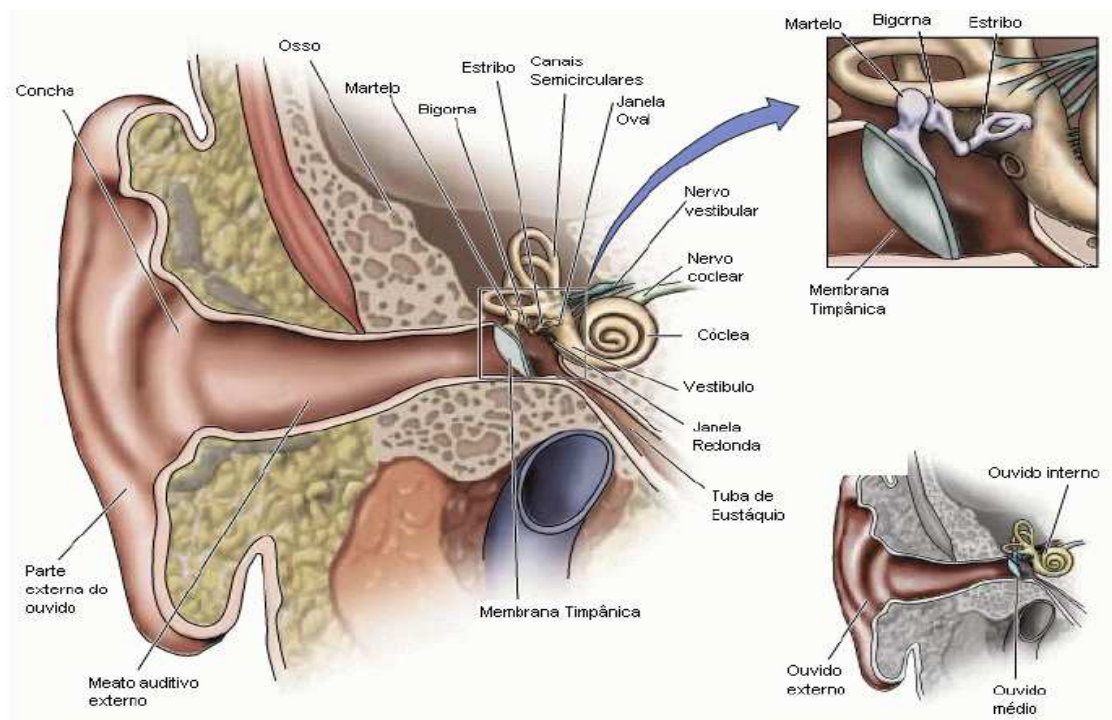


Figura 1 - Estrutura da orelha do humano.

Fonte: Purves *et al.*, 2001, cap.13.

O processo inicia-se pela orelha externa, o pavilhão auricular ajuda a captar e canalizar as ondas sonoras para o canal auditivo e para o tímpano, o canal auditivo serve como proteção e como amplificador de pressão. Quando se choca com a membrana timpânica, a pressão e a descompressão alternadas do ar adjacente à membrana provocam o deslocamento do tímpano para trás e para frente, fazendo com que o tímpano vibre com a mesma frequência da onda sonora. Dessa forma, o tímpano transforma as ondas sonoras em vibrações mecânicas que são comunicadas ao sistema de ossículos (martelo, bigorna e estribo). A membrana timpânica conecta-se com o cabo do martelo, esse por sua vez, conecta-se com a bigorna, e a bigorna com o estribo. Essa estrutura encontra-se suspensa através de ligamentos, razão pela qual oscilam para trás e para frente. A movimentação do cabo do martelo determina no estribo um movimento de encontro à janela oval da cóclea, transmitindo assim as ondas mecânicas para o líquido coclear. Dessa forma, a energia mecânica é convertida em energia hidráulica. Cada vez que a vibração sonora penetra na cóclea a janela oval move-se para dentro, empurrando o líquido coclear (perilínfa) da escala vestibular numa profundidade maior dentro da cóclea. A pressão fica maior na escala vestibular deslocando a membrana basilar para dentro da escala timpânica, isso faz com que o líquido dessa câmara seja lançado na direção da janela oval, provocando o arqueamento dela para fora, essa onda de pressão causam oscilações correspondentes na perilínfa que preenche a rampa timpânica, sendo também transmitida à rampa média que contém em seu assoalho (a membrana basilar) o órgão de Corti a estrutura responsável pelo processo de transdução sensorial da audição. (MOMENSONHN-SANTOS *et al.*, 2005).

A cóclea converte a pressão diferencial que se estabelece entre as rampas vestibulares e timpânicas em movimentos oscilatórios da membrana basilar, culminado com processos de excitação e de inibição das células sensoriais do órgão de Corti. Essas células sensoriais são denominadas células ciliadas e exibem um conjunto de cílios em sua superfície apical, os estereocílios. Os estereocílios projetam-se em direção à membrana tectória, fixando-se a ela. O movimento da membrana basilar provoca uma força de cisalhamento que age sobre os estereocílios, promovendo um deslocamento angular destes últimos. O deslocamento angular dos estereocílios, também oscilatórios, provoca a abertura e o fechamento de canais iônicos das células ciliadas, resultando em oscilações de seu potencial de membrana que reproduzem as características ondulatórias das ondas sonoras originais. As células ciliadas, em resposta à oscilação de seu potencial de membrana, liberam moléculas de neurotransmissor que irão agir sobre as terminações periféricas de neurônios cujos corpos celulares localizam-se no gânglio

espiral. Os prolongamentos centrais desses neurônios irão constituir a porção auditiva do nervo vestibulo-coclear, conduzindo a informação sensorial ao interior do sistema nervoso central (BALDO, 1999). A Figura 2 apresenta um esquema representativo da orelha interna do ser humano.

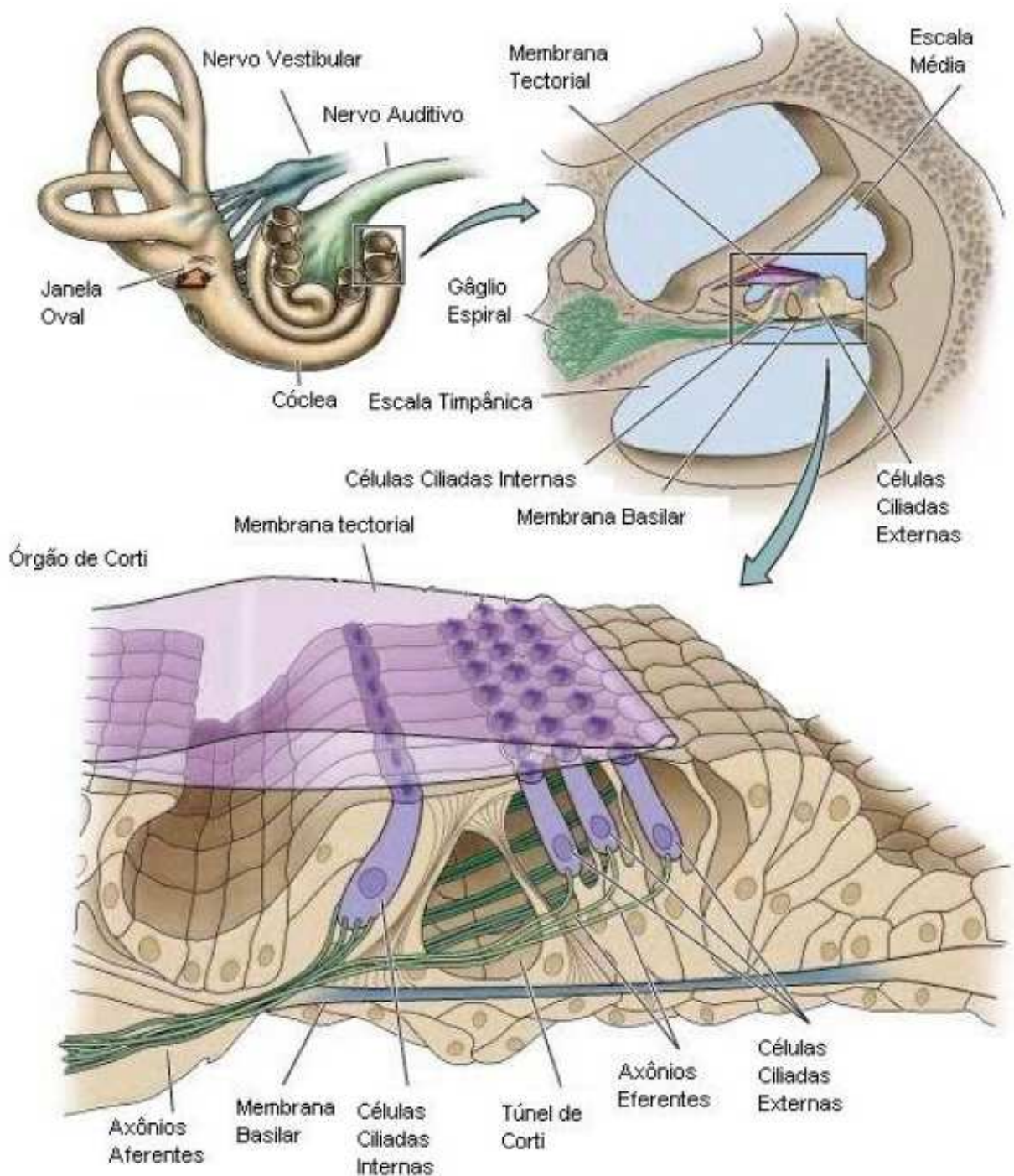


Figura 2: Estrutura da orelha interna do ser humano

Fonte: Purves *et al.*, 2001, cap.13

1.3 ANATOMOFISIOLOGIA DO SISTEMA AUDITIVO CENTRAL.

Ouvir e entender um estímulo envolve não somente a captação do som, mas também a sua interpretação feita no sistema auditivo central. Escutar é um processo complexo que envolve a transdução do estímulo acústico em impulsos neurais, transformação essa que ocorre no órgão periférico, a orelha. Estes impulsos neurais são transmitidos através do nervo auditivo para o cérebro. No cérebro ocorre o registro da percepção e a elaboração cognitiva do sinal acústico; neste mesmo órgão ocorre a percepção consciente do som (BAMIOU; MUSIEK; LUXON, 2001)

O sistema auditivo central é responsável pelo processo de decodificação das ondas sonoras desde a orelha externa até o córtex auditivo. (KATZ e TILLERY, 1997).

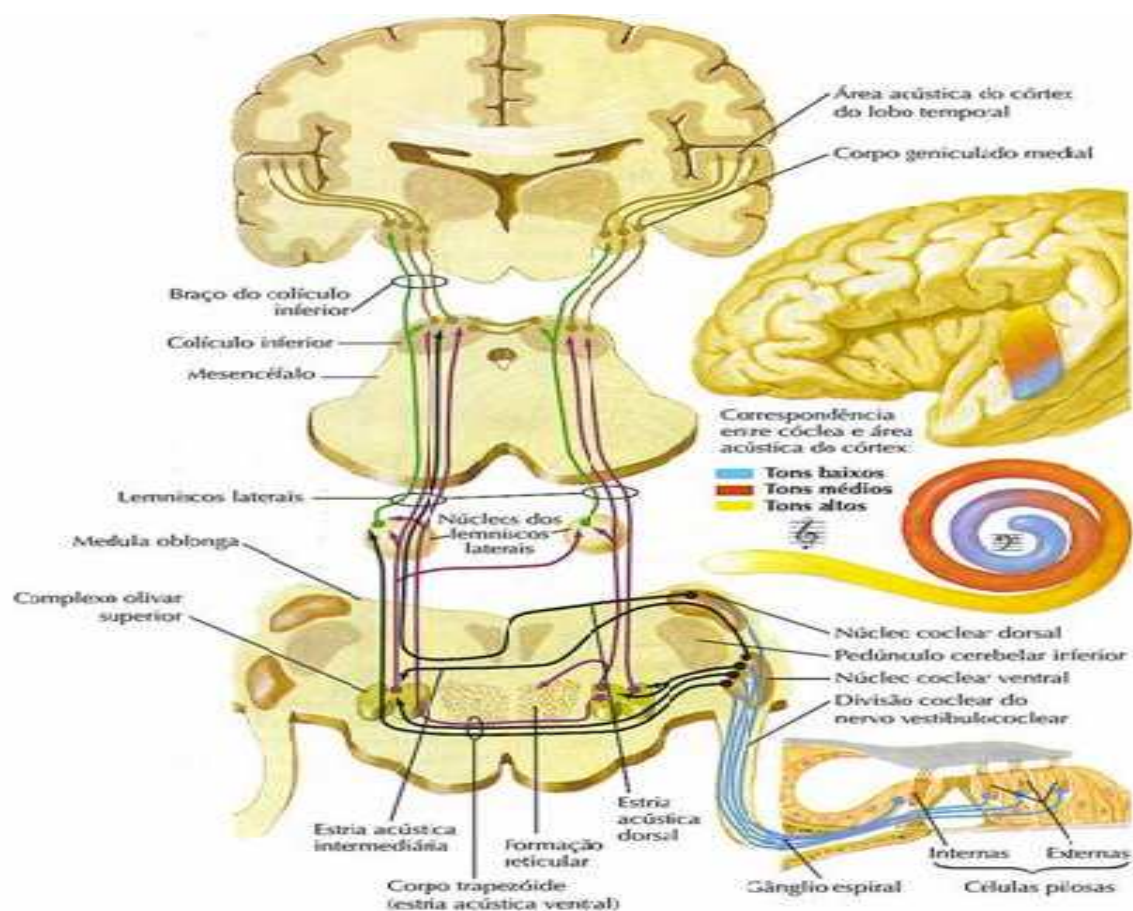
Para Pereira e Ortiz (1997) o termo refere-se a uma série de processos que se sucedem no tempo, que permitem que um indivíduo realize uma análise metacognitiva dos eventos sonoros. São eles: detecção, sensação, discriminação, localização, reconhecimento, compreensão, memória e atenção seletiva. Considera o processamento auditivo como todo o processo que envolve a detecção de eventos acústicos; a capacidade de discriminação quanto ao local, espectro, amplitude e tempo; a habilidade para agrupar sons em figura-fundo; a habilidade para identificar um som, denominá-lo verbalmente e ter acesso ao seu significado.

O sistema auditivo é composto por três regiões: o componente condutivo, composto pela orelha externa e média/ o componente sensorial (a cóclea), o qual transforma o impulso sonoro em elétrico; e o componente neural. Os dois primeiros componentes, condutivo e sensorial, fazem parte do sistema periférico e o componente neural, responsável pela atividade central, faz parte do sistema nervoso.

Katz *et al.* (1997) o sistema auditivo periférico tem a função de detecção e transmissão dos sons, e componente central tem a função de discriminação, localização, reconhecimento do som, compreensão, atenção seletiva e memória auditiva. As estruturas que compõem o sistema auditivo responsáveis pela atividade central são: o tronco encefálico, vias subcorticais, córtex auditivo, lobo temporal e corpo caloso. A cada um desses componentes é possível associar determinadas funções, segue: Núcleos Cocleares: responsáveis pela análise sensorial complexa e diminuem os sinais de ruído de fundo; Núcleos do complexo olivar superior: Codificam a direção de um som no espaço, fazendo a análise das diferenças de intensidade e tempo interaural, ou seja, são responsáveis pela localização sonora, essa mesma estrutura também faz parte do arco reflexo do reflexo acústico do músculo do estapédio;

Núcleos do colículo inferior: é responsável pela atenção ao estímulo acústico, importante também nos reflexos auditivos como o “startle” (sobressalto) e para o desenvolvimento de crises audiogênicas e respostas motoras, resultantes de hipersensibilidade auditiva causadas pela privação sensorial, desde muito cedo, na vida do ser humano; Corpo geniculado medial: até os estudos atuais a sua divisão ventral é a única especificamente auditiva; Córtex auditivo: Localizado na porção média do giro superior do lobo temporal, recebe os estímulos auditivos e interpreta-os como sons diferentes, é responsável pela análise de sons complexos, pela localização de sons; pela atenção seletiva para estímulos auditivos baseados na posição da fonte sonora, pela memória auditiva para sons em sequência e sendo, ainda, necessário para tarefas auditivas mais difíceis.

Além do sistema auditivo periférico e do sistema auditivo central, outras áreas centrais (não-auditivas) estão envolvidas no processamento auditivo. São elas: lobo frontal, conexão temporal-parietal e lobo occipital. Essas estruturas fazem a integração das informações sensoriais auditivas com outras não auditivas. A figura 3 mostra as vias auditivas desde a cóclea até o córtex auditivo, com suas vias aferentes.



1.4 EXAMES QUE DETECTAM A DEFICIÊNCIA AUDITIVA

O sistema auditivo periférico e central possui uma anatomia interessante e interligada. A necessidade de avaliar funcionalmente essas vias e sistemas resultou na criação de uma especialidade médica, a otoneurologia.

A avaliação sistemática de toda essa intrincada rede pela otoneurologia é atualmente muito útil e indispensável para diversas outras especialidades, pois destaca uma maneira sensível, pouco invasiva, rápida e muito abrangente de avaliação e monitorização de muitas patologias do sistema auditivo periférico e central.

Os exames audiológicos mais utilizado na prática da audiologia clínica são: Audiometria Tonal, Audiometria Vocal, Imitânciometria, Emissões Otoacústicas e Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico (PEATE) realizados, exclusivamente por fonoaudiólogos e médicos, são divididos em subjetivos e objetivos. É chamado de subjetivo quando o profissional precisa da ajuda do paciente de alguma forma indicando se escutou ou não o estímulo fornecido. Já no teste objetivo não existe essa necessidade de colaboração. Rotineiramente, inicia-se a avaliação audiológica pelos testes subjetivos, e os objetivos são realizados, quando necessários, para complementar e enriquecer a informação obtida pelos primeiros ou quando existe a impossibilidade do teste subjetivo.

Os exames objetivos avaliam as respostas eletrofisiológicas e para tanto se revestem de alta sensibilidade, quantificando a audição do indivíduo, e ainda para aferir topograficamente o nível de lesão, avaliar o grau de intensidade de acometimento, monitorar a evolução da patologia e acompanhar o tratamento imposto.

Os testes subjetivos que são comumente utilizados na prática clínica são: a audiometria tonal liminar; os testes de reconhecimento de fala, que compreendem o índice percentual de reconhecimento de fala (IPRF); o limiar de detecção de fala (LDF); o limiar de reconhecimento de fala (LRF) e a imitânciometria.

Audiometria tonal liminar é um dos testes subjetivos mais requisitados na área da audiologia clínica, tem como objetivo determinar os limiares auditivos por via aérea e via óssea. É um exame realizado em um ambiente acusticamente protegido (cabine audiométrica).

A imitânciometria é um exame que avalia a integridade e a complacência da orelha média, no mesmo teste é possível investigar a funcionalidade do músculo estapédico, através

dos reflexos estapedianos, que ocorre após a orelha ser estimulada com um som acima do limiar auditivo do indivíduo.

Como testes objetivos, a otoemissão acústica e a audiometria de tronco encefálico são os mais utilizados na prática clínica.

O exame das Emissões Otoacústicas trata-se de um método objetivo, relativamente simples, rápido e não invasivo. Pode ser realizado em qualquer faixa etária. Momensohn-Santos *et al.* (2005), as definiu como liberação de energia sonora originada da cóclea, que se propaga pela orelha média, até alcançar o conduto auditivo externo. O registro das ondas sonoras é captado através de uma pequena sonda introduzida no meato acústico externo, testando a funcionalidade da cóclea.

O Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico (PEATE) é uma análise objetiva e mais específica do sistema auditivo através de respostas eletrofisiológicas. O estímulo acústico, após ser processado na cóclea, está apto para trafegar pelas vias auditivas ascendentes. A interligação entre a cóclea e o tronco encefálico é feita pelo nervo auditivo, que se estende do gânglio espiral aos músculos cocleares, atravessando a região do ângulo pontocerebelar. Dos núcleos cocleares, grande parte da via auditiva cruza o tronco encefálico pelo corpo trapezóide e estabelece outra zona de conexão nos núcleos do complexo olivar. Deste ponto, as fibras homolaterais e contralaterais iniciam um trajeto ascendente até os núcleos do lemnisco lateral, novamente retornam o trajeto ascendente até os núcleos de colículo inferior, na região mesencefálica, aonde acontecem conexões contralaterais e com os outros núcleos da via. O teste é realizado para monitorar o tempo decorrido na passagem do estímulo acústico, transformado em elétrico, por estes centros de conexões. (RUSSO, 2005)

No campo da audiologia clínica, a associação de métodos objetivos e subjetivos que avaliam a audição vem ganhando espaço e tornando-se cada vez mais frequentes. Esta associação de métodos contribui para complementar e tornar mais preciso o diagnóstico dos distúrbios auditivos e de grande contribuição para pesquisas envolvendo indivíduos deficientes auditivos.

1.5 ASPECTOS GERAIS DA DEFICIÊNCIA AUDITIVA

A deficiência auditiva é um dos distúrbios sensoriais que mais acomete entre seres humanos, pode apresentar diferentes etiologias e diferentes níveis de gravidade. Além disso,

pode se manifestar em qualquer fase da vida e decorre de fatores genéticos, interação ambiental ou da combinação de ambos.

A manifestação grave da doença na primeira infância tem um impacto negativo no desenvolvimento da linguagem, da fala, de fatores psicológicos, das interações sociais, bem como, no processo de alfabetização do indivíduo com o distúrbio auditivo. Enquanto que a manifestação tardia da surdez, já durante a fase adulta, pode comprometer a qualidade de vida, na medida em que, favorece o isolamento social de indivíduos com a deficiência auditiva (KALATZIS e PETIT, 1998).

Os principais fatores ambientais que contribuem para a deficiência auditiva incluem: as infecções congênicas (toxoplasmose, rubéola e citomegalovírus, meningite e caxumba); a irradiação por raios-X; o tocotraumatismo e as complicações perinatais; o uso de drogas ototóxicas durante a gestação, a exposição ao barulho excessivo e as lesões inflamatórias da orelha média que também se mostram como importantes fatores no comprometimento normal da orelha (KALATZIS e PETIT, 1998 e RUSSO, 2005).

Finsterer e Fellingner (2005) de acordo com a gravidade da manifestação, a deficiência auditiva pode ser classificada quanto ao grau como: leve, com perda de audição entre 26dBNA e 40dBNA; Moderada, entre 41dBNA e 55dBNA; Moderada a Severa, entre 56dBNA e 70dBNA; Severa, entre 71dBNA e 90dBNA e profunda, acima de 90dBNA, e é considerado normal o limiar de perda até 25 dBNA na audiologia clínica. E podem ser divididas quanto ao tipo, de acordo com a localização da parte afetada, em: condutiva, cuja anomalia afeta a orelha externa ou média e ocorre quando as ondas sonoras não são bem conduzidas até a orelha interna, existindo um bloqueio no mecanismo de transmissão do som, desde o canal auditivo externo até o limite com a orelha interna, algumas causas importantes de surdez de condução: Obstrução por acúmulo de cera ou por objetos introduzidos no canal auditivo, perfuração ou outro dano causado no tímpano, infecção na orelha média, infecção/lesão ou fixação dos ossículos (martelo, bigorna e estribo) da orelha média; Neurosensorial resulta da disfunção do nervo auditivo ou da orelha interna, o componente sensorial pode ser o órgão de Corti danificado, a incapacidade das células ciliadas de estimular os nervos da audição ou um problema metabólico nos fluidos da orelha interna, o componente neural ou retrococlear pode ser resultado de um dano severo no órgão de Corti, que causa a degeneração dos nervos auditivos, ou pode ser uma incapacidade dos nervos auditivos de conduzir informações neuroquímicas pelas vias auditivas centrais; Mistas,

aquelas onde aparecem componentes condutivos e neurossensoriais em uma mesma orelha; Central, são aquelas em que a lesão esta localizada na via auditiva central, ou seja, na porção do nervo coclear e de suas conexões, que se localizam entre o núcleo coclear e o córtex do lobo temporal, e funcional aquelas em que denominamos o quadro audiológico que apresenta uma perda auditiva exagerada ou simulada (MOMENSONHN-SANTOS *et al.*, 2005).

Os diferentes tipos de surdez em relação ao tempo em que ela ocorre e de acordo com o desenvolvimento linguístico, pode ser classificada como: Pré-lingual que se manifesta antes do período de aquisição da linguagem e caracterizada pela total ausência de memória auditiva e pós-lingual cuja manifestação ocorre após a aquisição da fala e apresenta quadros menos graves, entretanto progressivos (SMITH *et al.*, 2005).

A surdez pode ainda manifestar-se como apenas um dos sinais clínicos de uma doença mais complexa, denominada Surdez Sindrômica, ou manifestar-se de maneira isolada cuja denominação é Surdez não-sindrômica. O termo síndrome refere-se a um conjunto de anomalias congênitas que estão relacionadas patologicamente e ao contrário de uma sequência, que é um padrão de anomalias em cascata, não podem ser explicadas a partir de um defeito único localizado no desencadeante. As síndromes são causadas mais frequentemente por um agente etiológico único como uma infecção viral ou anormalidade cromossômica específica que afeta simultaneamente vários tecidos. Quando a causa subjacente do distúrbio torna-se conhecida a síndrome é chamada de uma doença (KALATZIS e PETIT, 1998).

1.6 EPIDEMIOLOGIA

A deficiência auditiva leva em considerações fatores demográficos e sócio culturais, variando, consideravelmente por todo o mundo, como resultado de diferentes grupos étnicos (Europeu, Africano e Ameríndios). Desse modo, diferenças entre dados epidemiológicos podem ser observadas de acordo com o nível de desenvolvimento de cada país ou área geográfica (PARVING, 1999).

Cerca de 70 milhões de pessoas no mundo apresentam algum grau de perda auditiva. Além da alta incidência, as implicações da perda auditiva, na linguagem, na cognição, no desenvolvimento emocional e social reforçam sua importância. A frequência e a gravidade da perda auditiva aumentam com a idade. Na população mundial, aproximadamente 10% dos indivíduos com 60 (sessenta) anos e 50% dos indivíduos com 80 (oitenta) anos de idade são afetados por perda auditiva (EISEN e RYUGO, 2007).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, até o ano de 2006, 278 milhões de pessoas em todo mundo manifestam algum tipo de perda auditiva - variando de moderada a profunda. No Brasil, de acordo com o censo realizado em 2000 - 14,5% da população brasileira apresentam algum tipo de deficiência. Deste total, o número de surdos no Brasil era de 166.400, sendo 80 mil mulheres e 86.400 homens. Além disso, cerca de 900 mil pessoas declararam ter grande dificuldade permanente de ouvir (IBGE, CENSO 2000).

Em países desenvolvidos, estima-se que a deficiência auditiva entre recém-nascidos esteja na ordem de 1/1000 e que a deficiência auditiva decorrente de fatores genéticos esteja presente em mais de 60% desses casos (COHEN e GORLIN, 1995). Cerca de 80% dos casos de surdez congênita são aparentemente esporádicos ou com padrão de herança do tipo autossômico recessivo (PARVING; DAVIS, 2001).

No Brasil não há dados oficiais sobre a prevalência da deficiência auditiva de origem hereditária. Estima-se que a frequência da surdez causada por fatores genéticos seja da ordem de 16%, enquanto os 84% restantes dos casos de surdez sejam causados por fatores ambientais e de etiologia desconhecida. Estas estimativas refletem uma frequência maior do que a de países desenvolvidos, possivelmente em função da maior contribuição de fatores ambientais. No entanto, a proporção de fatores hereditários faz com que tenda a aumentar com resultado de melhorias na saúde pública (PIATTO; MANIGLIA, 2001).

Uma hipótese para explicar a possível e elevada heterogeneidade da doença entre a população brasileira pode residir em sua própria constituição a qual resulta de mais de 05 (cinco) séculos de mistura interétnica entre diferentes povos dos 03 (três) continentes: colonizadores europeus, representados principalmente por portugueses; escravos africanos e nativos ameríndios. Tornando-se a população brasileira uma das mais heterogêneas no mundo, com um processo de miscigenação de diferentes maneiras em diferentes regiões geográficas do país. Outra hipótese pode estar relacionada a questão do controle de saúde pública básica que é ainda deficiente em muitas regiões e centros urbanos brasileiros, principalmente ao que diz respeito ao controle de doenças infecciosas e que respondem por grande parte dos casos de surdez decorrente de fatores ambientais. (ALVES-SILVA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2010).

1.7 DEFICIÊNCIA AUDITIVA DE ETIOLOGIA GENÉTICA

A deficiência auditiva hereditária pode se manifestar como um dos sinais clínicos de uma doença mais complexa e associada a diversas anormalidades, denominada Surdez Síndrômica, ou apresentar-se de forma isolada, denominada de Surdez não-sindrômica (VAN CAMP *et al.*, 1997). Aproximadamente 400 variantes síndrômicas foram descritas (VAN CAMP e SMITH, 2006). Cerca de 30% dos casos de deficiência auditiva são determinados como formas síndrômicas e 70% de formas não-síndrômicas (MORTON, 2002; RESENDES *et al.*, 2001). A surdez do tipo síndrômica pode apresentar muitos modelos de transmissão, incluindo a herança do tipo materna e própria de mutações mitocondriais. Além disso, pode manifestar a surdez de condução, sensorineural ou a mistura de ambas (KALATZIS e PETIT, 1998). Muitas formas herdadas de surdez não-síndrômica apresentam traços de segregação monogênica. Entretanto, a deficiência auditiva pode apresentar também modelos de herança não frequentes e próprios do tipo digênico ou complexo, o que dificulta sua identificação (BADANO *et al.*, 2002; RIAZUDDIN *et al.*, 1999) e requer estudos mais minuciosos. As formas não-síndrômicas de surdez hereditária são classificadas de acordo com o modelo de herança: autossômica recessiva (DFNB); autossômica dominante (DFNA); herança ligada ao cromossomo X (DFN); ou herança mitocondrial.

Aproximadamente 77% dos casos de surdez pré-lingual são do tipo autossômica recessiva (DFNB), 22% apresentam padrão de herança autossômica dominante (DFNA) com manifestações tardias; 1% herança ligada ao cromossomo X (DFN); e menos de 1%

apresentam herança mitocondrial (MORTON, 2002). As formas autossômicas recessivas são responsáveis por fenótipos mais graves e acometem a grande maioria dos casos de surdez congênita profunda. Estas formas são quase que exclusivamente neurosensoriais e próprias de defeitos na cóclea (KALATZIS e PETIT, 1998). Até o presente, mais de 130 loci relacionados à surdez não-sindrômica foram mapeados. Destes, 54 apresentam herança do tipo autossômica dominante (DFNA); 67 apresentam herança do tipo autossômica recessiva (DFNB); 08 (oito) têm herança do tipo ligada ao X (DFN) (VAN CAMP e SMITH, 2006). Foram identificados e clonados, 23 genes para herança do tipo autossômica recessiva (Quadro 1); 21 genes para herança do tipo autossômica dominante (Quadro 2); 01 (um) gene para herança ligada ao X; e 7 (sete) genes mitocondriais (VAN CAMP e SMITH, 2006). Apesar da maioria dos casos de surdez congênita refletir um padrão de herança do tipo autossômico recessivo, a natureza de casos esporádicos e isolados é desconhecida o que torna difícil à prática do aconselhamento genético e diagnóstico da surdez (ESTIVILL *et al.*, 1998).

No entanto, a compreensão da genética molecular em surdez tem avançado rapidamente nas últimas décadas. Mais de 100 genes associados com a deficiência auditiva foram identificados, um deles, o gene GJB2, que codifica a conexina 26 responsável por 50% de todas as formas de surdez hereditária não-sindrômica, ainda sim, a maioria dos casos de perda auditiva neste país são devidos a fatores ambientais. A etiologia genética da surdez será cada vez mais determinada conforme a implementação de testes genéticos (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

QUADRO 1		
Genes envolvidos com formas não-sindrômicas de surdez		
Genes com padrão de herança autossômica recessiva		
Lócus	Gene	Referencia
	PRES (Prestin)	Liu <i>et al.</i> , 2003
DFNB1	GJB2 (Cx26)	Kelsell <i>et al.</i> , 1997
DFNB1	GJB6 (Cx30)	Del Castillo <i>et al.</i> , 2002
DFNB2	MYO7A	Liu <i>et al.</i> , 1997, Weil <i>et al.</i> , 1997
DFNB3	MYO15	Wang <i>et al.</i> , 1998
DFNB4	SLC26A4	Li <i>et al.</i> , 1998
DFNB6	TMIE	Naz <i>et al.</i> , 2002
DFNB7/DFNB11	TMC1	Kurima <i>et al.</i> , 2002
DFNB8/DFNB10	TMPRSS3	Scott <i>et al.</i> , 2001
DFNB9	OTOF	Yasunaga <i>et al.</i> , 1999
DFNB12	CDH23	Bork <i>et al.</i> , 2001
DFNB16	STRC	Verpy <i>et al.</i> , 2001
DFNB18	USH1C	Ouyang <i>et al.</i> , 2002, Ahmed <i>et al.</i> , 2002
DFNB21	TECTA	Mustapha <i>et al.</i> , 1999
DFNB22	OTOA	Zwaenepoel <i>et al.</i> , 2002
DFNB23	PCDH15	Ahmed <i>et al.</i> , 2003
DFNB28	TRIOBP	Shahin <i>et al.</i> , 2006, Riazuddin <i>et al.</i> , 2006
DFNB29	CLDN14	Wilcox <i>et al.</i> , 2001
DFNB30	MYO3A	Walsh <i>et al.</i> , 2002
DFNB31	WHRN	Mburu <i>et al.</i> , 2003
DFNB36	ESPN	Naz <i>et al.</i> , 2004
DFNB37	MYO6	Ahmed <i>et al.</i> , 2003
DFNB67	TMHS	Shabbir <i>et al.</i> , 2006

Quadro 1 - Genes Autossômicos Recessivos envolvidos com formas não sindrômicas de surdez.

Fonte: Van Camp and Smith, 2006.

QUADRO 2		
Genes envolvidos com formas não-sindrômicas de surdez		
Genes com padrão de herança autossômica dominante		
Locus	Gene	Referencia
	CRYM	<i>Abe et al., 2003</i>
DFNA1	DIAPH1	<i>Lynch et al., 1997</i>
DFNA2	GJB3 (Cx31)	<i>Xia et al., 1998</i>
DFNA2	KCNQ4	<i>Kubisch et al., 1999</i>
DFNA3	GJB2 (Cx26)	<i>Kelsell et al., 1997</i>
DFNA3	GJB6 (Cx30)	<i>Grifa et al., 1999</i>
DFNA4	MYH14	<i>Donaudy et al., 2004</i>
DFNA5	DFNA5	<i>Van Laer et al., 1998</i>
DFNA6/DFNA14	WFS1	<i>Bespalova et al., 2001, Young et al., 2001</i>
DFNA8/DFNA12	TECTA	<i>Verhoeven et al., 1998</i>
DFNA9	COCH	<i>Robertson et al., 1998</i>
DFNA10	EYA4	<i>Wayne et al., 2001</i>
DFNA11	MYO7A	<i>Liu et al., 1997</i>
DFNA13	COL11A2	<i>McGuirt et al., 1999</i>
DFNA15	POU4F3	<i>Vahava et al., 1998</i>
DFNA17	MYH9	<i>Lalwani et al., 2000</i>
DFNA20/26	ACTG1	<i>Zhu et al., 2003, van Wijk et al., 2003</i>
DFNA22	MYO6	<i>Melchionda et al., 2001</i>
DFNA28	TFCP2L3	<i>Peters et al., 2002</i>
DFNA36	TMC1	<i>Kurima et al., 2002</i>
DFNA48	MYO1A	<i>Donaudy et al., 2003</i>

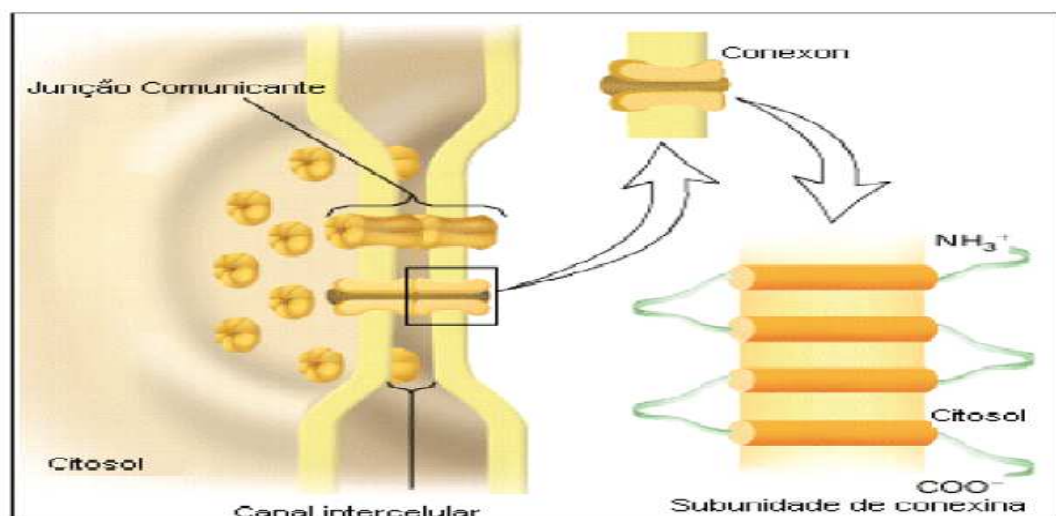
Quadro 2 - Genes autossômicos dominantes envolvidos com formas não-sindrômicas de surdez.

Fonte: Van Camp and Smith, 2006.

1.8 JUNÇÕES COMUNICANTES E CONEXINAS

Junções Comunicantes (ou Gap Junction) são canais intercelulares de membrana que estão presentes virtualmente em todos os metazoários (GOODENOUGH *et al.*, 1996). Em vertebrados, as Junções Comunicantes são compostas por uma família multigênica chamada de Conexina (WILLECKE *et al.*, 2002), enquanto que em invertebrados são codificadas por uma família de genes chamada Inexinas (PHELAN e STARICH, 2001). Conexinas e Inexinas compartilham uma idêntica topologia de membrana. As Junções Comunicantes são junções intercelulares especializadas caracterizadas pela aposição da membrana plasmática de células sobrepostas cujo espaço exíguo é de 2-3 nm e contém canais de membrana hidrofílicos que possibilitam a passagem de íons inorgânicos, metabólitos e pequenas moléculas sinalizadoras celulares menores que 1kDa de tamanho (KUMAR e GILULA, 1996) entre células adjacentes de inúmeros tecidos animais, conectando dessa forma células e metabólitos eletricamente (fig.4). Este tipo de comunicação intercelular permite coordenar a atividade celular, característica essencial para a homeostase de órgãos durante o desenvolvimento e vida adulta de organismos multicelulares (BRUZZONE *et al.*, 1996; GOODENOUGH *et al.*, 1996; WILLECKE *et al.*, 2002). A produção de um potencial de qualquer tipo pode passar diretamente entre Junções Comunicantes de células adjacentes e não havendo intermediários químicos, sendo a transmissão considerada ultra-rápida, durando apenas centésimos de milésimos de segundo (LENT, 2001).

Figura 4 – Estrutura Da Junção Comunicante (Gap Junctions)

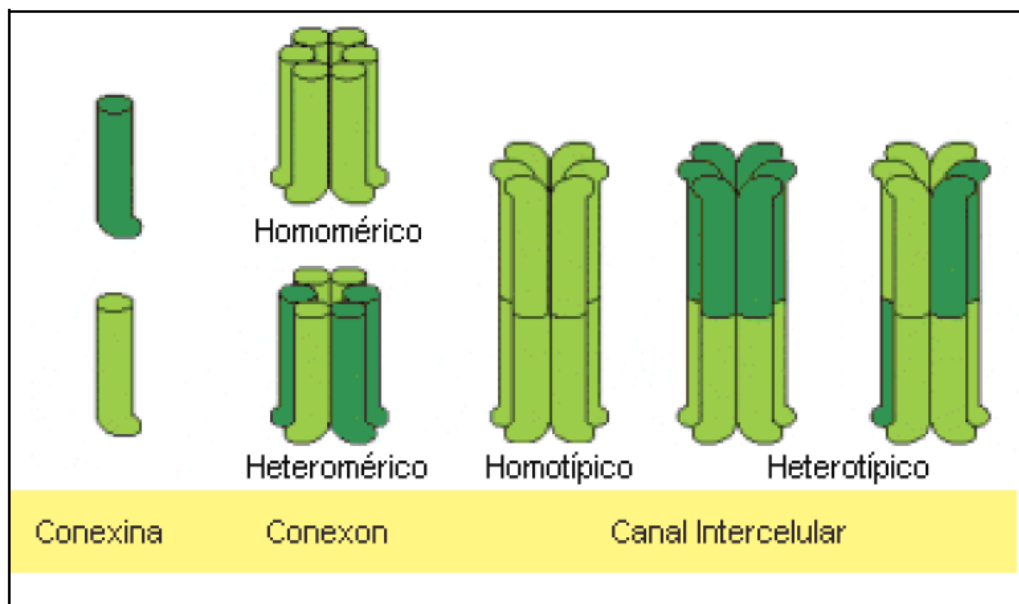


Fonte: Lodish et al., 2000.cap.22

As junções comunicantes são firmemente empacotadas em uma disposição hexagonal chamada Conexon. Cada Conexon consiste em um hemicanal formado por seis subunidades protéicas de conexinas organizadas ao redor de um poro central (KUMAR e GILULA, 1996; SOSINSKY, 1996).

Os Conexons podem ser compostos por um único tipo de conexina (homomérico) ou diferentes tipos de conexinas (heteromérico). Para a formação da Junção Comunicante é necessária a união de dois hemicanais entre células adjacentes. A Junção Comunicante pode ser do tipo homotípica que apresenta Conexons idênticos ou heterotípica apresentando dois ou mais tipos de Conexons diferentes (WHITE e PAUL, 1999) (fig. 5).

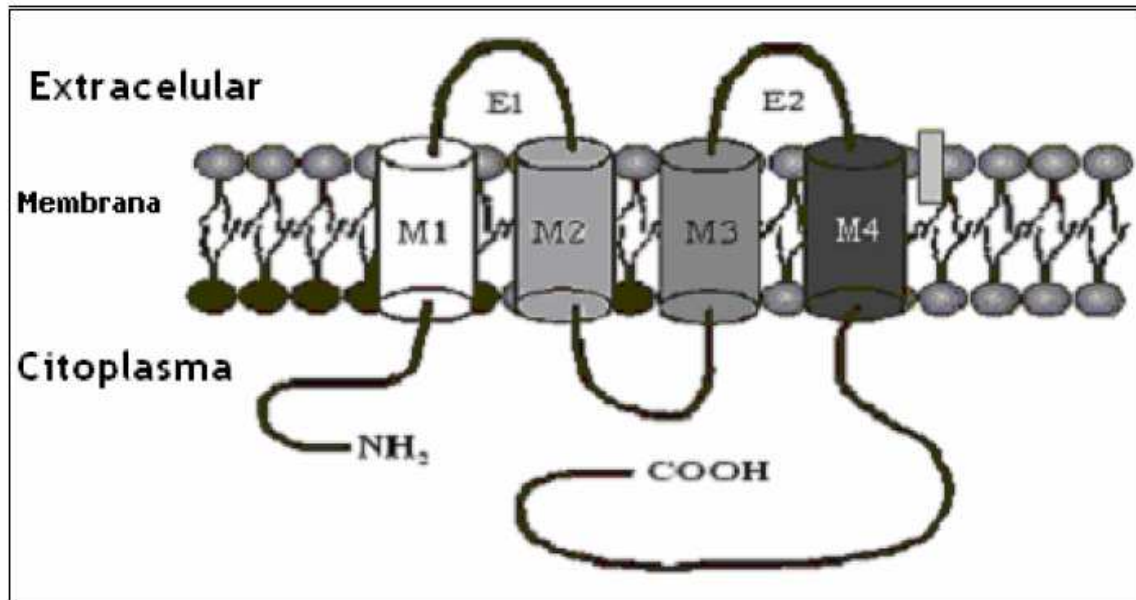
Figura 5 – Estrutura do Conexon



Fonte: Alberts *et al.*, 2002, cap. 19.

As moléculas de conexinas possuem quatro domínios trans-membrana hidrofóbicos (M1-M4) que ancoram a proteína na membrana; dois domínios (alças) extracelulares (E1 e E2); um domínio (alça) citoplasmático (CL), possuindo as extremidades carboxi – e amino-terminal intracitoplasmáticas GOODENOUGH *et al.*, 1996) (fig.6). Os domínios extracelulares medeiam interações homofílicas que servem para alinhar os poros dos Conexons das duas células. Os domínios intracelulares são sítios de regulação da condutância de canais, provavelmente por meio de mudanças na conformação das conexinas induzidas por variações de voltagem, de pH ou da concentração intracelular de Cálcio (BALDO, 1999).

Figura 6 – Estrutura da Conexina. Os cilindros representam o domínio transmembrana (M1-M4). As alças entre o primeiro e o segundo, assim como o terceiro e o quarto domínio transmembrana são extracelulares (E1 e E2, respectivamente)



FONTE: Ivesaro, 2001.

Dois tipos de nomenclatura são usados para classificar conexinas humanas em três grupos, de acordo com sua massa molecular (que varia de 26 a 59kD) ou por similaridades de sequências: Gap Junction a (GJA), Gap Junction b (GJB) ou Gap Junction g (GJC). Até o presente, 20 genes de conexinas foram identificados em genoma de rato e 21 genes no genoma humano (SOHL e WILLECKE, 2003). A estrutura comum dos genes do grupo das conexinas é caracterizada por apresentar uma simples estrutura, na qual a região codificadora está toda contida em um único éxon, acompanhado de um ou dois íntrons localizados na região 5' não traduzida (WHITE e PAUL, 1999; RABIONET *et al.*, 2000).

1.9 A CÓCLEA E OS MECANISMOS *GAP JUNCTION*

A orelha interna e a pele possuem em abundância Junções Comunicantes (Gap Junctions). Na epiderme e no folículo piloso, as Junções Comunicantes são responsáveis pela diferenciação coordenada de queratinócitos e durante a transdução auditiva, no ouvido interno, as Junções Comunicantes mantêm potenciais de membrana por meio da regulação do

fluxo de íons (especificamente íons potássio) entre o epitélio sensorial do ouvido interno (FORGEL *et al* 2002).

A cóclea de mamíferos apresenta organização única e possui compartimentos preenchidos por fluidos que suportam o processo de transdução mecanossensorial. A superfície apical das células ciliadas da cóclea é banhada pela endolinfa que possui composição iônica alta de K⁺ e baixa de Na⁺. O alto nível de K⁺ é necessário para a função normal e manutenção da atividade de células na escala média (RABIONETE *et al.*, 2002).

A endolinfa coclear é caracterizada pela presença de um potencial endolinfático de aproximadamente 100 mV. No momento em que células ciliadas da cóclea são ativadas pelo som, seus potenciais receptores são gerados pelo fluxo de K⁺, a partir da endolinfa, para dentro das células ciliadas. Os íons K⁺ são liberados basolateralmente para o espaço extracelular por células sensoriais, reciclado e novamente difundido para a endolinfa (KICHUCHI *et al.*, 1995 e 2000). Na orelha interna, as Junções Comunicantes são observadas entre células do órgão de Corti e entre células da parede lateral da cóclea. Na cóclea de mamíferos existem dois tipos de sistemas independentes de Junções Comunicantes: o Sistema de Células Epiteliais via Junção Comunicante que é composto por células do órgão de Corti e o Sistema de Comunicação Celular via Junção Comunicante (KICHUCHI *et al.*, 2000). Estes dois sistemas de Junções Comunicantes (*Gap Junction*) estão envolvidos no processo da recirculação coclear de íons K⁺, mantendo uma alta concentração deste íon na endolinfa, o que crucial para o funcionamento normal do sistema auditivo (RABIONETE *et al.*, 2002).

Até o presente, foi demonstrada a existência de quatro tipos principais de conexinas, presentes na cóclea de mamíferos, que estão relacionadas às formas de surdez (sindrômica e não-sindrômica). Esses tipos incluem a conexina 26 (Kichuchi *et al.*, 1995 e 2000; Lautermann *et al.*, 1998); a conexina 30 (LAUTERMANN *et al.*, 1998), a conexina 31 (ADAMS, 2000) e a conexina 43 (LAUTERMANN *et al.*, 1998). De todas, a de maior expressão na cóclea corresponde a conexina 26 (FORGE *et al.*, 2002).

Apesar da boa caracterização estrutural e bioquímica dos canais intercelulares, informações sobre seus aspectos biológicos ainda são limitadas (WHITE e PAUL, 1999). Entretanto, existe um elevado número de patologias humanas associadas a mutações em genes de conexinas. Entre essas, está a Doença de Charcot-Marie-Tooth (ligada ao X) associada a defeitos da Conexina 32 que corresponde a uma progressiva neuropatia e resulta no rompimento da mielina e degeneração axonal de nervos periféricos (BERGOFFEN *et al.*,

1993); Surdez neurossensorial (KELSELL *et al.*,1997) e catarata congênita (SHIELS *et al.*,1998).

Mutações no gene da conexina 26 podem ocasionar defeitos nos complexos das Junções Comunicantes o que pode gerar desordens no fluxo de íons potássio e, como resultado, uma intoxicação local do órgão de Corti pelo potássio. O aumento na concentração de íons potássio na perilinfa que banha a parede lateral e a porção basal de células ciliadas pode interferir no funcionamento normal destas e, eventualmente, ser responsável pela liberação de agentes tóxicos específicos para células ciliadas, fornecendo a base para a perda auditiva (LEFEBVRE *et al.*, 2000 e FRIEDMAN 2007).

1.9.1 O LOCUS DFNB1 E O GENE GJB2

O locus DFNB1, localizado no braço longo do cromossomo 13, região 13q12, foi o primeiro identificado e associado à surdez de herança autossômica recessiva em duas famílias da Tunísia com surdez pré-lingual profunda (GUILFORD *et al.*, 1994).

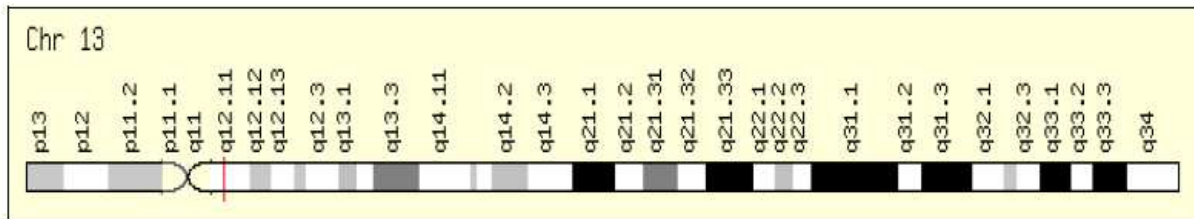
Posteriormente, estudos com famílias consanguíneas e não consanguíneas, em diferentes populações, confirmaram que o locus DFNB1 é responsável pela segregação ligada de surdez não-sindrômica recessiva (FINSTERER E FELLINGER 2005).

Outro gene localizado na mesma região cromossômica foi proposto como causador da forma dominante de surdez não-sindrômica. Este locus foi identificado como DFNA3 (Chaib *et al.*, 1994). A identificação do gene envolvido em ambos os casos de surdez – mais tarde identificado como o gene GJB2 – corroborou a hipótese de que o locus DFNB1 detém a maior contribuição para a surdez genética em muitas populações (GASPARINI *et al.*,1997; KELSELL *et al.*, 1997; MAW *et al.*, 1995; RABIONET *et al.*, 2000) e é responsável tanto por formas dominantes quanto por formas recessivas da surdez.

Estudos posteriores confirmaram o envolvimento de mutações no gene GJB2 como responsável por 30% a 50% dos casos de surdez recessiva pré-lingual em algumas populações da Europa (KELSELL *et al.*, 2001; RABIONET *et al.*,2000).

O GJB2 (Gap junction beta-2 protein) é um gene relativamente pequeno e apresenta cerca de 5.5 kb e está localizado no cromossomo 13q11-q12. Estruturalmente este gene apresenta dois éxons. Entretanto, apenas o segundo éxon apresenta sequência codificadora (KEMPERMAN *et al.*, 2002).

Figura 7- Localização do gene GJB2 no cromossomo 13



Fonte: Genecards

A região codificadora do gene GJB2 (éxon 2) consiste de 681pb incluindo o códon de parada. O produto da tradução é a proteína Conexina 26 com 208 aminoácidos com massa aproximada de 26 kDa. A região promotora é altamente conservada entre mamíferos já estudados (KIANG *et al.*, 1997). Muitos alelos mutantes do gene GJB2 foram identificados em casos familiares e esporádicos de formas não-sindrômicas recessivas e dominantes de surdez em muitas partes do mundo (CARRASQUILLO *et al.*, 1997; DENOYELLE *et al.*, 1998; SCOTT *et al.*, 1998). Em famílias Mediterrâneas estudadas, 80% dos casos de perda auditiva estão associados a mutações no gene GJB2 (ESTIVILL *et al.*, 1998).

Até o presente, foram descritas 101 mutações no gene GJB2 e associadas com surdez hereditária. 09 (nove) delas estão associadas com formas autossômicas dominantes – DFNA (Quadro 3) e 92 com formas autossômicas recessivas - DFNB (Quadro 4). Destas, as mutações 35delG, 167delT e 235delC se mostram como características de determinados grupos populacionais (Connexin and deafness Homepage).

Quadro 3

Mutações descritas no gene GJB2 relacionadas com surdez não-sindrômica e associadas ao padrão de herança autossômico dominante

Mutação	Descrição	Efeito	Domínio	Referencia
delE42	del AGG nt 125	Del Glu 142	EC1	Rouan <i>et al.</i> , 2001
W44S	G → C nt 131	Trp 44 Ser	EC1	Gasparini, PC
W44C	G → C nt 132	Trp 44 Cis	EC1	Denoyelle <i>et al.</i> , 1998
R75Q	G → A nt 224	Arg 75 Gln	EC1	Rabionet <i>et al.</i> , 2000
R143Q	G → A nt 428	Arg Gln 143	TM3	Loffler <i>et al.</i> , 2001
M163L	A → C nt 487	Met 163 Leu	EC2	Fialho <i>et al.</i> , 2003
D179N	G → A nt 535	Asp 179 Asn	EC2	Primignani <i>et al.</i> , 2002 (PC)
R184Q	G → A nt 551	Arg 184 Gln	EC2	Hamelmann <i>et al.</i> , 2001
C202F	G → T nt 605	Cys 202 Phe	TM4	Morle <i>et al.</i> , 2000

Fonte: The Connexin and deafness Homepage

Quadro 4				
Mutações descritas no gene GJB2 relacionadas com surdez não-sindrômica e associadas ao padrão de herança autossômico recessivo				
(Continua)				
Mutação	Descrição	Efeito	Domínio	Referencia
IVS1+1 G to A	G ³¹⁷² →A	Sítio de Splicing	nenhum	Green <i>et al.</i> , 1999
-3170G to A	G ³¹⁷⁰ → nt	Sítio de Splicing Sem	nenhum	Denoyelle <i>et al.</i> , 1999
M1V (p.0)	A ¹ → G	formação da proteína	IC1	Estivill <i>et al.</i> , 1998
T8M	C ²³ → T	Tre 8 Met	IC1	Kenna <i>et al.</i> , 2001
31del38	del 38 nt 31	Frameshift	IC1	Denoyelle <i>et al.</i> , 1997
31del14	del 14 nt 31	Frameshift	IC1	Murgia <i>et al.</i> , 1999
G12V	G ³⁵ → T	Gly 12 Val	IC1	Rabionet <i>et al.</i> , 2000
30delG	del G nt 30-35	Frameshift	IC1	Denoyelle <i>et al.</i> , 1997
35insG	ins G nt 30-35	Frameshift	IC1	Estivill <i>et al.</i> , 1998
35delG	del G nt 30-35	Frameshift	IC1	Iliades <i>et al.</i> , 2002
35delG	del G nt 30-35	Frameshift	IC1	Zelante <i>et al.</i> , 1997
K15T	A ⁴⁴ → C	Lys 15 Thr	IC1	Bradshaw <i>et al.</i> , 2002 (PC)
51del12insA	del 12 nt e ins A nt 51	Frameshift	IC1	Sobe <i>et al.</i> , 2000
S19T	G ⁵⁶ → C	Ser 19 Thr	IC1	Rabionet <i>et al.</i> , 2000
I20T	T ⁵⁹ → C	Ile 20 Thr	IC1	Loffler <i>et al.</i> , 2001
W24X	G ⁷¹ → A	Trp 24 Stop	TM1	Kelsell <i>et al.</i> , 1997
V27I+E114G	G ⁷⁹ → A t + A 341→ G	Val 27 Ile e Glu 114 Gly	TM1+IC2	Pandya <i>et al.</i> , 2001
R32C	C ⁹⁴ → T	Arg 32 Cis	IC1	Prasad <i>et al.</i> , 2000 other
R32L	G ⁹⁵ → T	Arg 32 Leu	IC1	Yamuna <i>et al.</i> , 2003 (PC)
R32H	G ⁹⁵ → A	Arg 32 His	IC1	Mustapha <i>et al.</i> , 2001
V37I	G ¹⁰⁹ → A	Val 37 Ile	TM1	Kelley <i>et al.</i> , 1998
A40E	C ¹¹⁹ → A	Ala 40 Glu	EC1	L Perroni, PC
A40G	C ¹¹⁹ → G	Ala 40 Gly	EC1	Sironi F <i>et al.</i> , (PC)
W44X	G ¹³² → A	Trp 44 stop	EC1	Green <i>et al.</i> , 1999
G45E	G ¹³⁴ → A	Gly 45 Glu	EC1	Abe <i>et al.</i> , 2000
E47X	G ¹³⁹ → T	Glu 47 stop	EC1	Denoyelle <i>et al.</i> , 1997
E47K	G ¹³⁹ → A	Glu 47 Lys	EC1	Prasad <i>et al.</i> , 2000
167delT	del T nt 167	Frameshift	EC1	Zelante <i>et al.</i> , 1997
Q57X	C 169→ T	Gln 57 stop	EC1	Wilcox <i>et al.</i> , 1999
176-191del16	del 16 nt 176	Frameshift	EC1	Kudo <i>et al.</i> , 2000
C64X	C ¹⁹² → A	Cys 64 stop	EC1	AF Roux, PC

Quadro 4				
Mutações descritas no gene GJB2 relacionadas com surdez não-sindrômica e associadas ao padrão de herança autossômico recessivo				
(Continua)				
Mutação	Descrição	Efeito	Domínio	Referencia
Y65X	C ¹⁹⁵ → G	Tyr 65 Stop	EC1	Estivill <i>et al.</i> , 1998
W77R	T ²²⁹ → C	Trp 77 Arg	TM2	Carrasquillo <i>et al.</i> , 1997
W77X	G ²³¹ → A	Trp 77 Stop	TM2	Kelsell <i>et al.</i> , 1997
235delC	del C nt 233-235	Frameshift	TM2	Fuse <i>et al.</i> , 1999
L79P	T ²³⁶ → C	Leu 79 Pro	TM2	Hamelmann <i>et al.</i> , 2001
Q80X	C ²³⁸ → T	Gln 80 Stop	TM2	Hutchin, PC
Q80P	A ²³⁹ → C	Gln 80 Pro	TM2	Hilbert, PC
Q80R	A ²³⁹ → G	Gln 80 Arg	TM2	Uyguner <i>et al.</i> , 2003
I82M	C ²⁴⁶ → G	Ile 82 Met	TM2	Kupka <i>et al.</i> , 2002
V84L	G ²⁵⁰ → C	Val 84 Leu	TM2	Kelley <i>et al.</i> , 1998
S85P	T ²⁵³ → C	Ser 85 iPro	TM2	Park <i>et al.</i> , 2000
A88S	G ²⁶² → T	Ala 88 Ser	TM2	Frei <i>et al.</i> , 2002
L90V	C ²⁶⁸ → G	Leu 90 Val	TM2	Lynne HYet <i>et al.</i> , (PC)
L90P	T ²⁶⁹ → C	Leu 90 Pro	TM2	Murgia <i>et al.</i> , 1999
269insT	ins of T nt 269	Frameshift	TM2	Denoyelle <i>et al.</i> , 1999
M93I	G ²⁷⁹ → A	Met 93 Ile	TM2	Hutchin, PC
V95M	G ²⁸³ → A	Val 95 Met	IC2	Kelley <i>et al.</i> , 1998
Y97X	Não descrito	Tyr 97 Stop	IC2	L Perroni, PC
290-291insA	frameshift	frameshift	IC2	Mustapha <i>et al.</i> , 2001
H100Y	C ²⁹⁸ → T	His 100 Tyr	IC2	Green <i>et al.</i> , 1999
H100L	A ²⁹⁹ → T	His 100 Leu	IC2	Primignani <i>et al.</i> , (PC)
299-300delAT	del → AT nt 299	Frameshift	IC2	Abe <i>et al.</i> , 2000
302del3	del of AGA at 302	del Lys 102	IC2	Mueller <i>et al.</i> , 1999
E101G	A ³⁰² → G	Glu 101 Gly	IC2	Jun <i>et al.</i> , 2000
310del14	del 14 nt 314	Frameshift	IC2	Denoyelle <i>et al.</i> , 1997
312del14	del 14 nt 312	Frameshift	IC2	Denoyelle <i>et al.</i> , 1999
314del14	del 14 nt 310	Frameshift	IC2	Kelley <i>et al.</i> , 1998
333-334delAA	del AA nt 3-335	Frameshift	IC2	Kelley <i>et al.</i> , 1998
S113R	T ³³⁹ → G	Ser 113 Arg	IC2	Kelley <i>et al.</i> , 1998
delE120	del of GAG nt 360	del of Glu nt 119-120	IC2	Denoyelle <i>et al.</i> , 1999
K122I	A ³⁶⁵ → T	Lys 122 Ile	IC2	Green <i>et al.</i> , 1999
Q124X	C ³⁷⁰ → T	Gln 124 Stop	IC2	Scott <i>et al.</i> , 1998
R127H	G ³⁸⁰ → A	Arg 127 His	IC2	Seeman 2002, PC
W133X	G ³⁹⁸ → A	Trp 133 Stop	IC2	Primignani <i>et al.</i> , (PC)
Y136X	C ⁴⁰⁸ → A	Tyr 136 Stop	IC2	Fuse <i>et al.</i> , 1999
S139N	G ⁴¹⁶ → A	Ser 139 Gln	IC2	Marlin <i>et al.</i> , 2001
R143W	C ⁴²⁷ → T	Arg 143 Trp	TM3	Brobby <i>et al.</i> , 1998
E147K	G ⁴³⁹ → A	Glu 147 Lys	TM3	Murgia, PC
E147X	G ⁴³⁹ → T	Glu 147 Stop	TM3	Vijaya <i>et al.</i> , 2003 (PC)

Quadro 4				
Mutações descritas no gene GJB2 relacionadas com surdez não-sindrômica e associadas ao padrão de herança autossômico recessivo				
Mutação	Descrição	Efeito	Domínio	Referencia
469delG	del G 469	frameshift	EC2	Mueller <i>et al.</i> , 1999
486insT	ins T 486	Frameshift	EC2	Antoniadi (PC)
R165W	C ⁴⁹³ → T	Arg 165 Trp	EC2	Rickard <i>et al.</i> , 2001
504insAAGG	ins AAGG nt 504	Frameshift	EC2	Lin <i>et al.</i> , 2001
509insA	ins A 509	Frameshift	EC2	Denoyelle <i>et al.</i> , 1999
509del14	del 14 nt 509	Frameshift	EC2	Antoniadi (PC)
515del17	Del 17 nt 515	Frameshift	EC2	L Perroni (PC)
W172X	G ⁵¹⁶ → A	Trp 172 stop	EC2	Sartorato (PC)
C174R	T ⁵²⁰ → C	Cys 174 Arg	EC2	Primignani <i>et al.</i> , (PC)
P175T	C ⁵²³ → T	Pro 175 Thr	EC2	Denoyelle <i>et al.</i> , 1999
V178A	T ⁵³³ → C	Val 178 Ala	EC2	Hamelmann <i>et al.</i> , 2001
R184W	C ⁵⁵⁰ → G	Arg 184 Trp	EC2	Wilcox <i>et al.</i> , 2000
R184P	G ⁵⁵¹ → C	Arg 184 Pro	EC2	Denoyelle <i>et al.</i> , 1997
572delT	del T nt 572	frameshift	EC2	Murgia <i>et al.</i> , 1999
S199F	C ⁵⁹⁶ → T	Ser 199 Phe	TM4	Green <i>et al.</i> , 1999
605ins46	Ins 46 nt 605	Stop at aa 202	TM4	Yuge <i>et al.</i> , 2002
I203K	TC → AA nt 608	Ile 203 Lys	TM4	Hamelmann <i>et al.</i> , 2001
N206S	A ⁶¹⁷ → G	Gln 206 Ser	IC3	Kenna <i>et al.</i> , 2001
631delIGT	del GT nt 631-632	Frameshift	IC3	Kelley <i>et al.</i> , 1998
L214P	T ⁶⁴¹ → C	Leu 214 Pro	IC3	Hamelmann <i>et al.</i> , 2001
645- 648delTAGA	del TAGA nt 645	frameshift	IC3	Prasad <i>et al.</i> , 2000

Fonte: The connexin and deafness homepage

1.9.2 A MUTAÇÃO 35DELG (OU 30DELG)

A mutação 35delG resulta da deleção de um resíduo de guanina (G) de uma sequência de 6 (seis) G que se inicia a partir do nucleotídeo 30 até o nucleotídeo 35 na região codificadora do gene GJB2. Essa mutação resulta na mudança de uma Glicina para uma Valina no códon 12, constituindo um código prematuro de parada no códon 13 e culminando com a formação de uma proteína truncada (KELLEY, *et al.*, 1998; ZELANTE *et al.*, 1997).

Dentre as mutações já identificadas no gene GJB2, a mutação 35delG é considerada a mais frequente entre as causadoras de perda auditiva, sendo observada com maior frequência em pacientes caucasóides de origem européia (DENOYELLE *et al.*, 1997; GASPARINI *et al.*, 2000; LUCOTTE *et al.*, 2001).

Entre populações européias já estudadas, é possível observar a existência de um gradiente de frequências da mutação 35delG do sul para o norte, no qual altas taxas de frequências são particularmente mais frequentes em países do Sul, em relação ao Centro e ao Norte europeu (ESTIVILL *et al.*, 1998; GASPARINI *et al.*, 2000; ZELANTE *et al.*, 1997).

Diferentes taxas de frequência para a mutação 35delG associada à distribuição geográfica em populações do sul europeu, bem como das demais populações já estudadas no mundo, suportam a hipótese do Efeito do Fundador (RABIONET *et al.*, 2000). No caso de populações européias, é sugerida a hipótese de que a mutação 35delG é resultado de uma mutação ancestral que inicialmente teria se espalhado ao redor do Mar Mediterrâneo (GASPARINI *et al.*, 2000; KENNESON *et al.*, 2002; ROTHROCK *et al.*, 2003; VAN LAER *et al.*, 2001).

A mutação 35delG é observada em pacientes com surdez neurosensorial do tipo autossômica recessiva da Austrália, França, Israel, Itália, Líbano, Marrocos, Nova Zelândia, Espanha, Tunísia, Reino Unido e EUA, com frequências que variam entre 20% e 63% (ESTIVILL *et al.*, 1998; DENOYELLE *et al.*, 1997; KELLEY *et al.*, 1998; SCOTT *et al.*, 1998; LENCH *et al.*, 1998). A mutação 35delG também é observada em casos esporádicos de surdez, acometendo 33% de pacientes surdos da Itália e Espanha (ESTIVILL *et al.*, 1998) e aproximadamente 10% dos casos na Bélgica e Reino Unido (LENCH *et al.*, 1998). Dados mais recentes apontam como 82,8% a frequência da mutação 35delG entre indivíduos surdos na República Tcheca (SEEMAN *et al.*, 2004). No entanto, a mutação 35delG não é observada entre crianças japonesas com deficiência auditiva (ABE *et al.*, 2000; KUDO *et al.*, 2000), esta mutação também não é observada entre negros americanos (MORELL *et al.*, 1998) e na

população de Ghana (HAMELMANN *et al.*, 2001), e raramente é observada entre populações asiáticas (PARK *et al.*, 2000).

A frequência relativa desta mutação em pacientes com surdez congênita (casos familiares e esporádicos) tem sido estimada em 40% (ESTIVILL *et al.*, 1998), o que é considerada elevada em relação à alta heterogeneidade sugerida para este distúrbio (MOTTA *et al.*, 2011).

No Brasil, os dados obtidos sobre a frequência da mutação 35delG restringem-se em poucos trabalhos publicados na região sudeste do país. Sartorato *et al* (2000) analisaram de forma randômica 620 recém-nascidos e demonstram que esta mutação apresenta frequência um pouco menor do que 1% (0,97%). Um outro estudo, do mesmo grupo de pesquisa, demonstrou que a frequência da mutação 35delG em indivíduos caucasóides com audição normal da região sudeste brasileira é da ordem de 2% (Oliveira *et al.*, 2004), frequência similar à média de outras populações européias (GASPARINI *et al.*, 2000).

1.9.3 AS MUTAÇÕES 167DEL T E 253DELC

A mutação 167delT consiste de uma deleção de um resíduo de timina do nucleotídeo 167, na região codificadora do gene GJB2 que cria uma cadeia de terminação prematura da conexina 26 no códon 81 desse gene. (ZELANTE *et al.*, 1997).

A mutação 167delT foi originalmente descrita em populações de origem Mediterrânea que apresentavam frequência de 2.3% desta mutação (ZELANTE *et al.*, 1997). Morell *et al.* (1998) descreveram esta mutação comum entre judeus americanos de origem Ashkenazi, apresentando taxas de frequências acima de 4%. No entanto, a frequência desta mutação entre Judeus Ashkenazi nativos com surdez não-sindrômica apresenta-se na ordem de 2,78% (SOBE *et al.*, 1999). Estes resultados sugerem um Efeito Fundador e de origem compartilhada entre Palestinos e Israelenses em função da observação de um haplótipo conservado flanqueando este loci (SHAHIN *et al.*, 2002). Além disso, as altas taxas de frequências para esta mutação podem ser decorrentes da redução no tamanho populacional (Efeito de Gargalo de Garrafa) e/ou altas taxas de endogamia comum nestes grupos populacionais (MOTULSKY *et al.*, 1995).

A mutação 235delC consiste em uma deleção de um resíduo de Citosina no nucleotídeo 235 na região codificadora. Esta mutação está localizada no segundo domínio

trans-membrana, culmina com um erro de leitura e à terminação prematura da cadeia no códon 79, resultando em uma molécula truncada de conexina 26 (FUSE *et al.*, 1999).

Em populações asiáticas a mutação 235delC (ou 233delC) é a mais freqüente de todas as mutações do gene GJB2 (ABE *et al.*, 2000; FUSE *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2000). Na população japonesa e na população chinesa a mutação 235delC é responsável por 50% a 70% de todos os alelos mutados do gene da conexina 26. Nessas populações a mutação está sempre associada ao fenótipo da surdez neurossensorial não-sindrômica profunda, ao nascimento (LIU *et al.*, 2002; MATSUSHIRO *et al.*, 2002).

Wang *et al.* (2002) descreveram a mutação 235delC como responsável por 57% dos alelos mutantes em Taiwan. A hipótese de uma única origem ancestral para a mutação 235delC e a prevalência desta em populações asiáticas, baseia-se em estudos de haplótipos (LIU *et al.*, 2002) e na observação do mesmo espectro de mutações e polimorfismos no gene GJB2 entre japoneses e coreanos (OHTSUKA *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar mutações no gene *GJB2* como fator genético determinante na causa da surdez, em uma amostra constituída de 30 (trinta) indivíduos com deficiência auditiva neurossensorial não sindrômica de grau moderado a profundo da população de Belém do Pará.

2.2 Objetivos Específicos

Realizar o sequenciamento direto da região codificadora do gene *GJB2* em todos os 30 (trinta) indivíduos da amostra;

Verificar a frequência de mutações no gene *GJB2* na amostra estudada;

Investigar a presença de novas mutações e suas frequências que possam ser responsáveis pela surdez hereditária nestes pacientes;

Estabelecer um protocolo específico que torne o diagnóstico molecular mais fácil e econômico, o qual possa ser utilizado no aconselhamento genético familiar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostra Estudada

A amostra estudada foi constituída de 30 (trinta) indivíduos com deficiência auditiva neurossensorial não sindrômica de grau moderado à profundo provenientes da Clínica Integrada de Fonoaudiologia da UNAMA, UEES Prof. Astério de Campos, Igreja Assembléia de Deus (templo central) e Universidade Vale do Acaraú (UVA), localizados no município de Belém no Estado do Pará.

3.2 Avaliação Clínica

A avaliação clínica foi realizada em todos os 30 (trinta) indivíduos da amostra e teve como principal objetivo excluir possíveis fatores ambientais relacionados à etiologia da surdez e possíveis distúrbios associados como: visual, psicológico e neurológico. Além disso, o quadro de saúde geral de cada indivíduo e antecedentes familiares foram investigados na tentativa de exclusão de qualquer outro fator que pudesse interferir nos resultados desse estudo. Utilizamos como critério de inclusão ou exclusão no estudo a aplicação do questionário de estudo genético (anexo I). A avaliação clínica foi constituída por:

Exame Otorrinolaringológico: Otoscopia, Rinoscopia e Oroscopia

Audiometria Tonal

Audiometria Vocal

Imitanciometria

Emissões Otoacústicas

Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico (PEATE).

Os exames audiológicos foram realizados em parceria com o Centro de Diagnósticos Dr. Murillo Lobato- CMML, localizado na cidade Nova IV- PA. Dos 30 indivíduos da

amostra, 20 realizaram parte ou a completa avaliação auditiva neste Centro. Outros indivíduos já possuíam alguma avaliação auditiva realizada em outras clínicas, as quais foram consideradas no presente estudo. Os participantes foram submetidos aos seguintes procedimentos: entrevista inicial; inspeção visual do meato acústico externo; medidas de imitância acústica; audiometria tonal liminar (ATL) e logaudiometria; emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção (EOEPD); e avaliação do potencial evocado auditivo do tronco encefálico (PEATE).

A inspeção visual do meato acústico externo teve como objetivo verificar a eventual presença de impedimentos no mesmo, tais como, grande quantidade de cera e/ou corpos estranhos, obstruindo a passagem do som e impossibilitando a realização do protocolo de avaliação auditiva.

No presente estudo, a avaliação audiológica, realizada nos deficientes auditivos, constituiu-se de procedimentos que investigaram possíveis alterações desde a orelha média até o córtex cerebral, assim como, a caracterização do tipo e grau da perda auditiva de todos os indivíduos envolvidos na pesquisa.

De acordo com a avaliação clínica e exames audiológicos realizados, todos os indivíduos envolvidos na pesquisa apresentaram perda auditiva que variou de grau moderado a profundo, ausência de resposta na EOET e os dez (10/30) que realizaram o PEATE apresentaram ausência ou alteração das latências absolutas.

3.3 Extração de DNA

Foram colhidos 05 mL de sangue periférico e adicionado em um tubo de vacutainer com anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiaminotetraacético) de cada indivíduo. Em seguida, o material foi centrifugado a 3.000 rpm, por 15 minutos, para a separação das frações eritrocitárias, leucocitárias e plasmáticas para dar seguimento às análises. As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos, por meio do método convencional de extração com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol, de acordo com os métodos descritos por Sambrook *et al.*(1989).

3.4 Reação em cadeia pela Polimerase

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) propicia a amplificação de segmentos específicos de DNA a partir de um DNA molde. Para esta técnica, são utilizados iniciadores específicos que flanqueiam a região de interesse do DNA e possibilita a multiplicação em milhares de cópias de um determinado segmento do DNA.

3.4.1 Amplificação do gene *GJB2*

Os iniciadores utilizados para o sequenciamento do éxon 02 (éxon codificante) do gene *GJB2* foram desenhados no Laboratório de Genética Humana e Médica de UFPA (LGHM), utilizando o Programa Primer3 segundo Rozen *et al.* (2000).

Os iniciadores utilizados para o sequenciamento do éxon 2 (éxon codificante) do gene *GJB2* foram desenhados no Laboratório de Genética Humana e Médica de UFPA (LGHM), utilizando o Programa Primer3 segundo Rozen *et al.* (2000).

Um segmento de 780 pares de nucleotídeos foi amplificado, este contém toda a região codificadora do gene utilizando os iniciadores *GJB2-1F* e *GJB2-2R* (Quadro 5). A PCR foi realizada no termociclador Thermo Hybaid – PCR *Express* utilizando os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C. Os ciclos foram seguidos por uma extensão final de 5 minutos a 72°. O volume total da reação foi de 25 µL contendo 100 ng de DNA; 10 mM TRIS-HCL (pH 8,5); 50 mM MgCl₂; 1,25 mM de cada dNTP; 1,25 mM de cada iniciador e 0,2 U de Taq polimerase.

3.5 Sequenciamento do DNA

A estratégia utilizada neste trabalho foi a de sequenciar toda a região codificante do gene *GJB2*. Após a amplificação do DNA, este foi utilizado para o sequenciamento da região, com 780 pares de nucleotídeos; Utilizando os iniciadores *GJB2-1F* e *GJB2-2R* (Quadro 5).

QUADRO 5	
Seqüência de iniciadores utilizados para a amplificação e seqüenciamento do gene GJB2.	
PRIMER	SEQÜÊNCIA 5' →3'
GJB2- 1F	5' GTG TTG TGT GCA TTC GTC TTT TC 3'
GJB2- 2R	5' CCT CAT CCC TCT CAT GCT GTC TA 3'

A metodologia utilizada foi baseada na síntese bioquímica da cadeia de DNA utilizando bases terminadoras (dDNTP), de acordo com o método descrito por Sanger *et al.*, (1977) utilizando o *kit ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA)* e o Sequenciador Automático ABI-PRISM 377 - Applied Biosystem - pertencente ao Laboratório de Genética Humana e Médica.

O sequenciamento foi realizado em um volume final de 15 µL, contendo 2 µL do produto de amplificação; 2 µL, de Terminator Ready Reaction Mix; 0,2 mM de iniciador, 9 µL de água por 25 ciclos.

As amostras seqüenciadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 5%, durante 7 horas a 1000 volts, utilizando o seqüenciador ABI prism 377, DNA Sequencer da Applied Biosystems.

As seqüências nucleotídicas produzidas foram diretamente editadas em um computador Apple Macintosh G3 com a utilização do programa Sample Manager, acoplado ao ABI 377 DNA Sequencer. Essas seqüências foram exportadas para um computador PC-IBM para posteriores análises com a utilização do programa Chromas v2.3. As seqüências obtidas foram comparadas com a seqüência de referência (M86849; GI 4481752) de forma a identificar possíveis mutações em cada indivíduo analisado.

4. RESULTADOS

Entre os 30 pacientes investigados foram observados 06 (seis) indivíduos que apresentavam mutações no gene da Conexina 26 (GJB2), totalizando 20% dessa amostra. As mutações encontradas no presente trabalho já haviam sido previamente descritas na literatura e são as seguintes: 35delG, R143W, V27I e G160S, sendo as mutações 35delG e R143W, diretamente relacionadas com a deficiência auditiva neurosensorial (Tabela 1).

Tabela 1: Mutações encontradas no gene *GJB2* e relacionadas com a deficiência auditiva neurosensorial não- síndrômica de origem genética.

Mutação	Descrição	Nº de Indivíduos Com Mutação	Alelos Afetados	Domínio	Tipo de Mutação
35delG	Del Of G at 30-35	1	1	IC1	Frameshift ^{*1}
R143W	427 C ->T	1	1	TM3	Missense ^{*1}
V27I	79 G->A	4	5	TM1	Polimorfismo ^{*2}
G160S	478 G->A	1	1	EC2	Polimorfismo ^{*2}

*1 =Tem relação com a deficiência auditiva neurosensorial não síndrômica de origem genética.

*2= Não tem relação com a deficiência auditiva neurosensorial não síndrômica de origem genética.

A mutação 35delG no estado heterozigoto foi observada em 01 (um) paciente correspondendo a 3,3% dos alelos mutados (1/30) e relacionados com a etiologia da surdez na amostra. De acordo com os resultados audiológicos o indivíduo apresentou audiograma compatível com perda auditiva neurosensorial de grau profundo, ausência de EOET e latências alteradas no PEATE (anexo2).

A Figura 8 representa o eletroferograma de um indivíduo com a mutação 35delG, no estado heterozigoto. A seta aponta para o ponto da mutação e início da mudança na matriz de leitura de sequência após a deleção do nucleotídeo. A Figura 9 representa o eletroferograma de um indivíduo sem a mutação 35delG.

Figura 8 - Eletroferograma da mutação 35delG no estado heterozigoto.

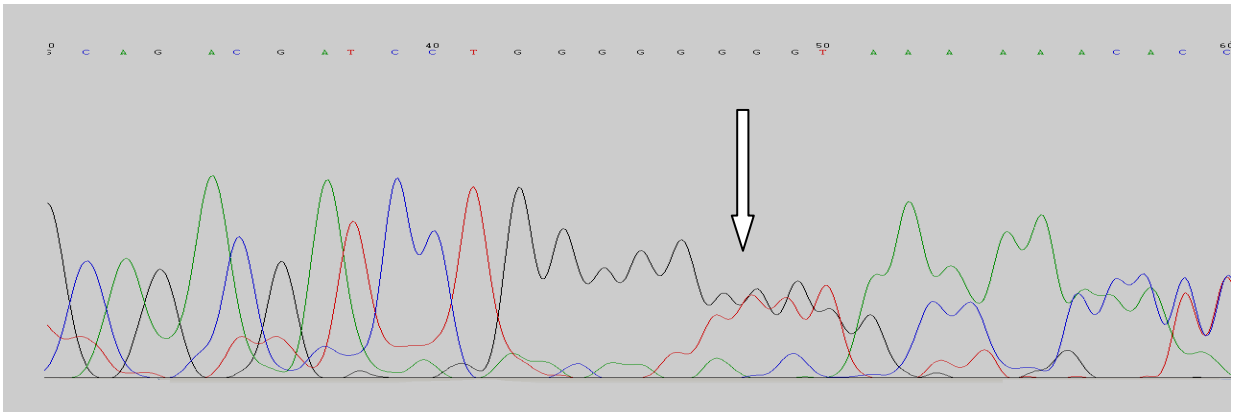
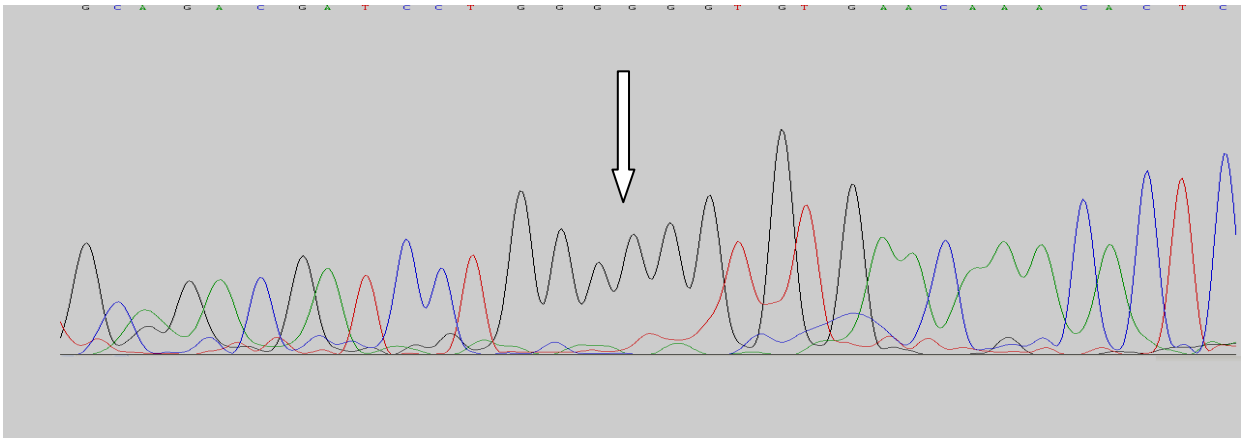


Figura 9 - Eletroferograma de um indivíduo sem a mutação 35delG.



No mesmo indivíduo com a mutação 35delG, foi observada a mutação R143W (Arg 143 Trp) no estado de heterozigose.

A Figura 10 representa o eletroferograma de um indivíduo com a mutação R143W, no estado heterozigoto. A seta aponta para uma sobreposição de dois picos de timina e de citosina, que caracterizam o estado de heterozigose da amostra. A Figura 11 representa o eletroferograma de um indivíduo sem a mutação R143.

Figura 10 - Eletroferograma da mutação R143W no estado heterozigoto

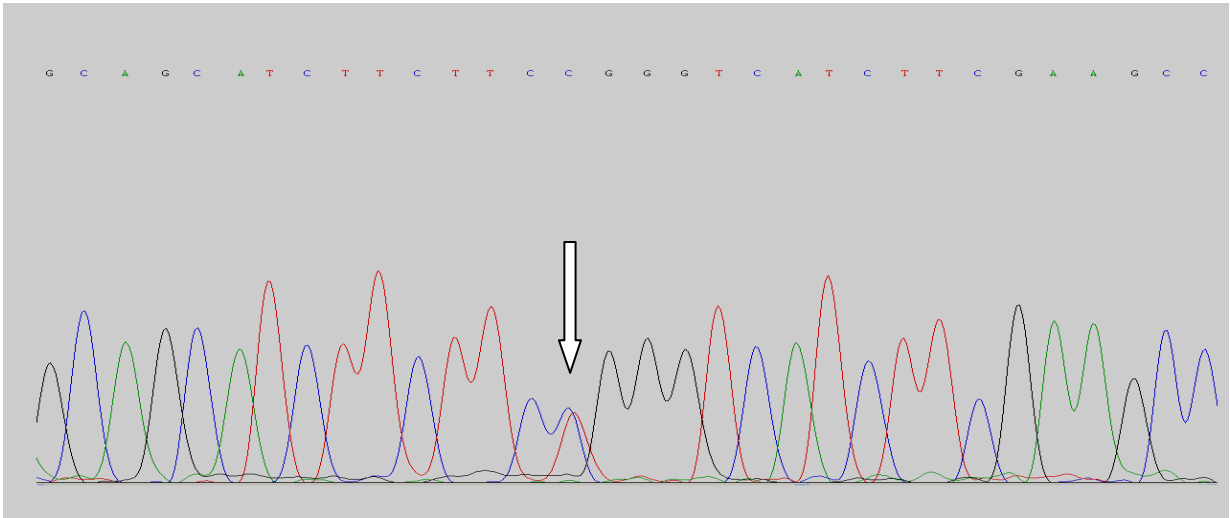
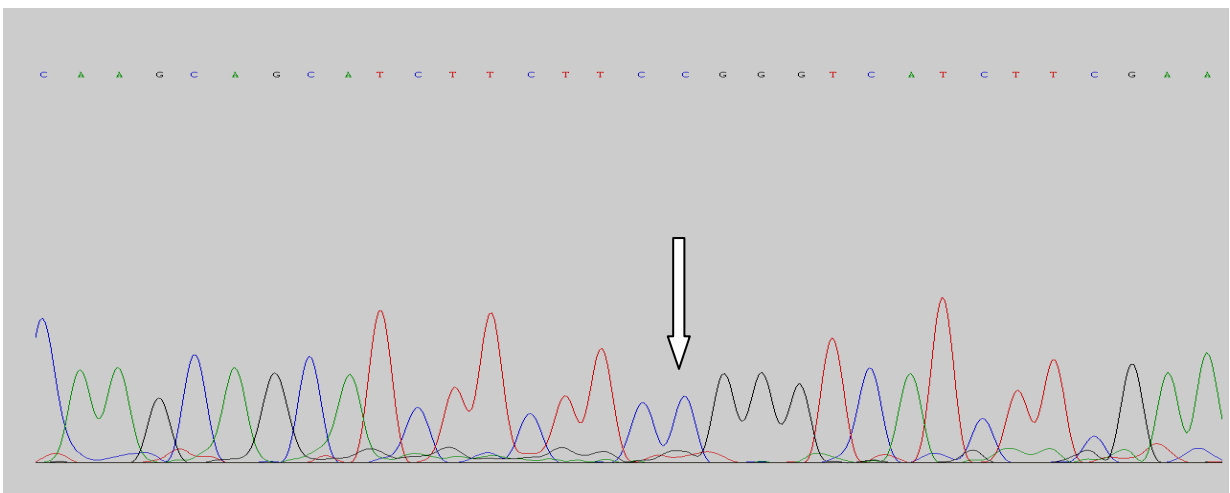


Figura 11 – Eletroferograma de um indivíduo sem a mutação R143W.



As mutações G160S e V271 foram observadas em diferentes indivíduos, no estado heterozigoto.

A Figura 12 representa o eletroferograma de um indivíduo com a mutação G160S, no estado heterozigoto. A seta aponta para uma sobreposição de dois picos de Adenina e de Guanina, que caracterizam o estado de heterozigose da amostra. A Figura 13 representa o eletroferograma de um indivíduo sem a mutação.

Figura 12 – Eletroferograma de um indivíduo com a mutação G160S.

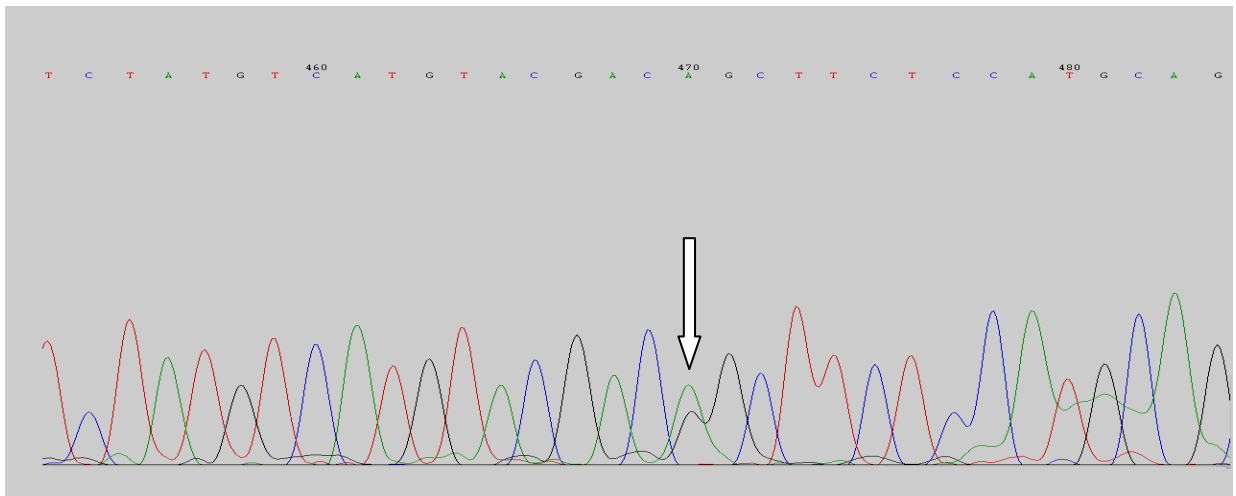
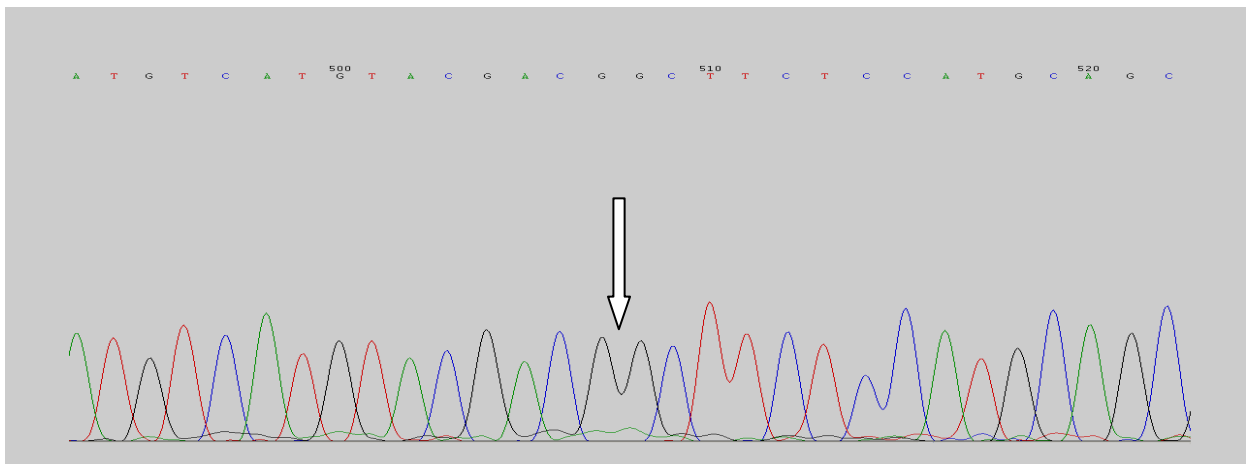


Figura 13 – Eletroferograma de um indivíduo sem a mutação G160S.



A mutação V27I (Val27Ile) foi a mais prevalente na amostra investigada sendo observada em quatro (4) pacientes, sendo um (1) paciente com o genótipo homocigoto e três indivíduos com o genótipo heterocigotos. A frequência alélica para essa mutação foi de 0.08.

A Figura 14 representa o eletroferograma de um indivíduo com a mutação V27I, no estado heterocigoto. A seta aponta para uma sobreposição de dois picos de Adenina e de Guanina, que caracterizam o estado de heterocigose da amostra. A Figura 15 representa o eletroferograma de um indivíduo com a mutação V27I em homocigose. A seta aponta para a troca de uma Guanina por uma Adenina no nucleotídeo 79 da sequência codificadora do gene GJB2.

Figura 14 – Eletroferograma de um indivíduo com a mutação V27I no estado heterozigoto.

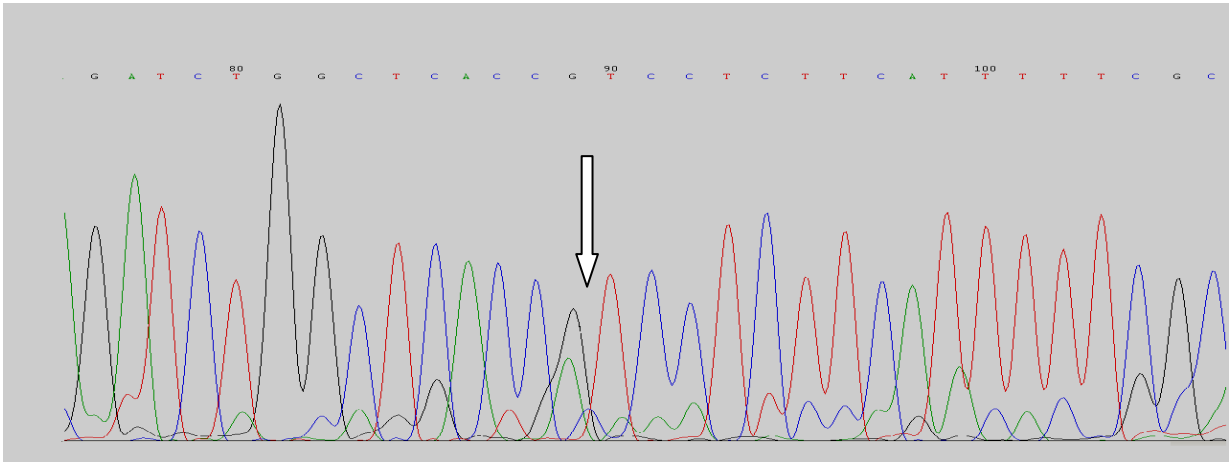


Figura 15 – Eletroferograma de um indivíduo com a mutação V27I no estado homozigótico.

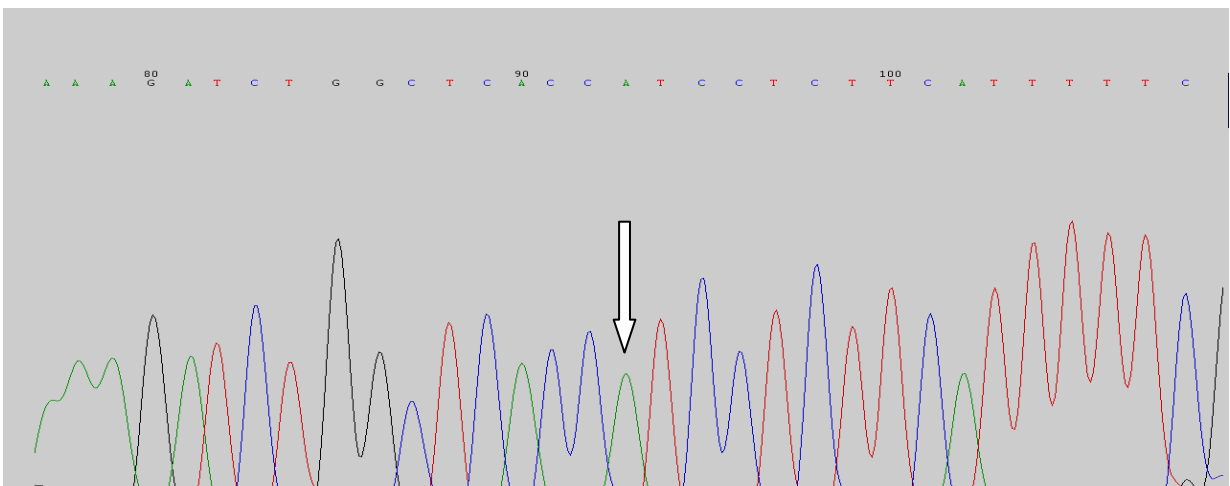
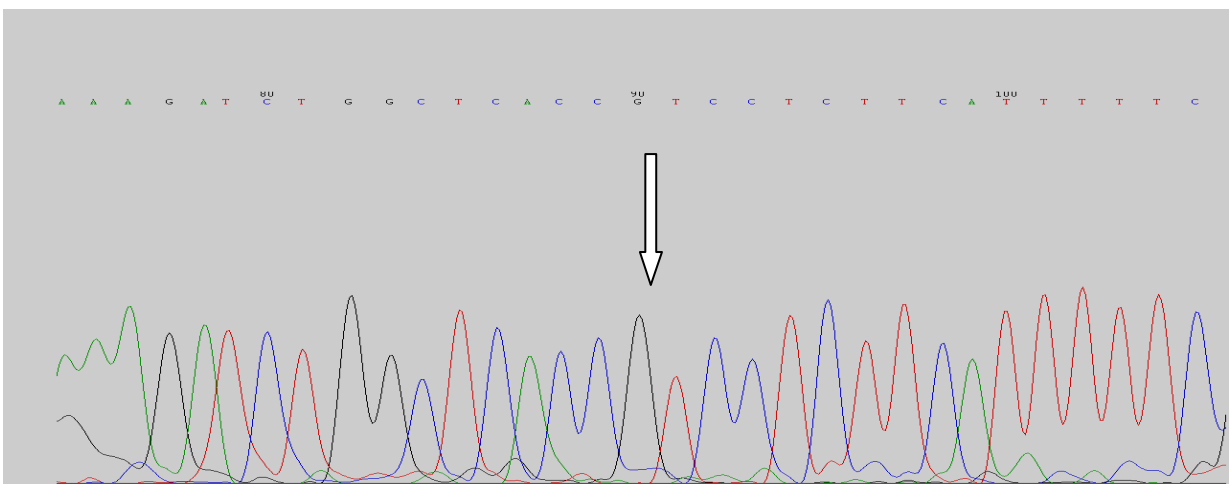


Figura 16 – Eletroferograma de um indivíduo sem a mutação V27I.



Os resultados observados para as quatro mutações foram combinados na forma de “háplótipos” na tentativa de associar essas combinações com um provável efeito fenotípico para a doença.

A investigação dessas combinações genotípicas associadas a surdez em 30 indivíduos (60 cromossomos) está demonstrada na Tabela 2, sendo a combinação genotípica dos alelos selvagens, isto é que apresenta o fenótipo normal aquele que apresenta a maior frequência encontrada na amostra (88%).

Tabela 2- Distribuição de frequências genotípicas para as mutações 35delG, V27I, G160S e R143W encontradas no gene *GJB2*, em 30 indivíduos com surdez do estado do Pará.

<i>Mutações</i>	35delG	V27I	G160S	R143W		
Mod. Amin.**	Gly250NA	Val27Ile	NÃO	Arg143trp		
Freq. Total	0,02	0,08	0,02	0,02		
Haplótipos	35delG	G79A	G478A	C427T	Frequência	Fenótipo
2222	G	G	G	C	0,88	Normal
2221	-	-	-	T	0,09	Patogênico
2122	-	A	-	-	0,02	Normal
1212	delG	-	A	-	0,01	Patogênico

** Modificação do aminoácido

5. DISCUSSÃO

O gene GJB2 que codifica a conexina 26 é responsável por mais da metade das deficiências auditivas de origem genética não sindrômica, com o padrão de herança do tipo autossômico recessivo. Em todo o mundo, diferentes mutações nesse gene podem levar a surdez irreversível, variando quanto ao seu grau em moderado à profundo. A surdez não sindrômica é considerada um distúrbio patológico altamente heterogêneo e até o presente estudo, aproximadamente 100 loci e 50 diferentes genes já foram descritos como causadores ou relacionados à perda auditiva (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Mutações patogênicas no gene GJB2 divergem substancialmente entre populações, como reflexo de mutações específicas entre diferentes grupos étnicos. A mutação 35delG é a principal mutação patogênica responsável por casos de surdez não- sindrômica com herança do tipo autossômica recessiva e sua frequência varia consideravelmente entre diferentes grupos populacionais (Gasparini *et al.*, 2000). Em populações européias, a mutação 35delG mostra-se como a mais prevalente. (GREEN *et al.*, 1999 e MOTTA *et al.*, 2011). Outra mutação também observada como patogênica é a R143W, sendo observada entre grupos africanos e asiáticos (PALMADA *et al.*, 2005 e HAMELMANN *et al.*, 2001).

Ambas mutações (35delG e R143W) foram observadas com igual frequência no presente trabalho (3,3%). Em um único indivíduo foi observada as duas mutações no estado de heterozigose. Essas mesmas mutações, foram previamente identificadas e descritas na literatura em indivíduos deficientes auditivos da região sudeste brasileira (OLIVEIRA *et al.* 2002 e BELINTANI PIATTO *et al.* 2004)

Os polimorfismos G160S e V27I também foram observados com frequências de 0,02 e 0,08 respectivamente, porém esses polimorfismos ainda não foram descritos com associação com a deficiência auditiva (ROSS 2007 *et al.* e Han *et al.* 2008).

De todas as mutações observadas neste trabalho, a mutação V27I é a mais frequente e apresenta frequência alélica de 0,08 que é considerada elevada e semelhante à frequência observada entre indivíduos surdos da população chinesa (SHI *et al.*, 2004). A mutação V27I corresponde à troca de uma Guanina por uma Adenina no nucleotídeo 79 da sequência codificadora do gene GJB2, está localizada no primeiro domínio transmembrana da proteína e induz a troca de Valina por Isoleucina no resíduo 27 da cadeia protéica (KELLEY *et al.*,1998)

A mutação V27I foi identificada originalmente em uma amostra de indivíduos normais de um grupo controle para a surdez não-sindrômica dos EEUU (KELLEY *et al.*, 1998) e raramente é observada em grupos populacionais Caucásicos (LOFFLER *et al.*, 2001; MCGUIRT e SMITH, 1999; LOPPONEN *et al.*, 2003). Entretanto, apresenta alta frequência entre indivíduos surdos e normais de origem asiática, como Chineses (SHI *et al.*, 2004); Japoneses (ABE *et al.*, 2000); Coreanos (PARK *et al.*, 2000) e populações com background asiático (Posukh *et al.*, 2005). A mutação V27I é considerada um simples polimorfismo e não tem relação com a perda auditiva (PALMADA *et al.*, 2005).

Dada à alta prevalência da mutação V27I neste trabalho, levantou-se a hipótese de que esta seria um polimorfismo comum e resultado da alta contribuição de genes ameríndios entre as populações do norte do Brasil (40% ameríndios, 50% europeus e 10% de genes africanos) (SANTOS e GUERREIRO, 1995). Na tentativa de responder esta questão, foi investigada a frequência desta mutação entre 400 indivíduos normais para a surdez não-sindrômica na população de Belém. Como resultado, foi observado uma alta frequência de 12.4% e semelhante à frequência encontrada na amostra de pacientes deste estudo (13,3%). Esse resultado corrobora com Abe *et al.* (2000), confirma a característica de polimorfismo da variante V27I e demonstra a origem ameríndia deste polimorfismo na amostra investigada. O polimorfismo V27I foi previamente identificado em dois indivíduos em um grupo de deficientes auditivos da região sudeste brasileiro (OLIVEIRA *et al.*, 2002). A alta frequência da V27I pode ser também, interpretada como resultado de fenômenos estocásticos como Efeito do Fundador e Deriva Genética.

Mutações no gene GJB2 foram observadas em 20% (6/30) dos pacientes. Entretanto, variantes patogênicas (35delG e R143) foram detectadas em 3,3% (1/30) da amostra e apresentam padrão de herança do tipo autossômico recessivo. Nossos resultados demonstram que a frequência de mutações patogênicas entre os casos esporádicos de surdez na região norte do Brasil é equivalente a frequência observada, também, de casos esporádicos de surdez na região sudeste brasileiro (11.5%) (OLIVEIRA *et al.*, 2002)

Toda a região codificante do gene GJB2 foi sequenciado, no entanto, apenas um indivíduo apresentou mutação patogênica nessa região. Três possíveis explicações são sugeridas para este resultado: a surdez nesses indivíduos pode ser decorrente de mutações na região não codificante do gene e não analisada neste trabalho; efeito digênico relacionado a outros genes codificadores de Junções Comunicantes do tipo Gap (GJB3 e GJA1) expressos nas células ciliadas da cóclea que podem ter funcionalidade relacionada ou interação com o

gene GJB2 (LIU *et al.*, 2000, 2001); e a existência de genes modificadores (WILCOX *et al.*, 2000).

Em 24 indivíduos, não foi observada qualquer alteração molecular no gene da conexina 26. Nossos resultados não permitem nenhuma inferência precisa, mas não é possível excluir a possibilidade de que a surdez apresentada por alguns indivíduos neste grupo possa ser decorrente de mutações em regiões não analisadas ou genes até o momento não identificados. Não podemos excluir, ainda, processos infecciosos (toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, meningite, herpes, etc...) ocorridos durante a gestação e não identificados na avaliação clínica.

Ainda observam-se lacunas de dados na literatura sobre variantes do gene GJB2 em determinados grupos populacionais, como africanos. A caracterização destas populações é extremamente importante, já que pode determinar a prevalência de variantes e alelos específicos do gene GJB2 e, principalmente, servir de base em estudos entre grupos populacionais miscigenados, tal como a população brasileira.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo analisou o gene da CX26 em 30 (trinta) indivíduos com deficiência auditiva do tipo neurossensorial bilateral, pré-lingual, não síndrômica. Desta amostra, foram excluídos aqueles com relato de fatores ambientais sugestivos quanto à etiologia da deficiência.

A análise molecular do gene da Conexina 26 (GJB2) permitiu a identificação de mutações em 20% da amostra (6/30 pacientes). Neste trabalho, a frequência de mutações patogênicas (35delG e R143W) entre os casos esporádicos de surdez é da ordem de 3,3%, o que sugere o estudo da CX26 como um importante fator para a surdez idiopática em nossa região.

A frequência da V27I de 13,3%, entre o grupo de indivíduos com surdez, e de 12.4% entre indivíduos normais da população de Belém, confirma a característica de polimorfismo desta variante e demonstra a origem ameríndia deste polimorfismo na amostra investigada.

Neste trabalho, as frequências observadas de mutações são equivalentes a frequências observadas em outras populações anteriormente estudadas. Em relação aos casos nos quais apenas um alelo mutado no gene GJB2 foi detectado, sugerimos a hipótese de um efeito digênico associado com diferentes mutações em outros genes codificadores. Já que, é estimada a existência de aproximadamente 150 diferentes loci envolvidos na deficiência auditiva não síndrômica.

Os dados obtidos confirmaram a importância do estudo molecular do gene GJB2 em casos de perda auditiva neurossensorial não síndrômica bilateral profunda. Foi possível também, diagnosticar como genética a causa da surdez em 3,3 % (1/30) dos pacientes, possibilitando esclarecer a etiologia da surdez e o aconselhamento genético.

A elevada heterogeneidade da patologia pode, em parte, responder aos casos (24/30) em que nenhuma alteração molecular no gene GJB2 foi observada. Não se pode também excluir que a possibilidade da surdez apresentada por alguns indivíduos possa ser decorrente, principalmente, de fatores ambientais como processos infecciosos ocorridos durante a gestação ou nos primeiros meses de vida, que não foram identificados durante a triagem para a inclusão dos indivíduos na pesquisa.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, S; KATAGIRI, T; SAITO-HISAMINATO, A; USAMI, S; INOUE, Y; TSUNODA T and NAKAMURA, Y. (2003) Identification of CRYM as a candidate responsible for nonsyndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues. *Am J Hum Genet* 72(1):73-82.

ABE, S; USAMIM S; SHINKAWA, H.; KELLEY, P.M and KIMBERLING, W.J. (2000) Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J Med Genet.* 37: 41-3.

ADAMS, J. (2000) Immunolocalization of connexin 31 in the cochlea: p 127: 23rd ARO midwinter research meeting, Petersburg Beach, St. Petersburg Beach, FL, USA.

AHMED Z.M; RIAZUDDIN, S.; AHMAD, J.; BERNSTEIN, S.L; GUO, Y; SABAR, M.F; SIEVING, P; RIAZUDDIN, S.; GRIFFITH, A..J; FRIEDMAN, T.B; BELYANTSEVA, I.A. and Wilcox ER (2003) PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Hum Mol Genet* 15;12(24):3215-23. Epub 2003 Oct 21.

AHMED, Z.M; SMITH, T.N; RIAZUDDIN S, MAKISHIMA T, GHOSH M, BOKHARI S, MENON PS, DESHMUKH D, GRIFFITH AJ, RIAZUDDIN S, FRIEDMAN TB AND WILCOX ER (2002) Nonsyndromic recessive deafness DFNB18 and Usher syndrome type IC are allelic mutations of USH1C. *Hum Genet* 110(6):527-31. Epub 2002 May 3.

ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS J; RAFF, M; ROBERTS, K and WALTER, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell.* 4° ed. Garland Publishing, New York, Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>>

ALVES-SILVA, J; DA SILVA SANTOS, M; GUIMARAES, P.E; FERREIRA, A.C, BANDELT, H.J; PENA, S.D; and PRADO, V.F (2000) The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 67(2): 444-61.

ANTONIADI, T; RABIONET, R; KROUPIS, C; APERIS, G.A; ECONOMIDES, J; PETMEZAKIS, J; ECONOMOU-PETERSEN, E; ESTIVILL, X; and PETERSEN, M.B (1999) High prevalence in the Greek population of the 35delG mutation in the connexin 26 gene causing prelingual deafness. *Clin Genet* 55(5):381-2.

BADANO, J.L and KATSANIS, N. (2002) Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. *Nat Rev Genet* 3 (10):779-789.

BAMIOU, D-E; MUSIEK, FE; LUXON, LM. *Aetiology and clinical presentations of auditory processing disorders- a review.* *Arch Dis Child* 85: 361-365, 2001.

BALDO, M.V.C. (1999) Audição. In: Aires MM (eds) *Fisiologia.* 2nd ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 237-246.

BELINTANI PIATTO ,V;GOLONI BERTOLLO, E.M; SARTORATO, E.L and MANIGLIA, J.V. (2004) Prevalence of the GJB2 mutations and the del(GJB6-D13S1830) mutation in Brazilian patients with deafness. *Hear Res* 196(1-2): 87-93.

BERGOFFEN, J; SCHERER, S.S; WANG, S; SCOTT, M.O; BONE, L.J; PAUL, D.L; CHEN, K. LENSCH, M.W; CHANCE, P.F and FISCHBECK, K.H. (1993) Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262 (5142): 2039-42.

BERTOLLO, L.A.C; TAKAHASHI, C.S and MOREIRA-FILHO, O.(1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev Bras Genet* 1:103-120.

BESPALOVA, I.N; VAN CAMP, G; BOM, S.J; BROWN, D.J; CRYNS, K. DEWAN, A.T; ERSON, A.E; FLOTHMANN, K; KUNST, H.P; KURNOOL, P; SIVAKUMARAN, T.A; CREMERS, C.W; LEAL, S.M; BURMEISTER, M. and LESPERANCE, M.M(2001) Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Hum Mol Genet* 15;10(22):2501-8.

BORK, J.M; PETERS, L.M; RIAZUDDIN, S; BERNSTEIN, S.L, AHMED, Z.M; NESS, S.L; POLOMENO, R; RAMESH, A; SCHLOSS, M; SRISAILPATHY, C.R; WAYNE, S; BELLMAN, S; DESMUKH, D; AHMED, Z; KHAN, S.N; KALOUSTIAN, V.M; LI, X.C; LALWANI, A; RIAZUDDIN, S; BITNER- GLINDZICZ, M; NANCE, W.E; LIU, X.Z, WISTOW, G; SMITH, R.J; GRIFFITH, A.J; WILCOX, E.R; FRIEDMAN, T.B and MORELL, R.J (2001) 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. Epub 2000 Nov21.

BROBBY, G.W; MULLER-MYHSOK, B. and HORSTMANN, R.D.(1998) Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *N Engl J Med* 19;338(8):548-50

BRUZZONE, R; WHITE, T.W and PAUL, D.L.(1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 15 (238):1-27.

CARRASQUILLO, M.M; ZLOTOGORA, J; BARGES, S and CHAKRAVARTI, A.(1997) Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. *Hum Mol Genet* 6 (12): 2163-72.

CHAIB, H; LINA-GRANADE, G; GUILFORD, P; PLAUCHU, H; LEVILLIERS, J; MORGON, A.and PETIT, C. (1994) A gene responsible for a dominant form os neurosensory non-syndromic deafness maps to the NSRD1 recessive deafness gene interval. *Hum Mol Genet* 3: 2219-2222.

COHEN, M.M and GORLIN, R.J. (1995) Epidemiology, etiology, and genetic patterns In Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM (eds) *Hereditary Hearing Loss and its Syndromes*. Oxford University Press, New York, p. 9-21.

Connexins and deafness Homepage, <http://www.crg.es/deafness>. COTRAN, R.S; KUMAR, V. and ROBBINS, S.L.(2000) *Patologia Estrutural e Funcional*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 418 pp.

CUCCI, R.A; PRASAD, S; KELLEY, P.M; GREEN, G.E; STORM, K; WILLOCX, S; COHN, E.S; VAN CAMP, G. and SMITH, R.J. (2000) The M34T allele variant of connexin 26. *Genet Test* 4(4),335-44.

DALAMON, V; BEHERAN, A; DIAMANTE, F; PALLARES, N; DIAMANTE V and ELGOYHEN, A.B. (2005) Prevalence of GJB2 mutations and the del(GJB6-D13S1830) in Argentinean non-syndromic deaf patients. *Hear Res* 207(1-2):43-9.

DEL CASTILLO, I; VILLAMAR, M; MORENO-PELAYO, M.A; DEL CASTILLO, F.J; ALVAREZ, A; TELLERIA, D; MENENDEZ, I. and MORENO, F.(2002) A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 24;346(4):243-9.

DENOYELLE, F; LINA-GRANADE, G; PLAUCHU, H; BRUZZONE, R; CHAIB, H; LEVI-ACOBAS, F; WEIL, D. and PETIT, C.(1998) Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature* 393(6683): 319-20.

DENOYELLE, F; MARLIN, S; WEIL, D; MOATTI, L; CHAUVIN, P; GARABEDIAN, E.N. and PETIT, C. (1999) Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* 17;353(9161):1298-303.

DENOYELLE, F; WEIL, D; MAW, M.A, WILCOX, S.A; LENCH, N.J; ALLEN-POWELL, D.R; OSBORN, A.H; DAHL, H.H; MIDDLETON, A; HOUSEMAN, M.J; DODE, C; MARLIN, S; BOULILA-ELGAIED, A; GRATI, M; AYADI, H; BENARAB, S; BITOUN, P; LINA-GRANADE, G; GODET, J; MUSTAPHA, M; LOISELET, J; EL-ZIR, E; AUBOIS, A; JOANNARD, A. and PETIT, C.(1997) Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet.*6(12): 2173-7.

DONAUDY, F; FERRARA, A; ESPOSITO, L; HERTZANO, R; BEN-DAVID, O; BELL, R.E; MELCHIONDA, S; ZELANTE, L; AVRAHAM, K.B and GASPARINI, P.(2003) Multiple mutations of MYO1A, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet* 72(6):1571-7. Epub 2003 May 6.

DONAUDY, F. SNOECKX, R; PFISTER, M; ZENNER, H.P; BLIN, N; DI STAZIO, M; FERRARA, A; LANZARA, C; FICARELLA, R; DECLAU, F; PUSCH, C.M; NURNBERG, P; MELCHIONDA, S; ZELANT, L; BALLANA, E; ESTIVILL, X; VAN CAMP, G; GASPARINI, P. and SAVOIA, A.(2004) Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet* 74(4):770-6. Epub 2004 Mar 10.

EISEN, M.D; RYUGO, D.K. *Hearing molecules: contributions from genetic deafness* (2007). *Cell Mol Life Sci*, 64:566-80.

ESTIVILL, X; FORTINA, P; SURREY, S, RABIONET, R; MELCHIONDA, S; D'AGRUMA, L; MANSFIELD, E; RAPPAPORT, E; GOVEA, N; MILA, M; ZELANTE, L and GASPARINI, P.(1998) Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 351(9100): 394-8.

FELDMANN, D; DENOYELLE, F; LOUNDON, N; WEIL, D; GARABEDIAN, E.N; COUDERC, R; JOANNARD, A; SCHMERBER, S; DELOBEL, B; LEMAN, J; JOURNEL, H; CATROS, H; FERREC, C; DROUIN-GARRAUD, V; OBSTOY, M.F; MOATI, L; PETIT

C. and MARLIN, S. (2004) Clinical evidence of the nonpathogenic nature of the M34T variant in the connexin 26 gene. *Eur J Hum Genet* 12(4): 279-84.

FIALHO, G; MATOS, T; CARIA, H; GALHARDO, I; DIAS, O; ANDREA V and CORREIA C. (2003) A novel M163L mutation in GJB2 gene associated with autosomal dominant isolated hearing loss. OASIS - Online Abstract Submission and Invitation System™ ©, Coe-Truman Technologies, Inc.

FINSTERER J; FELLINGER J. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing (2005). *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 69:621-47

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

FREI, K; SZUHAI, K; LUCAS, T; WEIPOLTSHAMMER, K; SCHOFER, C; RAMSEBNER R; BAUMGARTNER, W.D; RAAP, A.K; ITTNER, R; WACHTLER, F.J and KIRSCHHOFER, K. (2002) Connexin 26 mutations in cases of sensorineural deafness in eastern Austria. *Eur J Hum Genet* 10(7):427-32.

FRIEDMAN, L.M; DROR, A.A; AVRAHAM, K.B. Mouse models to study inner ear development and hereditary hearing loss (2007) .*Int J Dev Biol*, 51:609-31.

FUSE, Y; DOI, K; HASEGAWA, T; SUGII, A; HIBINO, H. and KUBO, T. (1999) Three novel connexin26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness. *Neuroreport* 23;10(9):1853-7.

GASPARINI, P; ESTIVILL, X; VOLPINI, V; TOTARO, A; CASTELLVI-BEL, S; GOVEA, N; MILA, M; DELLA MONICA, M; VENTRUTO, V; DE BENEDETTO, M; STANZIALE, P; ZELANTE, L; MANSFIELD, E.S; SANDKUIJL, L; SURREY, S. and FORTINA, P. (1997) Linkage of DFNB1 to non-syndromic neurosensory autosomal-recessive deafness in Mediterranean families. *Eur J Hum Genet* 5(2):83-8

GASPARINI, P; RABIONET, R; BARBUJANI, G; MELCHIONDA, S; PETERSEN, M; BRONDUM-NIELSEN, K; METSPALU, A; OITMAA, E; PISANO, M; FORTINA, P; ZELANTE, L and ESTIVILL, X.(2000) High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet* 1:19-23.

GENECARDS, www.genecards.org

GOODENOUGH, D.A; GOLIGER, J.A; PAUL, D.L.(1996) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem* 65: 475-502.

GREEN, G.E; SCOTT, D.A; MCDONALD, J.M; WOODWORTH, G.G; SHEFFIELD, V.C and SMITH, R.J.(1999) Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *JAMA* 16;281(23):2211-6.

GRIFA, A; WAGNER, C.A; D'AMBROSIO, L; MELCHIONDA S, BERNARDI F, LOPEZ-BIGAS N, RABIONET R, ARBONES M, MONICA MD, ESTIVILL X, ZELANTE L,

LANG F AND GASPARINI P (1999) Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet* 23(1):16-8.

GRIFFITH, A.J; CHOWDHRY, A.A; KURIMA, K; HOOD, L.J; KEATS, B; BERLIN, C.I; MORELL, R.J and FRIEDMAN, T.B. (2000) Autosomal recessive nonsyndromic neurosensory deafness at DFNB1 not associated with the compound-heterozygous GJB2 (connexin 26) genotype M34T/167delT. *Am J Hum Genet* 67(3): 745-9.

GUILFORD, P; BEN ARAB, S; BLANCHARD, S; LEVILLIERS, J; WEISSENBACH, J; BELKAHIA, A. and PETIT, C. (1994) A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat. Genet* 1: 24-28.

HAMELMANN, C; AMEDOFU, G.K; ALBRECHT, K; MUNTAU, B; GELHAUS, A; BROBBY, G.W and HORSTMANN, R.D. (2001) Pattern of connexin 26 (GJB2) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana. *Hum Mutat* 18(1):84-5.

Hereditary Hearing loss Homepage, <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh>

IBGE (2000) Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Recenseamento do Brasil. Rio de Janeiro.

ILIADES, T; ELEFThERIADES, N; ILIADOU, V; PAMPANOS, A; VOYIATZIS, N; ECONOMIDES, J; LEOTSAKOS, P; NEOU, P; TSAKANIKOS, M; ANTONIADI, T; KONSTANTOPOULOU, I; YANNOUKAKOS, D; GRIGORIADOU, M; SKEVAS, A; and PETERSEN, M.B. (2002) Prelingual nonsyndromic hearing loss in Greece. *Molecular and clinical findings. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 64(5):321-3.

ILVESARO, O. (2001) Attachment, polarity and communication characteristics of bone cells. Thesis, Faculdade de Medicina, Universidade de Oulu, Oulu Finlândia.

JUN, AI; MCGUIRT, W.T; HINOJOSA, R; GREEN, G.E; FISCHER-GHODSIAN, N.and SMITH, R.J. (2000) Temporal bone histopathology in connexin 26-related hearing loss. *Laryngoscope* 110(2 Pt 1):269-75.

KALATZIS, V. and PETIT, C. (1998) The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum. Mol. Genet* 7(10):1589-1597.

KATZ, J e TILLERY, K.L. - Uma introdução ao processamento auditivo. In: LICHTIG, I. e CARVALLO, R.M.M. - **Audição: Abordagens Atuais**. Carapicuíba, São Paulo, Pró-Fono, 1997.p. 145-72.

KELLEY, P. M; HARRIS D, J. and COMER, B. C. (1998) Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Med Genet* 62: 792-799.

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

KELSELL, D.P; DUNLOP, J; STEVENS, H.P; LENCH, N.J; LIANG, J.N; PARRY, G; MUELLER, R.F and LEIGH, I.M. (1997) Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 387(6628): 80-83.

KEMPERMAN, M.H; HOEFSLOOT, L.H. and CREMERS, C.W. (2002) Hearing loss and connexin 26. *J R Soc Med* 95 (4): 171-7.

KENNA, M.A; WU, B.L; COTANCHE, D.A; KORF, B.R and REHM, H.L. (2001) Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127(9):1037-42.

KENNESON, A; VAN NAARDEN BRAUN, K. and BOYLE, C. (2002) GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Genet Med* 4(4):258-74.

KIANG, D.T; JIN, N; TU, Z.J. and LIN, H.H. (1997) Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene*. 199 (1-2): 165-71.

KIKUCHI, T; ADAMS, J.C; MIYABE, Y; SO, E. and KOBAYASHI, T. (2000) Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microscv.* 33(2):51-6.

KIKUCHI, T; KIMURA, R.S; PAUL, D.L and ADAMS, J.C. (1995) Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat. Embryol* 191(2): 101-18.

KUBISCH C; SCHROEDER, B.C; FRIEDRICH, T; LUTJOHANN, B; EL-AMRAOUI, A; MARLIN, S; PETIT, C; and JENTSCH, T.J. (1999) KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 5;96(3):437-46.

KUDO, T; IKEDA, K; KURE, S; MATSUBARA, Y; OSHIMA, T; WATANABE, K; KAWASE, T; NARISAWA, K; TAKASAKA, T. (2000) Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population. *Am J Med Genet* 17;90(2):141-5.

KUMAR, N.M and GILULA, N.B. (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84(3): 381-8.

KUPKA, S; BRAUN, S; ABERLE, S; HAACK , B; EBAUER, M; ZEISSLER, U; ZENNER H.P; BLIN, N. and PFISTER, M. (2002) Frequencies of GJB2 mutations in German control individuals and patients showing sporadic non-syndromic hearing impairment. *Hum Mutat* 20(1):77-8.

KURIMA, K; PETERS, L.M; YANG, Y; RIAZUDDIN, S; AHMED, Z.M; NAZ, S; ARNAUD, D; DRURY, S; MO, J; MAKISHIMA, T; GHOSH, M; MENON, P.S; DESHMUKH, D; ODDOUX, C; OSTRER, H; KHAN, S; RIAZUDDIN, S; DEININGER, P.L; HAMPTON, L.L; SULLIVAN, S.L; BATTEY, J.F; JR KEATS, B.J; WILCOX, E.R; FRIEDMAN, T.B. and GRIFFITH, A.J. (2002) Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear haircell function. *Nat Genet* 30(3):277-84. Epub 2002 Feb 19.

LALWANI, A.K; GOLDSTEIN, J.A; KELLEY, M.J; LUXFORD, W; CASTELEIN, C.M and MHATRE, A.N.(2000) Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. *Am J Hum Genet* 67(5):1121-8. Epub 2000 Oct 9. Lautermann J, ten Cate WJ, Altenhoff P, Grummer R, Traub O, Frank H, Jahnke K and Winterhager E (1998) Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea. *Cell Tissue Res* 294(3): 415-20.

LEFEBVRE, P.P. and VAN DE WATER, T.R.(2000) Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain Res Brain Res Rev* 32(1): 159-62.

LENCH, N; HOUSEMAN, M; NEWTON, V; VAN CAMP, G. and MUELLER, R.(1998) Connexin- 26 mutations in sporadic non-syndromal sensorineural deafness. *Lancet* 351(9100): 415.

LENT, R.(2001) Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências. Editora Ateneu, São Paulo, pp 698.

LI, X.C; EVERETT, L.A; LALWANI, A.K; DESMUKH, D; FRIEDMAN, T.B; GREEN, E.D; WILCOX, E.R.(1998) A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet.* Mar;18(3):215-7.

LIN, D; GOLDSTEIN, J.A,;MHATRE, A.N; LUSTIG, L.R; PFISTER, M and LALWANI, A.K. (2001) Assessment of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) in screening for mutations in connexin 26 (GJB2). *Hum Mutat* 18(1):42-51.

LIU, X.Z; OUYANG, X.M; XIA, X.J; ZHENG, J; PANDYA, A; LI, F; DU, L.L; WELCH, K.O; PETIT, C; SMITH, R.J; WEBB, B.T; YAN, D; ARNOS, K.S; COREY, D; DALLOS, P; NANCE WE and CHEN, Z.Y.(2003) Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet* 15;12(10):1155-62.

LIU, X.Z; WALSH, J; TAMAGAWA, Y; KITAMURA, K; NISHIZAWA, M; STEEL, K.P and BROWN, S.D. (1997) Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nat Genet* 17(3):268-9

LIU, X.Z; XIA, X.J; ADAMS, J; CHEN, Z.Y; WELCH, K.O; TEKIN, M; OUYANG, X.M; KRISTIENSEN, A; PANDYA, A; BALKANY, T; ARNOS, K.S and NANCE, W.E. (2001) Mutations in GJA1 (connexin 43) are associated with non-syndromic autosomal recessive deafness. *Hum Mol Genet* 1;10(25):2945-51.

LIU, X.Z; XIA, X.J; KE, X.M; OUYANG, X.M; DU, L.L; LIU, Y.H; ANGELI, S; TELISCHI F.F; NANCE, W.E; BALKANY, T. and XU, L.R.(2002) The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population. *Hum Genet* 111; (4-5): 394-7.

LIU, X.Z; XIA, X.J; XU, L.R; PANDYA, A; LIANG, C.Y; BLANTON, S.H; BROWN, S.D; STEEL, K.P. and NANCE, W.E. (2000) Mutations in connexin31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet* 1;9(1):63-7.

LODISH, H; BERK, A; ZIPURSKY, S.L; MATSUDAIRA, P; BALTIMORE, D. and DARNELL, J.E.(2000) *Molecular Cell Biology*. 4^o ed. W. H. Freeman & Co., New York, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>>

LOFFLER, J; NEKAHM, D; HIRST-STADLMANN, A; GUNTHER, B; MENZEL, H.J; UTERMANN, G. and JANECKE, A.R. (2001) Sensorineural hearing loss and the incidence of Cx26 mutations in Austria. *Eur J Hum Genet* 9(3):226-30.

LOPPONEN, T; VAISANEN, M.L; LUOTONEN, M; ALLINEN, M; UUSIMAA, J. LINDHOLM, P; MAKI- TORKKO, E; VAYRYNEN, M; LOPPONEN, H. and LEISTI, J. (2003) Connexin 26 mutations and nonsyndromic hearing impairment in northern Finland. *Laryngoscope* 113(10):1758-63.

Lucotte G and Mercier G (2001) Meta-analysis of GJB2 mutation 35delG frequencies in Europe. *Genet Test* 5 (2): 149-52.

LYNCH, E.D; LEE, M.K; MORROW, J.E; WELCSH, P.L; LEON, P.E and KING, M.C. (1997) Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene diaphanous. *Science* 14;278(5341):1315-8.

MARLIN, S; GARABEDIAN, E.N; ROGER, G; MOATTI, L; MATHA, N; LEWIN, P; PETIT, C. and DENOYELLE, F.(2001) Connexin 26 gene mutations in congenitally deaf children: pitfalls for genetic counseling. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127(8):927-33.

MATSUSHIRO, N; DOI, K; FUSE, Y; NAGAI, K; YAMAMOTO, K; IWAKI, T; KAWASHIMA, T; SAWADA, A; HIBINO, H. and KUBO, T. (2002) Successful cochlear implantation in prelingual profound deafness resulting from the common 233delC mutation of the GJB2 gene in the Japanese. *Laryngoscope* 112(2): 255-61.

MAW, M.A; ALLEN-POWELL, D.R; GOODEY, R.J; STEWART, I.A; NANCARROW, D.J, HAYWARD, N.K and GARDNER, R.J.(1995) The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population. *Am J Hum Genet* 57(3): 629-635.

MBURU, P; MUSTAPHA, M; VARELA, A; WEIL, D; EL-AMRAOUI, A; HOLME, R.H; RUMP, A; HARDISTY, R.E; BLANCHARD, S; COIMBRA, R.S; PERFETTINI, I; PARKINSON, N; MALLON, A.M; GLENISTER, P; ROGERS, M.J; PAIGE, A.J; MOIR, L; CLAY, J; ROSENTHAL, A; LIU, X.Z; BLANCO, G; STEEL, K.P; PETIT, C. and BROWN, S.D.(2003) Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nat Genet* 34(4):421-8.

MCGUIRT, W.T. and SMITH, R.J.(1999) Connexin 26 as a cause of hereditary hearing loss. *Am J Audiol* 8(2):93-100.

MCGUIRT, W.T; PRASAD, S.D; GRIFFITH, A.J; KUNST, H.P; GREEN, G.E; SHPARGEL, K.B; RUNGE, C; HUYBRECHTS, C; MUELLER, R.F; LYNCH, E; KING, M.C; BRUNNER, H.G; CREMERS, C.W; TAKANOSU, M; LI, S.W; ARITA, M; MAYNE, R; PROCKOP, D.J; VAN CAMP, G. and SMITH, R.J. (1999) Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nat Genet* 23(4):413-9

MELCHIONDA, S; AHITUV, N; BISCEGLIA, L; SOBE, T; GLASER, F; RABIONET, R; ARBONES, M.L; NOTARANGELO, A; DI IORIO, E; CARELLA, M; ZELANTE, L; ESTIVILL, X; AVRAHAM, K.B and GASPARINI, P. (2001) MYO6, the human homologue

of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet* 69(3):635-40. Epub 2001 Jul 20.

MORELL, R.J; KIM, H.J; HOOD, L.J; GOFORTH, L; FRIDERICI, K; FISHER, R; VAN CAMP, G; BERLIN, C.I; ODDOUX, C; OSTRER, H; KEATS, B. and FRIEDMAN (1998) Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessiv deafness. *N Engl J Med* 39: 1500- 1505.

MORLE, L; BOZON, M; ALLOISIO, N; LATOUR, P; VANDENBERGHE, A; PLAUCHU H; COLLET, L; EDERY, P; GODET, J.and LINA-GRANADE, G. (2000) A novel C202F mutation in the connexin26 gene (GJB2) associated with autosomal dominant isolated hearing loss. *J Med Genet* 37(5):368-70.

MORTON, C.C. (2002) Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. *Hum Mol Genet* 15; 11(10): 1229-1240.

MOTTA, L. H. C; FELIX, T. M; SOUZA, L. T; LAVINSKY-WOLF, M; COSTA-MOTTA, F. M; FARIA, M, R; LAVINSKY, L. Prevalence of the 35delG mutation in deaf South Brazilian infants submitted to cochlear implantation. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 76 (2011) 287–290.

MOMENSOHN, S.T.M; DIAS, A.M. N, VALENTE, C.H. B; ASSAYAG, F.M. Anatomia e Fisiologia do órgão da Audição e do Equilíbrio. In MOMENSOHN-SANTOS, T. M e RUSSO, I.C.P.org. **Prática da Audiologia Clínica**. São Paulo: Cortez, 2005. p 11-44, p 291-310.

MOMENSOHN, S.T.M; RUSSO, I. C. P. BORGIANNI, L. M. B. Interpretação dos Resultados da Avaliação Audiológica . In MOMENSOHN-SANTOS, T. M e RUSSO, I.C.P.org. **Prática da Audiologia Clínica**. São Paulo: Cortez, 2005. p 291-310.

MOTULSKY, A.G. (1995) Jewish diseases and origins. *Nat Genet* 9(2):99-101.

MUELLER, R.F; NEHAMMER, A; MIDDLETON, A; HOUSEMAN, M; TAYLOR, G.R; BITNER-GLINDZCIZ, M; VAN CAMP, G; PARKER, M; YOUNG, I.D; DAVIS, A; NEWTON, V.E and LENCH, N.J. (1999) Congenital non-syndromal sensorineural hearing impairment due to connexin 26 gene mutations--molecular and audiological findings. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 15;50(1):3-13.

MURGIA, A; ORZAN, E; POLLI, R; MARTELLA, M; VINANZI, C; LEONARDI, E; ARSLAN, E; and ZACCHELLO, F.(1999) Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet* 36(11):829-32.

MUSTAPHA, M; SALEM, N; DELAGUE, V; CHOUERY, E; GHASSIBEH, M; RAI, M; LOISELET, J; PETIT, C. and MEGARBANE, A. (2001) Autosomal recessive non-syndromic hearing loss in the Lebanese population: prevalence of the 30delG mutation and report of two novel mutations in the connexin 26 (GJB2) gene. *J Med Genet* 38(10):E36.

MUSTAPHA, M; WEIL, D; CHARDENOUX, S; ELIAS, S; EL-ZIR, E; BECKMANN, J.S; LOISELET, J.and PETIT, C. (1999) An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified

autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum Mol Genet* 8(3):409-12.

NAZ, S; GIGUERE, C.M; KOHRMAN, D.C; MITCHEM, K.L; RIAZUDDIN, S; MORELL, R.J, RAMESH, A; SRISAILPATHY, S; DESHMUKH, D; RIAZUDDIN, S; GRIFFITH, A.J; FRIEDMAN, T.B; SMITH, R.J. and WILCOX, E.R. (2002) Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus. *Am J Hum Genet* 71(3):632-6. Epub 2002 Jul 24.

NAZ, S; GRIFFITH, A.J; RIAZUDDIN, S; HAMPTON, L.L; BATTEY, J.F.JR; KHAN, S.N; RIAZUDDIN, S; WILCOX, E.R and FRIEDMAN, T.B (2004) Mutations of ESPN cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction. *J Med Genet* 41(8):591-5.

OLIVEIRA, C.A; ALEXANDRINO, F; CHRISTIANI, T.V; STEINER, C.E; CUNHA, J.L.R; GUERRA, A.T.M; SARTORATO, E.L.(2007) Molecular genetics study of deafness in Brazil:8-year experience. *Am J Med Genet Part A* 143A:1574–1579.

OHTSUKA, A; YUGE, I; KIMURA, S; NAMBA, A; ABE, S; VAN LAER, L; VAN CAMP, G. and USAMI, S. (2003) GJB2 deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation. *Hum Genet* 112(4): 329-33.

OLIVEIRA, C.A; ALEXANDRINO, F; ABE-SANDES, K; SILVA, W.A JR; MACIEL-GUERRA, A.T; MAGNA, L.A and SARTORATO, E.L. (2004) Frequency of the 35delG mutation in the GJB2 gene in samples of European, Asian, and African Brazilians. *Hum Biol* 76(2):313-6.

OLIVEIRA, C.A; MACIEL-GUERRA, A.T and SARTORATO, E.L.(2002) Deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin26) gene in Brazilian patients. *Clinical Genetics* 61:354-358.

OUYANG, X.M; XIA, X.J; VERPY, E; DU, L.L; PANDYA, A; PETIT, C; BALKANY, T; NANCE, W.E and LIU, X.Z.(2002) Mutations in the alternatively spliced exons of USH1C cause non-syndromic recessive deafness. *Hum Genet* 111(1):26-30. Epub 2002 Jun 18.

PALMADA, M; SCHMALISCH, K.; BOHMER C; SCHUG, N; PFISTER, M; LANG, F; AND BLIN, N. (2005).Loss of function mutations of the GJB2 gene detected in patients with DFNB1-associated hearing impairment. *Neurobiology of Disease* 22 (2006) 112 – 118

PARK, H.J; HAHN, S.H; CHUN, Y.M; PARK, K. and KIM, H.N.(2000) Connexin26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss. *Laryngoscope* 110(9): 1535-8.

PARVING, A.(1999) Hearing screening: Aspects of epidemiology and identification of hearing impaired children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 49(1): 287-92.

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

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

PEREIRA, L.D.e ORTIZ, K.Z. (1997)- Desordem do processamento auditivo central e distúrbios da produção fonoarticulatória. In: LICHTIG, I. e CARVALLO, R.M.M. *Audição: Abordagens Atuais*. Carapicuíba, São Paulo, Pró- Fono, p. 173-86.

PETERS, L.M; ANDERSON, D.W; GRIFFITH, A.J; GRUNDFAST, K.M; SAN AGUSTIN, T.B; MADEO, A.C; FRIEDMAN, T.B and MORELL, R.J. (2002) Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28. *Hum Mol Genet* 1;11(23):2877-85.

PETIT, C; LEVILLIERS, J. and HARDELIN, J.P. (2001) Molecular Genetics of Hearing Loss. *Annu Rev Genet* 35: 589-646.

PHELAN, P. and STARICH, T.A.(2001) Innexins get into the gap. *Bioessays* 23(5): 388-96.

POSUKH, O; PALLARES-RUIZ, N; TADINOVA, V; OSIPOVA, L; CLAUSTRES, M. and ROUX, A.F.(2005) First molecular screening of deafness in the Altai Republic population. *BMC Med Genet* 24;6:12.

PRASAD, S; CUCCI, R.A; GREEN, G.E and SMITH, R.J.(2000) Genetic testing for hereditary hearing loss: connexin 26 (GJB2) allele variants and two novel deafness-causing mutations (R32C and 645-648delTAGA). *Hum Mutat* 16(6):502-8.

PRIMIGNIANI, P; SIRONI, F; DEGIORGIO, D; CURCIO, C; CASTORINA, P; AMBROSETTI, U; GARAVELLI, L. and COVIELLO, D.A.(2003) Neurosensory Non Syndromic Deafness: Analysis Of Connexins 26 And 30 In Italian Population. OASIS - Online Abstract Submission and Invitation System™, Coe-Truman Technologies, Inc.

PURVES, D; AUGUSTINE, G.J; FITZPATRICK, D.K; LAWRENCE, C; LAMANTIA, A; MCNAMARA, J.O and WILLIAMS, S. M. (2001) *Neuroscience*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland (MA), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>

RABIONET, R; LOPEZ-BIGAS, N; ARBONES, M.L and ESTIVILL, X.(2002) Connexin mutations in hearing loss, dermatological and neurological disorders. *Trends Mol Med* 8(5):205-12

RABIONET, R; ZELANTE, L; LOPEZ-BIGAS, N; D'AGRUMA, L; MELCHIONDA, S; RESTAGNO, G; ARBONES, M.L; GASPARINI, P. and ESTIVILL, X. (2000) Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet* 106(1): 40-44.

RESENDES, B.L, WILLIAMSON, R.E and MORTON, C.C.(2001) At the speed of sound: gene discovery in the auditory system. *Am J Hum Genet* 69(5): 923-935.

RIAZUDDIN, S; CASTELEIN, C.M; FRIEDMAN, T.B; LALWANI, A.K; LIBURD, N.A; NAZ, S; SMITH, T.N; RIAZUDDIN, S and WILCOX, E.R.(1999) A novel nonsyndromic

recessive form of deafness maps to 4q28 and demonstrates incomplete penetrance. *Am J Hum Genet* 65: 101.

RIAZUDDIN, S; KHAN, S.N; AHMED, Z.M; GHOSH, M; CAUTION, K; NAZLI, S; KABRA, M; ZAFAR, A.U; CHEN, K; NAZ, S; ANTONELLIS, A; PAVAN, W.J; GREEN, E.D; WILCOX, E.R; FRIEDMAN, P.L; MORELL, R.J; RIAZUDDIN, S and FRIEDMAN, T.B.(2006) Mutations in TRIOBP, which encodes a putative cytoskeletal-organizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness. *Am J Hum Genet* 78(1):137-43. Epub 2005 Nov 21.

RICKARD, S; KELSELL, D.P; SIRIMANA, T; RAJPUT, K; MACARDLE, B. and BITNER-GLINDZICZ, M. (2001) Recurrent mutations in the deafness gene GJB2 (connexin 26) in British Asian families. *J Med Genet* 38(8):530-3.

ROBERTSON, N.G and MORTON, C.C. (1999) Beginning of a molecular era in hearing and deafness. *Clin Genet* 55(3): 149-59.

ROBERTSON, N.G; LU, L; HELLER, S; MERCHANT, S.N; EAVEY, R.D; MCKENNA, M; NADOL, J.B JR; MIYAMOTO, R.T; LINTHICUM, F.H JR, LUBIANCA NETO, J.F; HUDSPETH, A.J; SEIDMAN, C.E; MORTON, C.C and SEIDMAN, J.G.(1998) Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet* 20(3):299-303.

ROSS, S.A; NOVAK, Z; KUMBLA, R.A; ZHANG, K; FOWLER, K.B; BOPANA, S. EL (2007). GJB2 and GJB6 mutations in children with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Res*. Jun;61(6): 687-91.

ROTHROCK, C.R; MURGIA, A; SARTORATO, E.L; LEONARDI, E; WEI, S; LEBEIS, S.L; YU, L.E; ELFENBEIN, J.L; FISHER, R.A and FRIDERICI, K.H. (2003) Connexin 26 35delG does not represent a mutational hotspot. *Hum Genet* 113(1):18-23.

ROUAN, F; WHITE, T.W; BROWN, N; TAYLOR, A.M; LUCKE, T.W; PAUL, D.L; MUNRO, C.S; UITTO, J; HODGINS, M.B and RICHARD, G.(2001) Trans-dominant inhibition of connexin-43 by mutant connexin-26: implications for dominant connexin disorders affecting epidermal differentiation. *J Cell Sci* 114(Pt 11):2105-13.

ROZEN, S. and SKALETSKY, H. (2000) Primer3, http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi

SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F; MANIATIS, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

SANTOS, N.P.C.; RIBEIRO- RODRIGUES E.M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.C.; PEREIRA, R.; GUSMÃO, L., AMORIM, L, AMORIM, A., GUERREIRO, J.F.; ZAGO, M.A.; MATTE, C.; HUTZ, M.H; SANTOS, S.E.B.(2010) Assessing Individual Interethnic Admixture and Population Substructure Using a 48-Insertion-Deletion (INDEL) Ancestry-Informative Marker (AIM) Panel. *Human Mutation*; 31(2): 184-190.

SANGER, F; NICKLEN, S and COULSON, A.R.(1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.

SANTOS, S.E.B. and GUERREIRO, J.F. (1995) The indigenous contribution to the formation of the population of the Brazilian Amazon region. *Rev. Bras. Genet.* 18(2), 311-315.

SARTORATO, E.L; GOTTARDI, E; OLIVEIRA, C.A; MAGNA, L.A; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M; SEIXAS, C.A. and MACIEL-GUERRA, A.T. (2000) Determination of the frequency of 35 deG allele in Brazilian Neonates. *Clin. Genet* 58: 339-340.

SCOTT, D.A; KRAFT, M.L; CARMİ, R; RAMESH, A; ELBEDOUR, K; YAİRİ, Y; SRISAILAPATHY, C.R; ROSENGREN, S.S; MARKHAM, A.F; MUELLER, R.F; LENCH, N.J; VAN CAMP, G; SMITH, R.J and SHEFFIELD, V.C. (1998) Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat* 11(5): 387-94.

SCOTT, D.A; KRAFT, M.L; STONE, E.M; SHEFFIELD, V. and SMITH, R.J.(1998) Connexin mutations and hearing loss. *Nature* 391(6662): 32.

SCOTT, H.S; KUDOH, J; WATTENHOFER, M; SHIBUYA, K; BERRY, A; CHRAST, R; GUIPPONI, M; WANG, J; KAWASAKI, K; ASAKAWA, S; MINOSHIMA, S; YOUNUS, F; MEHDI, S.Q; RADHAKRISHNA, U; PAPASAVVAS, M.P; GEHRIG, C; ROSSIER, C; KOROSTISHEVSKY, M; GAL, A; SHIMIZU, N; BONNE-TAMIR, B. and ANTONARAKIS, S.E.(2001) Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nat Genet* 27(1):59-63

SEEMAN, P; MALIKOVA, M; RASKOVA, D; BENDOVA, O; GROH, D; KUBALKOVA, M; SAKMARYOVA, I; SEEMANOVA, E. and KABELKA, Z. (2004) Spectrum and frequencies of mutations in the GJB2 (Cx26) gene among 156 Czech patients with pre-lingual deafness. *Clin Genet* 66(2):152-7.

SHABBIR, M.I; AHMED, Z.M; KHAN, S.Y; RIAZUDDIN, S; WARYAH, A.M; KHAN, S.N; CAMPS, R.D; GHOSH, M; KABRA, M; BELYANTSEVA, I.A; FRIEDMAN, T.B. and RIAZUDDIN, S. (2006) Mutations of human TMHS cause recessively inherited nonsyndromic hearing loss. *J Med Genet.* Feb 3.

SHAHIN, H; WALSH, T; SOBE, T; ABU SA'ED, J; ABU RAYAN, A; LYNCH, E.D; LEE, M.K; AVRAHAM, K.B; KING, M.C and KANAAN, M. (2006) Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet* 78(1):144-52. Epub 2005 Nov 21.

SHAHIN, H; WALSH, T; SOBE, T; LYNCH, E; KING, M.C; AVRAHAM, K.B; KANAAN, M. (2002) Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East. *Hum Genet* 110(3): 284-9.

SHI, G.Z; GONG, L.X; XU, X.H; NIE, W.Y; LIN, Q. and QI, Y.S.(2004)GJB2 gene mutations in newborns with non-syndromic hearing impairment in Northern China. *Hear Res* 197(1-2),19-23.

SHIELS, A; MACKAY, D; IONIDES, A; BERRY, V; MOORE, A. and BHATTACHARYA, S.(1998) A missense mutation in the human connexin50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant "zonular pulverulent" cataract, on chromosome 1q. *Am J Hum Genet.* 3(62): 526-32.

SMITH, R.J; BALE, J.F. JR and WHITE, K.R (2005). Sensorineural hearing loss in children. *Lancet* 5-11;365(9462),879-90.

SOBE, T; ERLICH, P; BERRY, A; KOROSTICHEVSKY, M; VREUDGE, S; AVRAHAM, K.B; BONNE- TAMMIR, B. and SHOHAT, M.(1999) High frequency of the deafness-associated 167 delT mutation in the connexin 26 (GJB2) gene in Israeli Ashkenazim. *Am J Med Genet* 86: 499-500.

SOBE, T; VREUGDE, S; SHAHIN, H; BERLIN, M; DAVIS, N; KANAAN, M; YARON, Y; ORR- URTREGER, A; FRYDMAN, M; SHOHAT, M. and AVRAHAM, K.B. (2000) The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum Genet* 106(1):50-7.

SOHL, G. and WILLECKE, K. (2003) An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes* 10;(4-6):173-80. Sosinsky GE (1996) Molecular organization of gap junction membrane channels. *J. Bioenerg. Biomembr* 28(4): 297-309.

SUNG-HEE HAN; HONG-JOON PARK; EUN-JOO KANG; JAE-SONG RYU; ANNA LEE; YOUNG-HO YANG; KYOUNG and RYUL LEE (2008). Carrier frequency of GJB2 (connexin-26) mutations causing inherited deafness in the Korean population. *J Hum Genet* 53:1022-1028.

UYGUNER, O; EMIROGLU, M; UZUMCU, A; HAFIZ, G; GHANBARI, A; BASERER, N; YUKSEL-APAK, M and WOLLNIK, B.(2003) Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet* 64(1):65-9.

VAHAVA, O; MORELL, R; LYNCH, E.D; WEISS, S; KAGAN, M.E; AHITUV, N; MORROW, J.E; LEE, M.K; SKVORAK, A.B; MORTON, C.C; BLUMENFELD, A; FRYDMAN, M; FRIEDMAN, T.B; KING, M.C and AVRAHAM, K.B. (1998) Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science* 20;279(5358):1950-4.

VAN CAMP, G; WILLEMS, P.J and SMITH, R.J. (1997) Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet* 60(4):758-764.

VAN LAER, L; COUCKE, P; MUELLER, R.F; CAETHOVEN, G; FLOTHMANN, K; PRASAD, S.D; CHAMBERLIN, G.P; HOUSEMAN, M; TAYLOR GR, VAN DE HEYNING, C.M; FRANSEN, E; ROWLAND, J; CUCCI, R.A; SMITH, R.J and VAN CAMP, G. (2001) A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet* 38(8): 515-8.

VAN LAER, L; HUIZING, E.H; VERSTREKEN, M; VAN ZUIJLEN, D; WAUTERS, J.G; BOSSUYT, P.J; VAN DE HEYNING, P; MCGUIRT, W.T; SMITH, R.J; WILLEMS, P.J;

LEGAN, P.K; RICHARDSON, G.P and VAN CAMP, G.(1998) Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5. *Nat Genet* 20(2):194-7.

VAN WIJK, E; KRIEGER, E; KEMPERMAN, M.H; DE LEENHEER, E.M; HUYGEN, P.L; CREMERS, C.W; CREMERS, F.P. and KREMER, H. (2003) A mutation in the gamma actin 1 (ACTG1) gene causes autosomal dominant hearing loss (DFNA20/26). *J Med Genet* 40(12):879-84.

VERHOEVEN, K; VAN LAER, L; KISRSCHHOFFER, K; LEGAN, P.K; HUGHES, D.C; SCHATTEMAN, I; VERSTREKEN, M; VAN HAUWE, P; COUCKE, P; CHEN, A; SMITH R.J; SOMERS, T; OFFECIERS, F.E; VAN DE HEYNING, P; RICHARDSON, G.P; WACHTLER, F; KIMBERLING, W.J; WILLEMS, P.J; GOVAERTS, P.J. and VAN CAMP, G.(1998) Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet* 19(1):60-2.

VERPY, E; MASMOUDI, S; ZWAENEPOEL, I; LEIBOVICI, M; HUTCHIN, T.P; DEL CASTILLO, I; NOUAILLE, S; BLANCHARD, S; LAINE, S; POPOT, J.L; MORENO, F; MUELLER, R.F. and PETIT, C. (2001) Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause nonsyndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nat Genet* 29(3):345-9.

WALSH, T; WALSH, V; VREUGDE, S; HERTZANO, R; SHAHIN, H; HAIKA, S; LEE, M.K; KANAAN, M; KING, M.C. and AVRAHAM, K.B. (2002) From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proc Natl Acad Sci U S A* 28;99(11):7518-23.

WANG, A; LIANG, Y; FRIDELL, R.A; PROBST, F.J; WILCOX, E.R; TOUCHMAN, J.W; MORTON, C.C; MORELL, R.J; NOBEN-TRAUTH, K; CAMPER, S.A and FRIEDMAN, T.B.(1998) Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science* 29;280(5368):1447-51.

WANG, Y.C; KUNG, C.Y; SU, M.C; SU, C.C; HSU, H.M; TSAI, C.C; LIN, C.C and LI, S.Y. (2002) Mutations of Cx26 gene (GJB2) for prelingual deafness in Taiwan. *Eur J Hum Genet* 10(8): 495-8.

WAYNE, S; ROBERTSON, N.G; DECLAU, F; CHEN, N; VERHOEVEN, K; PRASAD, S; TRANEBJARG, L; MORTON, C.C; RYAN, A.F; VAN CAMP, G. and SMITH, R.J. (2001) Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet* 1;10(3):195-200.

WEIL, D; KUSSEL, P; BLANCHARD, S; LEVY, G; LEVI-ACOBAS, F; DRIRA, M; AYADI, H. and PETIT, C. (1997) The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet* 16(2):191-3.

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

WILCOX, E.R; BURTON, Q.L; NAZ, S; RIAZUDDIN, S; SMITH, T.N; PLOPLIS, B; BELYANTSEVA, I; BEN-YOSEF, LIBURD NA, MORELL RJ, KACHAR B, WU DK, GRIFFITH AJ, RIAZUDDIN S AND FRIEDMAN TB (2001) Mutations in the gene

encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 12;104(1):165-72.

WILCOX, S.A; OSBORN, A..H; ALLEN-POWELL, D.R; MAW, M.A; DAHL, H.H;and GARDNER, R.J. (1999) Connexin26 deafness in several interconnected families. *J Med Genet* 36(5):383-5.

WILCOX, S.A; SAUNDERS, K; OSBORN, A.H; ARNOLD, A; WUNDERLICH, J; KELLY, T; COLLINS, V; WILCOX, L.J; MCKINLA,Y; GARDNER, R.J; KAMARINOS, M; CONE-WESSON B, WILLIAMSON, R. and DAHL, H.H.(2000) High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Hum Genet* 106(4): 399-405.

WILLECKE, K; EIBERGER, J; DEGEN, J; ECKARDT, D; ROMUALDI, A; GULDENAGEL, M; DEUTSCH, U. and SOHL, G. (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem* 383(5):725-37.

World Health Organization (WHO), 2006 <http://www.who.int/en/>

XIA, J.H; LIU, C.Y; TANG, B.S; PAN, Q; HUANG, L; DAI, H.P; ZHANG, B.R; XIE, W; HU, D.X; ZHENG, D; SHI, X.L; WANG, D.A; XIA, K; YU, K.P; LIAO, X.D; FENG, Y; YANG, Y.F; XIAO, J.Y; XIE, D.H and HUANG, J.Z. (1998) Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat Genet* 20(4):370-3.

YASUNAGA, S; GRATI, M; COHEN-SALMON, M; EL-AMRAOUI, A; MUSTAPHA, M; SALEM, N; EL- ZIR, E; LOISELET, J. and PETIT, C. (1999) A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet* 21(4):363-9.

YOUNG, T.L; IVES, E; LYNCH, E; PERSON, R; SNOOK, S; MACLAREN, L; CATER, T; GRIFFIN, A; FERNANDEZ, B; LEE, M.K. and KING, M.C.(2001) Non-syndromic progressive hearing loss DFNA38 is caused by heterozygous missense mutation in the Wolfram syndrome gene WFS1. *Hum Mol Genet* 15;10(22):2509-14.

YUGE, I; OHTSUKA, A; MATSUNAGA, T. and USAMI, S.(2002) Identification of 605ins46, a novel GJB2 mutation in a Japanese family. *Auris Nasus Larynx* 29(4):379-82.

ZELANTE, L; GASPARINI, P; ESTIVILL, X; MELCHIONDA, S; D'AGRUMA, L; GOVEA, N; MILA, M; MONICA, M.D; LUTFI, J; SHOHAT, M; MANSFIELD, E; DELGROSSO, K; RAPPAPORT, E; SURREY, S; FORTINA, P. (1997) Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 6(9): 1605-9.

ZHU, M; YANG, T; WEI, S; DEWAN, A.T; MORELL, R.J; ELFENBEIN, J.L; FISHER, R.A; LEAL, S.M; SMITH, R.J and FRIDERICI, K.H. (2003) Mutations in the gamma-actin gene (ACTG1) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26). *Am J Hum Genet* 73(5):1082-91. Epub 2003 Sep 16.

ZOLL, B; PETERSEN, L; LANGE, K; GABRIEL, P; KIESE-HIMMEL, C; RAUSCH, P; BERGER, J; PASCHE, B; MEINS, M; GROSS, M; BERGER, R; KRUSE, E; KUNZ, J;

SPERLING, K. and LACCONE, F. (2003) Evaluation of Cx26/GJB2 in German hearing impaired persons: mutation spectrum and detection of disequilibrium between M34T (c.101T>C) and -493del10. *Hum Mutat* 21(1): 98.

ZWAENEPOEL, I; MUSTAPHA, M; LEIBOVICI, M; VERPY, E; GOODYEAR, R; LIU, X.Z; NOUAILLE, S; NANCE, W.E; KANAAN, M; AVRAHAM, K.B; TEKAIA, F; LOISELET, J; LATHROP, M; RICHARDSON, G. and PETIT, C. (2002) Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9):6240-5. Epub 2002 Apr 23.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LABORATÓRIO DE GENÉTICA HUMANA E MÉDICA

Estudo genético-clínico de casos de surdez

Data: ____/____/____

1 Dados Pessoais

Nome: _____

Data de nascimento: _____ idade: _____ Sexo: M () F ()

Naturalidade: _____ Filiação: _____

Pai: _____ Naturalidade: _____

Mãe: _____ Naturalidade: _____

Endereço: _____

E-mail: _____

Telefone: _____

Origem do paciente: _____

2 Histórico Familiar

Consangüinidade parental: sim não Grau:

Outros casos de surdez na família: sim não

Casos de doenças genéticas na família: sim não

Consulente já teve abortos: sim não

3 Caracterização do tipo de surdez

Bilateral Unilateral Estacionária Progressiva

Leve (26-40 DB) Moderada (41- 70 DB) severa (71-90 DB) Profunda (> 90 DB)

Condutiva Neurosensorial Mista

Etiologia: Congênita Pós-natal Idade de início:

Época em que perceberam o problema: _____ Época em que foi feito o diagnóstico de surdez: _____

4 Gestação

normal com problemas fez pré-natal Infecções maternas: sim não

CMV Rubéola Toxoplasmose Sífilis Herpes

outras doenças ou sintomas: _____

Uso de remédios durante a gestação: sim não Quais:

Raio X na gestação: sim não

Observações: _____

5 Período perinatal

normal com problemas Parto: normal cesárea fórceps
 Peso ao nascer: _____ Comprimento ao nascer: ____

Boas condições de vitalidade: sim não

Anóxia Cianose Icterícia Incompatibilidade de Rh

Fototerapia Incubadora Febre alta defeitos físicos

Saiu do hospital com a mãe: sim não

Observações:

6 Desenvolvimento neuropsicomotor

Normal com atraso Engatinhou: sim não Andou: sim não

Primeiras palavras: _____

Antibióticos aminoglicosídeos uso de outras drogas ototóxicas

Infecções do ouvido Diabetes melito Meningite

Sarampo caxumba Meningoencefalites

Infecção das vias aéreas superiores Exposição constante á ruídos

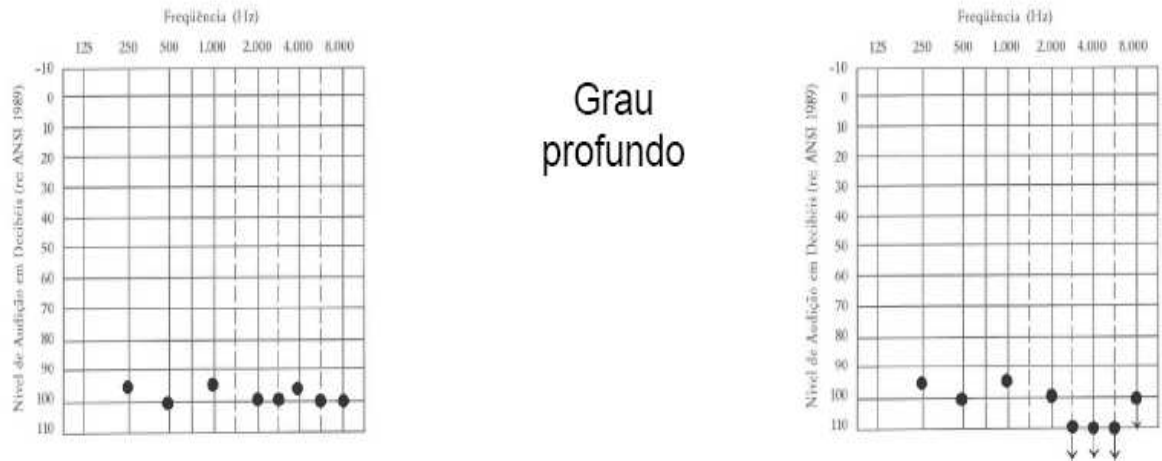
Outras doenças, internações, cirurgias: _____
 realizados: _____

Exames

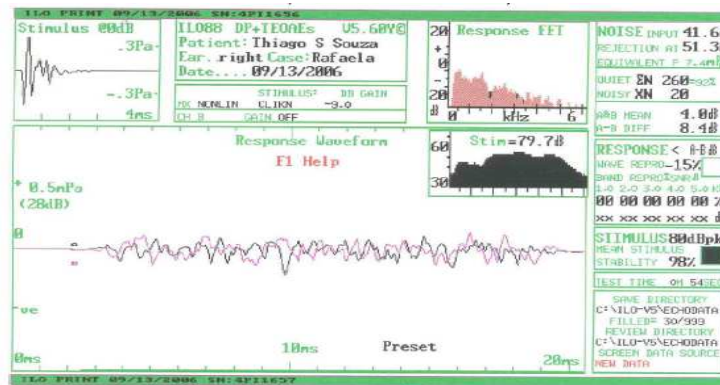
Heredograma: _____

ANEXO II

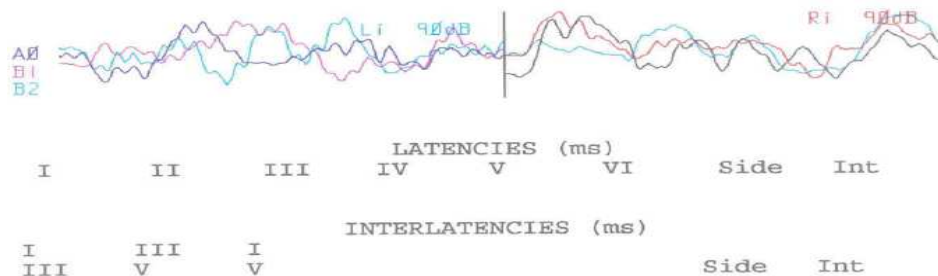
ILUSTRAÇÃO DO AUDIOGRAMA CONFORME O TIPO O GRAU E A CONFIGURAÇÃO DA PERDA AUDITIVA.



REPRESENTAÇÃO DA TELA DO MONITOR DE VÍDEO COM A INFORMAÇÃO DO REGISTRO DAS EMISSÕES OTOACÚSTICAS EVOCADAS TRANSIENTES (EOET) MOSTRANDO AUSÊNCIA DE RESPOSTA NO QUANDO INFERIOR



REGISTRO DO POTENCIAL EVOCADO AUDITIVO DO TRONCO ENCEFÁLICO (PEATE) MOSTRANDO AUSÊNCIA DE LATÊNCIAS ABSOLUTAS E INTERPICOS PARA A INTENSIDADE DE 90DB (QUADRO INFERIOR) BILATERALMENTE





SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



TERMO DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará analisou o projeto de pesquisa intitulado “Análise molecular dos genes GJB2, GJB6 e do Mt DNA em indivíduos com surdez neurossensorial não sindrômica de Belém-Pá”, protocolo nº 2241/05, sob a responsabilidade dos pesquisadores *Sidney Emanuel Batista dos Santos e Luciana Santos Serrão de Castro* e Coordenação do Prof. Dr. *Sidney Emanuel Batista dos Santos*, obtendo **APROVAÇÃO** na reunião do dia 21/12/2005, por estar de acordo com a Resolução nº 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde / Ministério da Saúde do Brasil.

Belém, 21 de dezembro de 2005

Dr. Eduardo Leitão Maia

COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA / HUJBB/UFPA