Ronaldo Serafim Abreu Silva

**Susceptibilidade Genética à Perda
Auditiva Induzida por Ruído (PAIR)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia
Mingroni Netto

São Paulo

2008

Ficha Catalográfica

Abreu-Silva, Ronaldo Serafim

Susceptibilidade Genética à Perda Auditiva Induzida por Ruído (PAIR)

p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. PAIR
2. Susceptibilidade genética
3. Mutações nos genes mitocondriais *MT-RNR1* e *MT-TS1*
4. Mutações associadas à surdez (35delG e 167delT no gene *GJB2* $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ no gene *GJB6*
5. Polimorfismos dos genes *Gjb2*, *GSTM1* e *GSTT1*.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto
Orientadora

Para minha mãe,

A quem devo tudo o que sou e tudo o que conquisto.

Durante a Minha Vida quando mudei do ensino fundamental para o médio...

quando entrei no serviço militar...

quando passei no vestibular...

quando achei a primeira pessoa com uma mutação!

Só nesses momentos eu tinha noção de que o Tempo passava...

Agora eu vejo cada minuto...

A Eterna Agonia de cada minuto que fico longe Dela.

A Infinita Felicidade de cada minuto que passo com Ela.

Para Andrea

AGRADECIMENTOS

A realização dessa tese envolveu muita dedicação e paciência de muitas pessoas para comigo. Gostaria de registrar meu profundo agradecimento

À minha orientadora Dra. Regina Célia Mingroni Netto, pela paciência e dedicação com que orientou esse trabalho. Ela sempre me apontou a direção certa. Muitas vezes, principalmente agora no final, puxou-me pela mão pelo caminho certo.

À colaboração

Do Dr. Paulo Alberto Otto pelo apoio científico e pelas análises estatísticas que sem ele teriam sido impossíveis.

Do Dr. Luis Eduardo Soares Netto por ter cedido espaço em seu laboratório para realização dos experimentos com espécies reativas de oxigênio, por ter estado sempre de portas abertas, pelas indicações de literatura. Enfim, por ter me cedido um pouco do grande entusiasmo que tem com a pesquisa de oxidações biológicas.

Da Profa. Dra. Angela Morgante do Departamento de Biologia do IBUSP, pelo apoio científico e pela dedicação com que ajudou na realização desse trabalho.

De Andréa R. V. Russo Horimoto, que auxiliou o Dr. Otto na tarefa hercúlea de converter toda a informação acumulada durante esse trabalho em resultados estatísticos que puderam ser analisados.

Dos médicos do trabalho pelo encaminhamento de pacientes e pelo auxílio na classificação da casuística. São eles: Dr Ary Papa Sguillar, Dra. Mara Gândara, Dr. Luiz Artur Costa Ricardo, Dra. Vera Lucia Zaher. Dos motoristas, gráficos e outros profissionais que fizeram parte dessa casuística.

Do CEREST/SP (Centro de Referência em Saúde do Trabalhador), onde conseguimos os primeiros motoristas de ônibus que aceitaram participar do estudo. Nessa instituição agradeço especialmente o auxílio da Dra. Márcia Tiveron de Souza e da fonoaudióloga Cristiane Santoni.

Do Sindicato dos Motoristas e Trabalhadores em Transporte Rodoviário Urbano de São Paulo que cedeu espaço, permitiu e auxiliou o nosso contato com a maior parte dos motoristas que participaram desse estudo.

Agradeço aos motoristas do transporte coletivo, gráficos e metalúrgicos que são os 255 trabalhadores que participaram desse estudo e cederam seu sangue para a realização desse trabalho.

À amizade

Da Maria Teresa B. de M. Auricchio, pelo apoio técnico e agradável companhia.

Das colegas, que comigo, compunham o grupo dos “surdos” do laboratório: Karina, Jihane e Ana Carla, pela companhia e sugestões.

Do colega Daniel Rincon que também olha para as pessoas pelo ângulo das mitocôndrias, só que para saber quem são elas e de onde elas vêm. Agradeço pelo auxílio na análise dos haplogrupos mitocondriais.

Da colega Daniela, que também auxiliou no estudo dos haplogrupos mitocondriais.

Das colegas Cláudia e LÍlian que me guiaram através dos mistérios do pacote SPSS.

Dos colegas do Laboratório de Genética Humana: Eliete, Ana, Carola, Silvia, Sylvie, Lígia, Jacaré, Rafaela, Juliana, Simone, Luiz, Nathalia, Luciana Haddad, Mara e Paulo.

Do analista acadêmico e amigo Eduardo Garcia que veio em meu socorro no último momento.

Dos que me apoiaram e cederam as orelhas para minhas lamúrias e reclamações: Fábio, parceiro nas desventuras da pesquisa; Jorge, amigo de todas as horas que me escondia quando eu precisava de sossego pra pensar e quando eu precisava de sossego para “não pensar”, Fátima, que continuou uma grande conselheira, saltitante e alegre e Maraisa, que continuou ouvindo, falando e dando caronas.

À minha família

Rita, minha mãe; Rosana, Regiane, Regina, Renata, minhas irmãs e Rafael, meu irmão, meu cunhado Paulo e meu sobrinho e afilhado Paulinho.

Aquela que surgiu na minha vida no pior momento desse trabalho e transformou esse momento num detalhe menor. Agradeço a ela, agora que eu termino esse trabalho e chego ao fim de um sonho, por me trazer outros sonhos, por me trazer a perspectiva de muitos outros sonhos. Agradeço a ela por me fazer sonhar com um filho e por realizar esse sonho. Agradeço ao amor de Andrea.

Aos meus amigos, colegas e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

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

À FAPESP, pelo auxílio financeiro e pela bolsa de doutorado.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Índice Geral

I – INTRODUÇÃO	2
I.1. - Deficiência Auditiva: Distúrbio sensorioneural freqüente com causas genéticas e ambientais.	2
I.2. - Fisiologia da audição.	4
I.3. - Causas Genéticas da Surdez Sensorioneural.	5
I.3.1. – Surdez de Herança Autossômica.	5
I.3.2. – Surdez de Herança Ligada ao Sexo e de Herança Mitocondrial.	7
I.4. - Perda Auditiva Induzida por Ruído (PAIR).	13
I.4.1. - Unidade de Medida de Intensidade Sonora: O Decibel (dB).	14
I.4.2. - Ruído.	15
I.4.3. - Susceptibilidade genética e PAIR.	18
II - OBJETIVOS	28
III - CASUÍSTICA e MÉTODOS	30
III.1. - Casuística.	30
III.2. – Métodos	32
III.2.1. - Anamnese e levantamento da história familiar	32
III.2.2. - Estudos moleculares	33
III.2.2.1. - Extração de DNA.	33
III.2.2.2. - Triagem da mutação 35delG no gene da conexina 26 (<i>GJB2</i>).	33
III.2.2.3. - Triagem da mutação 167delT no gene da conexina 26 (<i>GJB2</i>).	35
III.2.2.4. - Triagem das mutações Δ (<i>GJB6</i> -D13S1830) e Δ (<i>GJB6</i> -D13S1854) no gene da conexina 30 (<i>GJB6</i>).	36
III.2.2.5. - Triagem da mutação A1555G no gene mitocondrial <i>MT-RNR1</i> (subunidade 12S RNAr)	37

III.2.2.6. - Análise dos polimorfismos dos genes GJB2, GSTM1 e GSTT1 para estudos de associação.	38
A) Determinação do Genótipo quanto ao SNP 877098 no gene <i>GJB2</i> .	38
B) Análise dos polimorfismos dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> .	39
III.2.2.7. - Triagem de outras mutações no DNA mitocondrial.	39
A) PCR do gene mitocondrial <i>MT-RNR1</i> para análise por meio de dHPLC.	41
B) PCR do gene mitocondrial <i>MT-TS1</i> para análise por meio de dHPLC.	41
C) Reação para formação de heteroduplexes.	41
D) Análise no dHPLC.	42
E) Teste da eficácia de detecção de heteroplasmia.	42
F) Seqüenciamento dos amplicons detectados como alterados pelo dHPLC.	42
III.2.2.8. - Determinação dos Haplogrupos do DNA mitocondrial.	44
A) Identificação do macro-haplogrupo africano L.	44
B) Identificação do haplogrupo B.	44
C) Seqüenciamento da região hipervariável (HVS-I).	44
III.2.3. - Estudos de Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) no Soro dos Indivíduos.	45
III.2.3.1. - Reações Preliminares para Determinação do Conteúdo Protéico e para a Remoção do Ferro.	46
A) Ensaio com o Reagente Bradford – Determinação do Conteúdo Protéico.	46
B) Remoção do Ferro presente nas amostras por meio da resina quelante Chelex-100.	46
III.2.3.2. - Reações para Detecção de Peróxidos de Lipídios, GSH e Grupos Tiol.	47
A) Ensaio FOX – <i>Ferrous Oxidation Xilenol Orange</i> , para detecção de peróxidos presentes no soro dos indivíduos.	47

B) Ensaio com DTNB.	47
B.1) para detecção de GSH presentes no soro dos indivíduos.	47
B.2) para detecção de grupos tiol nas proteínas do soro dos indivíduos.	48
III.2.4 – Análise estatística dos resultados	48
IV - RESULTADOS	50
IV.1. - Caracterização da casuística e correlações entre perda de audição, sexo, etnia, história familiar, tabagismo, alcoolismos social, idade e tempo de exposição ao ruído.	50
IV.2. - Triagem de mutações específicas	60
IV.3. - Polimorfismos dos genes <i>GJB2</i> , <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> .	60
IV.4. - Triagem de outras mutações no DNAm por meio da técnica de dHPLC seguida de seqüenciamento dos genes <i>MT-RNR1</i> e <i>MT-TS1</i> .	66
IV.4.1. - Avaliação do desempenho da técnica de dHPLC	66
IV.4.2. - Resultados do seqüenciamento do Gene MT-RNR1	67
IV.4.3. - Resultados do seqüenciamento do MT-TS1	67
IV.4.4. - Análise estatística dos resultados obtidos por meio do seqüenciamento dos genes e MT-RNR1 e MT-TS1 e o possível efeito das variantes sobre a manifestação da PAIR.	69
A) Comparação das freqüências de cada variante nos genes <i>MT-RNR1</i> e <i>MT-TS1</i> individualmente entre os grupos PAIR, PANO e NORMAL.	69
B) Comparação entre os grupos PAIR, PANO e NORMAL do número total de variantes detectadas por indivíduos nos genes <i>MT-RNR1</i> e <i>MT-TS1</i> .	73
C) Estudo do desequilíbrio de ligação entre as variantes do DNA mitocondrial.	75
D) Comparação da freqüência dos haplótipos entre os grupos PAIR, PANO e NORMAL.	85
IV.5. - Estudos de Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) no Soro dos Indivíduos	88

V - DISCUSSÃO	91
V.1. - Caracterização da casuística e correlações entre perda de audição, sexo, etnia, história familiar, tabagismo, alcoolismos social, idade e tempo de exposição ao ruído.	91
V.2. - Susceptibilidade a PAIR e marcadores genéticos.	95
V.3. - Estudos de detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no soro dos indivíduos.	103
VI.1. - RESUMO	105
VI.2. - ABSTRACT	107
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
VIII - ANEXO I – Modelo de Ficha de Anamnese e TCLE.	

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema representando o aparelho auditivo humano.	6
Figura 2: Níveis sonoros (dBA) de algumas situações do dia-a-dia.	17
Figura 3: Fotografia do minigel de agarose 2% apresentando resultados dos testes para estudo da mutação 35delG.	34
Figura 4: Imagem de gel de poliacrilamida a 6% apresentando resultados de testes para a detecção da mutação 167delT.	35
Figura 5: Fotografia do minigel de agarose 2% apresentando resultados de testes para a detecção das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$.	37
Figura 6: Fotografia de gel de poliacrilamida a 6% apresentando resultados de testes para a detecção da mutação A1555G.	38
Figura 7: Fotografia do minigel de agarose 2% apresentando resultados de testes para a detecção dos alelos nulos dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTP1</i> .	40
Figura 8: Teste da eficácia de detecção do dHPLC.	43

Índice de Tabelas

Tabela 1: Mutações no DNAm associada com surdez sensorineural síndrômica e não-síndrômica.	9
Tabela 2: Limites de Tolerância (LTs) para ruído contínuo ou intermitente (NR-15)	18
Tabela 3: Distribuição da casuística de acordo com a ocorrência de perda de audição e das profissões dos indivíduos estudados.	32
Tabela 4: Constituição das amostras PAIR, PANO e NORMAL quanto ao sexo dos indivíduos.	50
Tabela 5: Constituição das amostras PAIR, PANO e NORMAL quanto à etnia dos indivíduos.	50
Tabela 6: Ocorrência de casos de perda de audição na família dos indivíduos pertencentes às amostras PAIR, PANO e NORMAL.	51
Tabela 7: Presença de tabagismo e de alcoolismo social entre os indivíduos das amostras PAIR, PANO e NORMAL	52
Tabela 8: Médias, desvios-padrão e medianas das idades e dos tempos de exposição ao ruído nos indivíduos das amostras PAIR, PANO e NORMAL.	52
Tabela 9: Resultados das análises de regressão logística simples comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL quanto à influência isolada de cada uma das características da casuística na manifestação da PAIR.	54
Tabela 10: Resultados das análises de regressão logística múltipla comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL quanto à influência do conjunto das características da casuística na manifestação da PAIR.	56
Tabela 11: Resultados das análises de regressão logística múltipla comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL quanto à influência do conjunto das características da casuística (apontadas como significativas pela regressão logística simples) na manifestação da PAIR.	58
Tabela 12: Resultados das análises de regressão logística simples comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL, após a exclusão das mulheres, quanto à influência de cada uma das características da casuística na manifestação da PAIR.	58
Tabela 13: Resultados das análises de regressão logística múltipla comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL, após a exclusão das mulheres, quanto à influência do conjunto das características da casuística na manifestação da PAIR.	59
Tabela 14: Resultados das análises de regressão logística múltipla comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL, após a exclusão das mulheres, quanto à influência do conjunto das características da casuística (apontadas como significativas pela regressão logística simples) na manifestação da PAIR.	59
Tabela 15: Resultados dos testes para mutações específicas responsáveis por distúrbios de audição: A1555G no gene <i>MT-RNR1</i> , 35delG e 167delT no gene <i>GJB2</i> , Δ (<i>GJB6</i> -D13S1830) e Δ (<i>GJB6</i> -D13S1854) no gene <i>GJB6</i> nos grupos PAIR, PANO e NORMAL.	60
Tabela 16: Frequências alélicas e genotípicas nos indivíduos dos grupos PAIR, PANO e NORMAL em relação ao SNP 877098 no gene <i>GJB2</i>	62

Tabela 17: Frequência dos genótipos dos indivíduos dos grupos PAIR, PANO e NORMAL em relação à deleção no gene <i>GSTM1</i> .	62
Tabela 18: Frequência dos genótipos dos indivíduos dos grupos PAIR, PANO e NORMAL em relação à deleção no gene <i>GSTT1</i> .	62
Tabela 19: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar a influência de alelos do gene <i>GJB2</i> na manifestação da PAIR, utilizando a amostra completa.	63
Tabela 20: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar a influência de alelos do gene <i>GJB2</i> na manifestação da PAIR, excluindo as mulheres.	63
Tabela 21: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar se o genótipo nulo ou a presença do gene <i>GSTM1</i> influenciaram a manifestação da PAIR, utilizando a amostra completa.	63
Tabela 22: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar se o genótipo nulo ou a presença do gene <i>GSTM1</i> influenciaram a manifestação da PAIR, excluindo as mulheres.	64
Tabela 23: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar se o genótipo nulo ou a presença do gene <i>GSTT1</i> influenciaram a manifestação da PAIR, utilizando a amostra completa.	64
Tabela 24: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar se o genótipo nulo ou a presença do gene <i>GSTT1</i> influenciaram a manifestação da PAIR, excluindo as mulheres.	64
Tabela 25: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar se os genótipos nulo ou a presença dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> influenciaram a manifestação da PAIR, utilizando a amostra completa.	65
Tabela 26: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar se o genótipo nulo ou a presença dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> influenciaram a manifestação da PAIR, excluindo as mulheres	65
Tabela 27: Identificação por meio da análise por dHPLC de variantes nas seqüências do DNAm dos indivíduos dos grupos PAIR, PANO e NORMAL nos genes mitocondriais <i>MT-RNR1</i> e <i>MT-TS1</i> .	66
Tabela 28: Relação das variantes identificadas nos genes <i>MT-TF</i> , <i>MT-RNR1</i> e <i>MT-TV</i> indicando: o número de portadores de cada uma delas nos grupos PAIR, PANO e NORMAL, o resultado da procura por descrições prévias em bancos de dados e a quais haplogrupos do DNAm elas pertencem.	68
Tabela 29: Relação das variantes identificadas no amplicon que contém o gene <i>MT-TS1</i> indicando: o número de portadores de cada uma delas nos grupos PAIR, PANO e NORMAL, o resultado da procura por descrições prévias em bancos de dados e a quais haplogrupos do DNAm elas pertencem.	69
Tabela 30: Numeração das posições do DNAm identificadas nos genes <i>MT-RNR1</i> e <i>MT-TS1</i> utilizada na análise estatística.	70
Tabela 31: Comparação das frequências de cada variante entre PAIR e PANO nos genes <i>MT-RNR1</i> (1 a 42) e <i>MT-TS1</i> (43 a 54).	71

Tabela 32: Comparação das frequências das variantes entre NORMAL e PAIR+PANO nos genes <i>MT-RNR1</i> (1 a 42) e <i>MT-TS1</i> (43 a 54).	72
Tabela 33: Número total de variantes do DNAm na região do gene <i>MT-RNR1</i> por indivíduo dos grupos PAIR, PANO e NORMAL.	73
Tabela 34: Número de variantes do DNAm na região do amplicon que contém o gene <i>MT-TS1</i> por indivíduo dos grupos PAIR, PANO e NORMAL.	73
Tabela 35: Comparações do número de pessoas com 0 em relação a aquelas com pelo menos uma variante no gene <i>MT-RNR1</i> (amplicons “A” e “B”) e no amplicon que contém o gene <i>MT-TS1</i> entre os grupos PAIR, PANO e NORMAL.	74
Tabela 36: Comparações do número de pessoas com 0 ou 1 variante em relação a aquelas com mais do que 1 variante no gene <i>MT-RNR1</i> (amplicons “A” e “B”) e no amplicon que contém o gene <i>MT-TS1</i> entre os grupos PAIR, PANO e NORMAL.	75
Tabela 37: Frequência dos haplótipos completos dos indivíduos dos grupos PAIR, PANO e NORMAL na região correspondente ao gene <i>MT-RNR1</i> . O número 1 indica presença e o 0 indica a ausência da substituição correspondente em relação sequência de referência (Anderson e col., 1981). A variante é identificada pela numeração de 1 a 42 conforme a Tabela 30 (página 70).	77
Tabela 38: Frequência dos haplótipos completos dos indivíduos dos grupos PAIR, PANO e NORMAL na região correspondente ao <i>MT-TS1</i> . O número 1 indica a presença e o 0 indica a ausência da substituição correspondente em relação à sequência de referência (Anderson e col., 1981). A variante é identificada pela numeração de 43 a 54 conforme a Tabela 30 (página 70).	78
Tabela 39: Numeração que identifica as dez posições mais polimórficas dos genes <i>MT-RNR1</i> e <i>MT-TS1</i> nas análises estatísticas.	78
Tabela 40: Frequência absoluta dos haplótipos completos dos indivíduos dos grupos PAIR, PANO e NORMAL para as dez posições nucleotídicas mais polimórficas dos genes <i>MT-RNR1</i> e <i>MT-TS1</i> . O número 1 indica a presença e o 0 indica a ausência da substituição correspondente em relação à sequência de referência (Anderson e col., 1981).	79
Tabela 41: Frequências absolutas dos haplótipos relacionados às dez posições nucleotídicas mais polimórficas (combinadas aos pares) dos genes <i>MT-RNR1</i> e <i>MT-TS1</i> nos grupos PAIR, PANO e NORMAL.	80
Tabela 42: Estimativas dos valores de desequilíbrio de ligação entre as dez posições nucleotídicas mais polimórficas dos genes <i>MT-RNR1</i> e <i>MT-TS1</i> nos indivíduos do grupo PAIR.	81
Tabela 43: Estimativas dos valores de desequilíbrio de ligação entre os dez sítios mais polimórficos dos genes <i>MT-RNR1</i> e <i>MT-TS1</i> nos indivíduos do grupo PANO.	82
Tabela 44: Estimativas dos valores de desequilíbrio de ligação entre os nove sítios mais polimórficos dos genes <i>MT-RNR1</i> e <i>MT-TS1</i> considerando conjuntamente os grupos PAIR e PANO.	83
Tabela 45: Estimativas dos valores de desequilíbrio de ligação entre as dez posições nucleotídicas mais polimórficas dos genes <i>MT-RNR1</i> e <i>MT-TS1</i> nos indivíduos do grupo NORMAL.	84

Tabela 46: Resultados dos testes de heterogeneidade entre os haplótipos dos indivíduos do grupo PAIR em relação ao grupo PANO para as dez posições nucleotídicas mais polimórficas no gene <i>MT-RNR1</i> {Hipótese nula: PAIR=PANO}	86
Tabela 47: Resultados dos testes de heterogeneidade entre os haplótipos dos indivíduos do grupo NORMAL e (PAIR + PANO) para as dez posições nucleotídicas mais polimórficas nos genes <i>MT-RNR1</i> e <i>MT-TS1</i> {Hipótese nula: NORMAL=PAIR+PANO}	87
Tabela 48: Concentração de peróxidos presentes no soro dos indivíduos, determinada por meio do ensaio FOX.	88
Tabela 49: Concentração de grupos sulfidril presentes no soro dos indivíduos, determinada por meio do ensaio como reagente DTNB.	89
Tabela 50: Relação dos estudos populacionais sobre variabilidade genética do DNAm _t que identificaram em suas amostras as mesmas variantes encontradas nesse estudo.	102

I - INTRODUÇÃO

I.1. - Deficiência Auditiva: Distúrbio sensorioneural freqüente com causas genéticas e ambientais.

O som é uma forma de energia mecânica que se propaga como onda e que pode ser caracterizada pela sua freqüência (quantidade de ciclos por segundo) e sua intensidade. O som é composto por ondas de pressão. Detectar e analisar essas ondas de pressão é função da audição (Brownell, 1999). A orelha humana pode ser dividida em três partes: a orelha externa, a orelha média e a orelha interna. Malformações das orelhas externa e média, comprometendo a captação e condução do som até a orelha interna, causam perdas auditivas chamadas de condutivas. Problemas na cóclea, no nervo auditivo, no tronco cerebral ou, até mesmo, no córtex cerebral causam a perda de audição sensorioneural.

A perda de audição é um dos distúrbios sensoriais mais comuns na população, interferindo em uma das mais importantes capacidades humanas, a da comunicação. Segundo avaliação de McGuirt e col. (1999), uma em cada duas pessoas irá apresentar déficit auditivo (>25dB) durante algum momento da vida. No Brasil foi estimado que 4 em 1000 indivíduos apresentam o defeito ao nascimento (Braga, e col, 1999). Essa freqüência é alta quando comparada com a equivalente observada em países desenvolvidos, principalmente porque em nosso país os fatores ambientais ainda são causa importante de problemas auditivos. Na década de noventa as causas hereditárias contribuíam com cerca de 16% dos casos de deficiência auditiva, cifra que pode chegar a 60% em países desenvolvidos (Braga, e col., 1999). Entretanto, esses números tendem a se modificar, principalmente devido a políticas de saúde pública.

Os resultados do Censo 2000 evidenciaram a importância dos problemas auditivos em nosso meio. Assim, as informações levantadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE no ano de 2000 mostraram que, aproximadamente, 24,5 milhões de pessoas (14,5% da população total), apresentaram algum tipo de incapacidade ou deficiência. Os portadores de deficiência auditiva correspondiam a 16,7% dessas pessoas (5,7 milhões). Portanto, cerca de 3,4% da população total apresenta algum déficit de audição, sendo que 0,1% (176.067 pessoas) apresentavam perda total da audição. Ainda, de acordo com os resultados do Censo, havia o predomínio de homens entre os portadores de deficiência auditiva, mental e física. Segundo o IBGE, uma possível explicação para esse resultado seria o tipo de atividade desenvolvida pelos homens, com risco maior de acidentes de diversas causas.

Um trabalho realizado junto à clínica do Departamento de Otorrinolaringologia e de Distúrbios da Comunicação Humana da Universidade Federal do Estado de São Paulo – UNIFESP, nos períodos de 1990-1994 e 1994-2000, trouxe dados interessantes relacionados à etiologia de

problemas auditivos. de Nóbrega e col. (2005) realizaram estudo para verificar a contribuição dos principais agentes etiológicos para a ocorrência de surdez. Estudaram uma amostra de 442 crianças e adolescentes com distúrbios auditivos provavelmente causados por somente um dos seguintes agentes etiológicos: causas genéticas, consangüinidade, rubéola congênita, meningite, complicações perinatais e causas desconhecidas. As conclusões desse estudo dizem que os agentes etiológicos abordados foram responsáveis por 80% dos casos de surdez. Quanto às causas genéticas, os autores verificaram uma diminuição da frequência entre o período de 1990-1994 (14%) e o de 1994-2000 (6,9%). A rubéola congênita permaneceu como um dos mais importantes fatores etiológicos nessa amostra.

Outro trabalho que buscou estabelecer as dimensões do problema do distúrbio de audição no Brasil foi realizado no período de novembro de 2002 a junho de 2003 (Béria e col., 2007). Os pesquisadores avaliaram a audição de 2.427 indivíduos com 4 anos de idade ou mais. Os autores visitavam as residências dos moradores da cidade de Canoas, estado do Rio Grande do Sul, realizando avaliações audiológicas em todos que concordavam em participar do estudo. Nessa amostra foi observado que 21,6% dos indivíduos eram portadores de pequenos déficits auditivos (de 25 a 30 dB) e que outros 6,8% apresentavam perdas incapacitantes (de 31 dB a valores superiores a 80 dB). Por fim, a prevalência da deficiência auditiva moderada (31 a 60 dB) foi de 5,4%, da perda de audição grave foi de 1,2% e a surdez profunda apresentou prevalência de 0,2%.

Devido à sua frequência e a importância da audição na sociedade humana e por fornecer valiosas informações para a compreensão do funcionamento normal da audição, a deficiência auditiva tem atraído diversos grupos de pesquisa. Busca-se compreender a epidemiologia da deficiência auditiva, desenvolver possíveis intervenções e tratamentos que possam amenizar, evitar ou curar quadros de perdas de audição e pesquisar sua etiologia, principalmente quanto às causas genéticas, ambientais e, mais recentemente, à interação entre fatores genéticos e ambientais.

O desenvolvimento do aparelho auditivo e seu funcionamento normal dependem da ação de vários genes. Assim, mutações nesses genes, isoladamente ou em interação, podem levar à perda de audição. Essa deficiência pode ser um dos sinais clínicos de uma síndrome conhecida (surdez sindrômica) ou ser a única manifestação clínica no indivíduo (surdez não-sindrômica). Os genes associados com a manifestação de distúrbios de audição sensorineurais não-sindrômicos identificados até o momento estão relacionados principalmente com o desenvolvimento e a fisiologia do aparelho auditivo. Merecem destaque genes que codificam proteínas relacionadas com a homeostase iônica, com a homeostase energética e com a estrutura, arranjo e funções do citoesqueleto das células sensoriais da audição (Zhao e col., 2006; Mchugh e Friedman, 2006; Eisen e Ryugo, 2007 para revisão).

I.2. - Fisiologia da audição.

Para o entendimento da função dos genes já associados à manifestação da surdez, faz-se necessária uma rápida explicação sobre a fisiologia da audição em situações de normalidade. Nosso sistema auditivo é constituído pela orelha externa, orelha média e orelha interna (Figura 1A). A orelha externa é composta pelo pavilhão auricular e pelo conduto auditivo externo. A orelha média compreende a membrana timpânica e uma cadeia de três ossículos. Esses ossículos conduzem o som do tímpano para a orelha interna através da janela oval. Por fim, a orelha interna corresponde a uma cavidade óssea, onde estão o sistema vestibular, responsável pelo equilíbrio, e a cóclea, que converte os estímulos sonoros em sinais nervosos.

A cóclea é um canal ósseo espiralado que contém em seu interior um tubo membranoso dividido em três partes: a escala timpânica, a escala média e a escala vestibular (Figura 1B). A porção sensorial propriamente dita é o órgão de Corti (também chamado de órgão espiral), que se encontra na escala média, apoiado sobre a membrana basilar (Figura 1C). É um órgão alongado que se estende da base ao topo da cóclea (Junqueira & Carneiro, 1995; Petit, 1996; “Promenade ‘round the cochlea Home Page” - Pujol e col., 2007: URL: <http://www.cochlea.org/>). O órgão espiral é constituído por células de suporte e por aproximadamente 16.000 células sensoriais (Corwin, 1998), denominadas células ciliadas, divididas em uma fileira proximal ao eixo ósseo central da cóclea, o modíolo, por isso chamadas de células ciliadas internas e três fileiras de células distais ao modíolo, chamadas de células ciliadas externas (figura 1B).

A conversão do som é um processo de mecano-transdução. Ele é realizado pelas células ciliadas, que possuem em sua superfície apical microvilosidades altamente desenvolvidas, com um arranjo e conformação diferenciados, os estereocílios. As células ciliadas externas são dotadas de eletromotilidade e atuam mecanicamente como amplificadoras da energia contida nas diferentes frequências sonoras. No entanto, são as células ciliadas internas que convertem o som em estímulo nervoso (“Promenade ‘round the cochlea Home Page” - Pujol e col., 2007: URL: <http://www.cochlea.org/>).

Contudo, é importante ressaltar que o processo de mecano-transdução envolve ambos os tipos celulares. Ele se inicia com a captação do som que causa a movimentação do tímpano e dos ossículos, prossegue com a transmissão da energia mecânica através da janela oval para o líquido que preenche a cóclea (endolinfa). A movimentação da endolinfa leva à deflexão dos estereocílios, causando a abertura de canais iônicos sensíveis a esse deslocamento. A endolinfa apresenta altas concentrações de potássio que, então, entra nas células ciliadas, despolarizando a membrana celular.

A despolarização das células ciliadas externas ativa sua eletromotilidade. Já nas células ciliadas internas, a despolarização provoca a liberação de vesículas contendo o neurotransmissor glutamato nas terminações nervosas que fazem sinapse com essas células, desencadeando assim o impulso nervoso (Junqueira & Carneiro, 1995; Petit, 1996; Davis e col., 2003; Whitlon, 2004; “Promenade ‘round the cochlea Home Page” - Pujol e col., 2007: URL: <http://www.cochlea.org/>).

Por fim, após a ocorrência do estímulo sonoro, as células ciliadas estão hiperpolarizadas com altas concentrações de potássio, que precisa ser rapidamente removido dessas células e reciclado para a endolinfa. Esse processo de reciclagem envolve a passagem dos íons de potássio de célula a célula, através de canais iônicos especializados, dentre eles as junções comunicantes intercelulares (*gap junctions* ou, ainda, canais de junção do tipo *gap* ou fenda) encontradas principalmente entre as células de suporte (Junqueira e Carneiro, 1995; Petit, 1996; Davis e col., 2003; Whitlon, 2004; “Promenade ‘round the cochlea Home Page” - Pujol e col., 2007: URL: <http://www.cochlea.org/>).

1.3. - Causas Genéticas da Surdez Sensorineural.

A deficiência auditiva exibe grande heterogeneidade genética, sendo observáveis praticamente todos os padrões de herança conhecidos. Devido a essa complexidade e ao fato de ser uma condição relativamente freqüente, a deficiência auditiva tem se mostrado um interessante modelo de pesquisa em genética. Poucos distúrbios genéticos passaram por um processo de mapeamento de regiões cromossômicas candidatas e de identificação de genes tão rápido.

Apesar de existirem descritas atualmente mais de 400 doenças ou síndromes que incluem a surdez como um de seus sinais clínicos, 70% dos casos de surdez hereditária são não-sindrômicos (Keats e Berlin, 1999).

1.3.1. - Surdez de Herança Autossômica.

A herança autossômica dominante ocorre em 10 a 20% dos casos hereditários de surdez não-sindrômica. Estudos de ligação em famílias com esse padrão de herança já mapearam 46 regiões candidatas e já foram identificados 21 genes (Van Camp e Smith, 2007). Até o momento, nenhum desses genes apresentou alguma mutação que ocorresse em freqüências que o destacasse como uma causa notável de surdez. No entanto, esse tipo de pesquisa contribuiu muito para a compreensão da fisiologia da audição quando foram esclarecidos os papéis dos produtos dos genes relacionados à surdez.

(A)

(B)

Figura 1: (A) Esquema representando o aparelho auditivo humano: orelha externa (E), orelha média (M) e orelha interna (I). Figura modificada de Stéphan Blatrix, obtida na página “Promenade ‘round the cochlea Home Page” - Pujol e col., 2007: URL: <http://www.cochlea.org/>. (B) Esquema de corte transversal da cóclea mostrando: o modíolo; a escala vestibular (EV); a escala timpânica (ET), a escala média (EM) e o órgão espiral (órgão de Corti). (C) Ampliação da representação esquemática do órgão espiral mostrando: as células de suporte; as células ciliadas internas; as células ciliadas externas; os estereocílios; a membrana tectória; a membrana basilar e fibras do nervo auditivo (Figura modificada da página eletrônica da Universidade de Heidelberg - Frings S, 2007: <http://www.sinnesphysiologie.de/gruvo03/gehoer/cochlea.htm>).

A herança autossômica recessiva explica de 70 a 80% dos casos hereditários de surdez não síndrômica e até o momento foram mapeadas 48 regiões candidatas e 23 genes já foram identificados (Van Camp e Smith, 2007). Ao contrário dos genes associados à manifestação de surdez de herança autossômica dominante, há genes que se destacam, o que justifica que sejam molecularmente investigados com finalidade de diagnóstico e aconselhamento genético. Os genes mais importantes são os que codificam as proteínas conexinas 26 e 30, que correspondem respectivamente aos produtos dos genes *GJB2* e *GJB6*. Essas proteínas são constituintes das junções comunicantes intercelulares, que estabelecem uma comunicação entre os citoplasmas de células adjacentes, permitindo a troca quase instantânea de substâncias, principalmente íons, entre as células. Portanto, são fundamentais à homeostase iônica, necessária ao correto funcionamento do aparelho auditivo. Os genes *GJB2* e *GJB6* estão presentes no cromossomo 13, na mesma região cromossômica denominada DFNB1 (do inglês DeaFNess, “B” letra que indica o mecanismo de herança autossômico recessivo e “1” indicando que foi a primeira região mapeada relacionada a esse mecanismo). Mutações no gene *GJB2* causam mais de 50% dos casos de surdez não-síndrômica autossômica recessiva, sendo que em até 75% desses casos a mutação 35delG é a responsável pelo fenótipo (Denoyelle e col., 1997; Wilcox e col., 1999; Sundstrom e col., 1999; Van Camp e Smith, 2007). Assim, o estudo molecular desse gene é fundamental para o diagnóstico de surdez hereditária não-síndrômica.

Engel-Yeger e col. (2003) verificaram que os heterozigotos em relação a mutações no gene *GJB2* podem apresentar um comprometimento leve da audição, perceptível apenas após avaliação audiológica detalhada. Além disso, estudos mais recentes destacam a enorme variabilidade do quadro de perda de audição entre indivíduos portadores de duas mutações nesse gene (Lerer e col., 2001; Tekin e col., 2003; Lezirovitz e col., 2006; Norris e col., 2006; Welch e col., 2007). Portanto, nos dias de hoje, o gene *GJB2* é um importante candidato para estudos moleculares em indivíduos com perdas auditivas de todos os graus.

1.3.2. - Surdez de Herança Ligada ao Sexo e de Herança Mitocondrial.

A herança ligada ao cromossomo X deve ser responsável por 2-3% dos casos de surdez hereditária (Van Camp e col., 1997; Berry e col. 2000). Existem até o momento cinco regiões candidatas mapeadas no cromossomo X com dois genes identificados (Van Camp e Smith, 2007). Até mesmo o cromossomo Y já foi descrito como provavelmente contendo um gene associado à manifestação de surdez não-síndrômica (Wang e col., 2004).

As pesquisas relativas à surdez hereditária surpreenderam a comunidade científica ao demonstrarem que os genes presentes no DNA mitocondrial também são responsáveis por perdas auditivas não síndrômicas (Tabela 1). Existem dois genes mitocondriais associados com

a manifestação de surdez não síndrômica que devem ser destacados: o gene da subunidade 12S do RNAr ou *MT-RNR1* e o gene do RNAt^{Ser(UCN)}, *MT-TS1* (Prezant e col., 1993; Reid e col., 1994; Bacino e col., 1995; Tiranti e col., 1995; Sue e col., 1999; Hutchin e col., 2000; Thyagarajan e col., 2000; Zhao e col., 2004).

Os quadros clínicos associados às mutações nos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1* apresentam grande variabilidade fenotípica. Porém, a surdez progressiva, de manifestação tardia e com muita variabilidade na gravidade da perda final é o quadro que se destaca como um dos mais freqüentes observados nos diversos estudos (Bykhovskaya e col., 1998; Estivill e col., 1998; Fischel-Ghodsian, 1998; Fischel-Ghodsian, 1999; Pandya e col., 1999; Bykhovskaya e col., 2000; Hutchin & Cortopassi, 2000; Abe e col., 2001; Bykhovskaya e col., 2001; Zhao e col., 2004; Ramsebner e col., 2007; Van Camp e Smith, 2007). A variação fenotípica existente nos quadros de surdez não-síndrômica associada com mutações no DNAm^t freqüentemente é explicada pela influência do ambiente, de genes nucleares modificadores ou da heteroplasmia.

Um dos mais óbvios exemplos de interação entre fatores ambientais e genéticos é a hipersensibilidade à ototoxicidade dos antibióticos aminoglicosídeos apresentada pelos portadores das mutações A1555G, Δ 961insC_n, T1095C e C1494T no gene mitocondrial *MT-RNR1* (Prezant e col., 1993; Bacino e col., 1995; Guan e col., 1996; Estivill e col., 1998; Guan e col., 2000; Thyagarajan e col., 2000; Guan e col., 2001; Zhao e col., 2004; Zhao e col., 2005).

A mutação mitocondrial A1555G tem grande importância principalmente devido a sua alta freqüência em algumas populações. Ela foi descrita pela primeira vez em 1993 por Prezant e col. A partir de então, vários outros autores em diferentes locais nos cinco continentes, inclusive no Brasil, identificaram essa mutação em casos de deficiência auditiva, associada ou não ao uso de antibióticos aminoglicosídeos (Hutchin e col., 1993; Matthijs e col., 1996; El-Schahawi, e col., 1997; Fischel-Ghodsian e col., 1997; Gardner e col., 1997; Pandya e col., 1997; Casano e col., 1998; Estivill e col., 1998; Oshima e col., 2001; Kupka e col., 2002; Ostergaard e col., 2002; Malik e col., 2003a; Malik e col., 2003b; Tekin e col., 2003; Gallo-Teran e col., 2005; Mkaouar-Rebai e col., 2006; Abreu-Silva e col., 2006; Gravina e col., 2007; Ramsebner e col., 2007). O estudo mais surpreendente sobre a mutação A1555G foi realizado por Estivill e col. em 1998, que estudaram 70 famílias espanholas, com vários indivíduos afetados por deficiência auditiva neurosensorial progressiva. Identificaram 19 famílias que apresentavam padrão de herança compatível com a mitocondrial e confirmaram a presença da mutação A1555G em todas as 19 famílias. Esse estudo até hoje apresenta a maior freqüência já descrita para essa mutação e permitiu a caracterização do fenótipo da perda auditiva a ela

Tabela 1: Mutações no DNAm descritas em associação com a manifestação de surdez sensorineural síndrômica e não-sindrômica.

Mutação	Genes	Produto	HOM	HET	Outros sinais associados
A827G?	<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	+	-	
Δ T961insC _n	<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	+	(M)	
T961C	<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	+	-	
T961A	<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	+	-	
T961G	<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	+	-	
T1005C?	<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	+	-	
T1095C	<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	+	+	
A1116G?	<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	+	-	
T1243C?	<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	+	-	
T1291C?	<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	+	-	
C1494T	<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	+	-	
A1555G	<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	+	-	
A3243G	<i>MT-TL1</i>	RNA ^{Leu(UUR)}	+	+	MIDD, MELAS, CPEO, m
T3271C	<i>MT-TL1</i>	RNA ^{Leu(UUR)}	+	+	MIDD; ep
T4216C	<i>MT-ND1</i>	ND1	+	+	LHON
A4269G	<i>MT-TI</i>	RNA ^{Ile}	-	+	cm
G4309A	<i>MT-TI</i>	RNA ^{Ile}	-	+	CPEO, ie
G4332A	<i>MT-TQ</i>	RNA ^{Gln}	-	+	e, MELAS
T4336C	<i>MT-TQ</i>	RNA ^{Gln}	+	+	da, p, en
G5532A	<i>MT-TW</i>	RNA ^{Trp}	-	+	sg
G5549A	<i>MT-TW</i>	RNA ^{Trp}	-	+	dem, co, ac
A5568G?	<i>MT-TW</i>	RNA ^{Trp}			hpig
A7443G	<i>MT-CO1</i>	Cox1	+	-	
G7444A?	<i>MT-TS1/MT-CO1</i>	RNA ^{Ser(UCN)} /Cox1	+		LHON
A7445G*	<i>MT-TS1/MT-CO2</i>	RNA ^{Ser(UCN)} /Cox2	+	+	qpp/LHON
7472insC*	<i>MT-TS1</i>	RNA ^{Ser(UCN)}	+	+	a, dis, mio
T7510C*	<i>MT-TS1</i>	RNA ^{Ser(UCN)}	-	+	
T7511C*	<i>MT-TS1</i>	RNA ^{Ser(UCN)}	+	+	
T7512C	<i>MT-TS1</i>	RNA ^{Ser(UCN)}	+	+	ep, epl, a, MERRF, MELAS
A8108G	<i>MT-CO2</i>	Cox2	+	-	
A8296G	<i>MT-TK</i>	RNA ^{Lys}	+	+	MIDD, cm; MERRF
G8313A	<i>MT-TK</i>	RNA ^{Lys}	-	+	MNGIE
A8344G	<i>MT-TK</i>	RNA ^{Lys}	-	+	MERRF
T8356C	<i>MT-TK</i>	RNA ^{Lys}	-	+	MERRF, MELAS

(continua)

Tabela 1: Continuação

Mutação	Genes	Produto	HOM	HET	Outros sinais associados
G8363A	<i>MT-TK</i>	RNA ^{Lys}	-	+	e, cm, MERRF, au
T10454C	<i>MT-TR</i>	RNA ^{Arg}	-	+	r
G12183A	<i>MT-TH</i>	RNA ^{His}	-	+	r, m, a
C12258A	<i>MT-TS2</i>	RNA ^{Ser(AU)}	-	+	MIDD, r
A13513G	<i>MT-ND5</i>	ND5	-	+	MELAS; sl
G13708A	<i>MT-ND5</i>	ND5	+	+	LHON
C14340T	<i>MT-ND6</i>	ND6	+	-	
A14693G	<i>MT-TE</i>	RNA ^{Uuu}	-	+	MELAS
T14709G	<i>MT-TE</i>	RNA ^{Uuu}	+	+	MIDD, m; e
T15908C	<i>MT-TT</i>	RNA ^{1^{nr}}			
Deleções					
Variáveis	Vários	Vários			sw, MIDD, KSS, prb

(modificado de Kokotas e col., 2007).

? = indica as mutações cuja patogenicidade ainda precisa de confirmação.

* = indica mutações que também ocorreram associadas a casos de surdez não síndrômica.

HOM = Homoplasma: o termo refere-se à presença de um único tipo de DNA_{mt} em um indivíduo.

HET = Heteroplasma: refere-se à co-existência de DNA_{mt} mutante e selvagem em um mesmo indivíduo.

(M) = Multiplasmia: na mutação $\Delta T961insC_n$ (Δ = deleção) o número de citosinas inseridas pode variar em um mesmo indivíduo, daí o termo "multiplasmia".

RNRr = RNA ribossomal.

RNA_t = RNA transportador.

Cox# = citocromo C oxidase 1 ou 2; ND# = NADH desidrogenase 1, 5 ou 6.

As letras maiúsculas indicam siglas consagradas internacionalmente:

CPEO = oftalmoplegia externa crônica progressiva; **KSS** = síndrome de Kearns-Sayre; **LHON** = Neuropatia óptica hereditária de Leber; **MELAS** = miopatia mitocondrial com encefalopatia, acidose láctica e surtos similares a acidentes vasculares cerebrais; **MERRF** = Epilepsia mioclônica com fibras vermelhas puídas (na biópsia diagnóstica as fibras musculares são coradas em vermelho e apresentam um aspecto de puídas - *ragged red fibers*); **MIDD** = surdez e diabetes com herança materna. **MNGIE** = Síndrome de encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial.

a = ataxia; **ac** = ataxia cerebelar; **au** = autismo;

cm = cardiomiopatia; **co** = coreia;

da = doença de Alzheimer; **dem** = demência; **dis** = disartria;

e = encefalomiopatia; **en** = enxaqueca; **ep** = encefalomiopatia progressiva; **epl** = epilepsia;

ie = intolerância ao exercício;

hpig = hipopigmentação;

m = miopatia; **mio** = mioclonia;

p = Parkinsonismo; **prb** = presbiacusia;

qpp = queratoderma palmoplantar;

r = retinopatia;

sg = síndrome gastrointestinal; **sl** = síndrome de Leigh; **sw** = síndrome de Wolfram

associada: manifestação tardia e dependente da idade, gravidade extremamente variável, geralmente progressiva. Esse estudo evidenciou o papel dos antibióticos aminoglicosídeos antecipando e agravando a manifestação da perda de audição.

Os estudos das genealogias em que ocorre a mutação A1555G têm sugerido a participação de genes nucleares que atuam como modificadores do fenótipo apresentado pelos portadores da mutação A1555G. São exemplos de genes nucleares candidatos a atuar como modificadores o *GTPB3*, o *TRMU* e o *MTOT1*; os três são genes que codificam proteínas relacionadas com o processamento dos RNA transportadores mitocondriais e de *TFB1M*, um fator de transcrição mitocondrial. Também existem evidências apontando que interações com outras mutações no DNA mitocondrial influenciariam o fenótipo dos portadores da mutação A1555G. Entretanto, até hoje não

foram apresentados dados definitivos comprovando a ação de quaisquer desses genes nucleares ou mitocondriais como modificadores efetivos responsáveis pela grande variabilidade do quadro associado à mutação A1555G (Bykhovskaya e col., 2000; Bykhovskaya e col., 2001; Guan e col., 2001; Li e col., 2002; Bykhovskaya e col., 2004a; Bykhovskaya e col., 2004b; Guan e col., 2006; Young e col., 2006; Liao e col., 2007).

A heteroplasmia, ou seja, presença de DNAmTs diferentes em um mesmo indivíduo, órgão, tecido ou até mesmo em uma mesma célula, tem importância nas patologias relacionadas com o DNAmT. Acredita-se que para a manifestação de determinado quadro clínico exista um limiar na frequência da heteroplasmia. A partir desse limiar, a doença passa a se manifestar com gravidade diretamente proporcional à quantidade de DNAmT presente (Parker e Swerdlow, 1998; Wallace, 1999; Cummins, 2001; Wallace, 2001; Moraes e col., 2003; Mroczek-Tonska e col., 2003; Wallace, 2005; Brandon e col., 2006; Tatke, 2007; Lambert e Brand, 2007). Entretanto, as mutações no DNAmT relacionadas com a manifestação de surdez não-sindrômica são observadas em homoplasmia com muita frequência. A mutação A1555G, por exemplo, apresenta apenas duas ocorrências de heteroplasmia dentre os mais de 100 estudos já realizados (el-Schahawi e col., 1997; Morales Angulo e col., 2002). A ocorrência de heteroplasmia é relativamente mais frequente entre as mutações do gene *MT-TS1*, ainda assim, a manifestação da surdez ocorre geralmente entre os indivíduos com mais de 70% de DNAmT mutado (Reid e col., 1994; Tiranti e col., 1995; Sue e col., 1999; Hutchin e col., 2000). Além disso, o mais importante é que, ao contrário do esperado, a gravidade do fenótipo não se relaciona diretamente com o nível de heteroplasmia (Hutchin e col., 1993; Reid e col., 1994; Bacino e col., 1995; Tiranti e col., 1995; El-Schahawi, e col., 1997; Fischel-Ghodsian e col., 1997; Casano e col., 1998; Estivill e col. 1998; Sue e col., 1999; Hutchin e col., 2000; Thyagarajan e col., 2000; Morales Angulo e col., 2002; Kokotas e col., 2007).

Foram descritas recentemente cinco novas mutações no gene *MT-RNR1* (A827G, T1005C, A1116C, T1243C e T1291C) e uma no gene *MT-TS1* (G7444A) que aparentemente podem ter papel na manifestação de surdez não sindrômica (Pandya e col., 1999; Li e col., 2004; Li e col., 2005; Yuan e col., 2005; Ballana e col., 2006; Xing e col., 2006; Xing e col., 2006b; Yao e col., 2006; Zhu e col., 2006; Jin e col. 2007; Yuan e col., 2007 e, para revisão, Kokotas e col., 2007). As mutações T1005C e A1116C, até o momento, foram descritas em apenas um único trabalho que buscava mutações patogênicas em uma amostra de 128 crianças com surdez esporádica, com ou sem histórico de exposição aos antibióticos aminoglicosídeos (Li e col., 2005). Por outro lado, existem quatro estudos filogeográficos e populacionais que encontraram em amostras de indivíduos de populações chinesas, japonesas, paquistanesas e européias (espanhola) sete seqüências de DNAmT que apresentaram a mutação T1005C (mtDB; GenBank; Ingman e Gyllensten, 2003; Kong e col., 2003; Tanaka e col., 2004; Kivisild e col., 2006). A mutação T1243C foi encontrada em cinco pacientes, não aparentados,

com surdez e a mutação T1291C foi identificada, sempre em homoplasmia, em uma grande família cubana de três gerações com vários indivíduos afetados por surdez (Ballana e col., 2006). No entanto, existem trabalhos contestando a patogenicidade de ambas as mutações (Abreu-Silva e col., 2006; Bandelt e col., 2006).

A mutação A827G apresenta um histórico controvertido no que diz respeito a ser considerada uma variante patogênica do DNAm. Até o momento, três estudos com amostras de pessoas com perdas auditivas, com e sem o uso de antibióticos aminoglicosídeos, apontam que ela seria a mais provável explicação para o quadro de deficiência auditiva. Li e col. (2004) identificaram pela primeira vez a mutação A827G em estudo onde analisaram 164 crianças caucasianas, apresentando perda auditiva não síndrômica, provenientes do *Cincinnati Children's Hospital Medical Center*, EUA. Testaram ainda 226 controles ouvintes de diferentes etnias. A mutação A827G foi encontrada em um dos pacientes, mas não entre os indivíduos controle. Como evidência a favor da patogenicidade da mutação A827G, os autores apontaram que boi, rato e *Xenopus laevis* também apresentam em seus DNAm uma adenina em posições homólogas à 827 da sequência humana. Portanto, essa região do DNAm seria evolutivamente conservada.

Li e col. (2005) identificaram cinco portadores da mutação A827G em uma amostra de 128 crianças apresentando surdez não síndrômica com relatos de uso de antibióticos aminoglicosídeos. Também identificaram portadores dessa mutação em dois indivíduos dentre 144 indivíduos ouvintes que constituíam a amostra controle do estudo. Curiosamente, os autores não comentam em sua discussão o fato da mutação ter sido identificada em dois indivíduos da amostra controle. O trabalho mais recente que identificou portadores da mutação A827G foi realizado por Xing e col. (2006) que estudaram duas grandes famílias chinesas com surdez, não aparentadas. A primeira família, composta por 40 membros, apresentava 16 indivíduos aparentados pelo lado materno com 10 deles afetados por surdez. Os testes revelaram que os 16 eram portadores da mutação A827G. Na segunda família, composta por 30 indivíduos, também foi identificada a mutação A827G em todos os indivíduos aparentados pelo lado materno. Entretanto, apenas três indivíduos eram afetados por surdez. Nessa segunda família houve relato de uso de antibióticos aminoglicosídeos. Para os autores, a penetrância incompleta da surdez nessas famílias indicava que fatores ambientais ou genéticos deveriam influenciar o fenótipo associado à mutação A827G. No entanto, existem estudos populacionais que identificam essa mesma variante entre as sequências de DNAm que fazem parte de suas amostras. Sete estudos populacionais verificaram a presença da variante A827G entre indivíduos de populações nativas americanas, asiáticas (japoneses e chineses) e europeias. Esses estudos registraram nos bancos de dados (mtDB, GenBank) um total de 54 sequências de DNAm que apresentam a variante A827G e todas elas pertencentes ao haplogrupo B (Ingman e col., 2000; Herrnstadt e col., 2002; Kong e col., 2003; Mishmar e col., 2003; Tanaka e col., 2004; Starikovskaya e col., 2005; Kivisild e

col., 2006; Yao e col., 2006). Portanto, a existência dessas seqüências (em geral de indivíduos normais) observadas em estudos filogeográficos são evidências de que a variante A827G, na realidade, provavelmente não é patogênica.

Por fim, a mutação G7444A no gene *MT-TSI* foi observada em três estudos com amostras de indivíduos surdos e dois desses estudos identificaram essa variante em associação com a mutação A1555G. Nesse caso também existem estudos filogeográficos que verificaram a ocorrência dessa variante em suas amostras. São dez seqüências registradas em bancos de dados (mtDB e GenBank) relativas a quatro estudos de populações variadas (Ingman e col., 2000; Herrnstadt e col., 2002; Moilanen e col., 2003; Kivisild e col., 2006). Além disso, essa mesma variante foi identificada em indivíduos ouvintes da população brasileira utilizados como controles em estudo de mutações no DNAm associadas com a manifestação de distúrbios auditivos (0,6% da amostra controle total e 1% entre descendentes de africanos; Abreu-Silva e col., 2006).

O teste de indivíduos de uma amostra controle é um procedimento padrão de todos os estudos que buscam identificar mutações patogênicas. Geralmente os pesquisadores buscam uma amostra controle representativa e etnicamente pareada. O correto pareamento étnico é fundamental para se eliminar fatores que podem confundir as análises. Para as mutações no DNAm esse pareamento é particularmente importante. Os principais argumentos contra a patogenicidade de várias mutações mitocondriais são as alegações de que tais mutações representariam, na verdade, polimorfismos específicos de grupos populacionais. Nesses casos, um equívoco estaria se confirmando e perpetuando simplesmente porque os pesquisadores não testaram indivíduos pertencentes ao mesmo grupo populacional do portador da mutação candidata. O estudo dos haplogrupos mitocondriais inicialmente foi importante como uma ferramenta que auxiliava na compreensão dos padrões de migração e de dispersão de grupos humanos. Atualmente, achados de associação de mutações no DNAm com doenças têm revelado a importância de se determinar os haplogrupos para correto pareamento caso-controle. Os principais haplogrupos já conhecidos são em geral específicos para um determinado continente ou etnia. Assim, os haplogrupos L1, L2 e L3 são linhagens africanas, mais especificamente da região Sub-Sahariana. Nove haplogrupos, H, I, J, K, T, U V, W e X, englobam linhagens Européias, do Norte da África e do Oeste Asiático. Finalmente, os haplogrupos A, B, C, D, E, F, G e M agrupam a maioria das linhagens descritas para a Ásia, Oceania e o Novo mundo (Torroni e col., 1994; Torroni e col., 1996; Maca-Meyer, 2001; Samuels e col., 2006). Nos indígenas brasileiros estão presentes os haplogrupos A, B, C, D e, mais raramente, o X.

I.4. - Perda Auditiva Induzida por Ruído (PAIR).

Vários fatores ambientais são classicamente aceitos como causa potencial dos distúrbios de audição. Dentre os fatores ambientais que causam surdez em adultos, aquele que tem atraído maior

atenção é a exposição excessiva a ruídos. A exposição contínua aos ruídos de alta intensidade, principalmente os de alta frequência, causa lesão auditiva grave e irreversível (revisão em Ruiz e col., 1995). As lesões relacionadas com o ruído fazem com que os limiares auditivos fiquem acima de 25 dB inicialmente nas frequências de 3.000 e/ou 4.000 e/ou 6.000 Hz. A exposição continuada ao ruído causa a progressão do quadro tanto com o agravamento das frequências atingidas quanto com a perda progressiva nas demais frequências. Essas perdas crônicas e irreversíveis são as chamadas Perdas Auditivas Induzidas por Ruído (PAIR). Optamos nesse trabalho pela utilização do termo PAIR nas seções subseqüentes.

1.4.1. - Unidade de Medida de Intensidade Sonora: O Decibel (dB).

Para a melhor compreensão é conveniente esclarecer o significado da unidade de medida do som: o decibel (dB). O som pode ser medido em relação à quantidade de energia contida na onda sonora (intensidade sonora) ou à quantidade de matéria que essa onda desloca (pressão sonora). Somente é possível estabelecer uma relação entre o aumento da energia ou pressão sonora e a sensação produzida quando se estabelece uma intensidade de referência. Assim, tomando a pressão do menor som audível (20 μPa) como referência, é possível estabelecer uma escala de intensidade. Também é possível utilizar como referência para essa escala a quantidade de energia presente no menor som audível ($10^{-12} \text{ watt/m}^2$ – note que $20 \mu\text{Pascal}[\mu\text{Pa}]=10^{-12} \text{ watt/m}^2$). Ambos tipos de medida terão como unidade da intensidade dessa sensação o decibel (dB). Entretanto, serão escalas diferentes, por exemplo: considerando a pressão sonora, quando dobramos a pressão de um som ocorre um aumento de 6 dB, enquanto que se dobrarmos a intensidade da energia sonora o acréscimo será de apenas 3 dB. Além disso, caso o valor de referência seja modificado a escala também será modificada. Portanto, o decibel é uma unidade relativa e deve ser indicada qual a referência utilizada: a pressão sonora (níveis de pressão sonora – NPS) ou a intensidade de energia sonora (níveis de intensidade sonora – NIS) (Russo, 1997). Nesse trabalho, as menções aos decibéis referem-se a medidas dos níveis de pressão sonora.

Além disso, a orelha humana não é igualmente sensível para todas as frequências da faixa audível. Então, para se medir intensidades de ruídos simulando a sensibilidade da audição humana foram estabelecidas escalas padronizadas internacionalmente denominadas circuitos de compensação A, B e C. Esses circuitos contêm mecanismos que amplificam ou atenuam a energia de algumas frequências dependendo do tipo de medida que se pretende utilizar. O circuito A é o mais utilizado para medir os ruídos contínuos e intermitentes em ambientes de trabalho, pois estabelece medidas que simulam a percepção da orelha humana principalmente nas faixas de frequências sonoras que podem causar lesão na orelha humana, ou seja, as altas frequências (faixa de 1000 a 6000 Hz). O decibel (A) [dB(A)], portanto, é apenas uma unidade que indica que a intensidade do ruído foi medida utilizando

o circuito de compensação A (Russo, 1997). De qualquer forma, a intensidade sonora fica melhor ilustrada com a comparação apresentada na Figura 2.

1.4.2. - Ruído.

Pode-se afirmar que para o ser humano a sensação sonora é variável de indivíduo para indivíduo, dependendo também da situação e ambiente onde a pessoa se encontre. Assim, alguns sons que são prazerosos para uma pessoa podem ser desagradáveis para outra, dependendo do local e atividade que a pessoa estiver realizando. Dessa forma, o som que é chamado de ruído é desconfortável e indesejável, porém essa percepção vai depender do ouvinte e do seu interesse. O grande problema é que atualmente consideramos o ruído um elemento normal do nosso dia a dia. Um exemplo disso é que até o buscamos em nosso lazer: casas de espetáculos, cinemas, boates, estádios e ginásios esportivos e vários outros estabelecimentos que freqüentamos nos momentos de descontração ou têm o ruído como uma característica inerente ou dependem da existência de sofisticados sistemas não só para a reprodução como para a amplificação do som. Convivemos com o ruído do trânsito, dos alto-falantes de divulgação, das máquinas pesadas em funcionamento e da própria multidão de pessoas em comunicação nas grandes cidades, aceitando-o como normal e inevitável. Em várias cidades do mundo o nível de ruído aumenta na razão de 2 dB, em média, por ano (Normas e Manuais Técnicos do Ministério da Saúde, 2006).

A grande preocupação com o ruído vem do fato de que ele é prejudicial para a saúde do organismo como um todo, não apenas para a audição, podendo estar relacionado com insônia, redução de capacidade de coordenação motora, distúrbios de comportamento, alterações gastrintestinais, alterações da visão e cardio-circulatórias, e há relatos de aumento de casos de hipertensão arterial em consequência do ruído (Andren et al., 1982; Harlan et al., 1981; Ruiz e col. 1995; Ising e Kruppa, 2004; Babish, 2006; Kawada, 2004; Schell e col., 2006)

Segundo Russo (1997), normas internacionais estabelecem que o ruído pode ser classificado segundo a variação de seu nível em função do tempo em:

- contínuo – ruído com variações de níveis desprezíveis durante o período de observação;
- intermitente – ruído cujo nível varia em um valor apreciável durante o período de observação;
- ruído de impacto ou impulso – ruído que se apresenta em picos intensos de energia acústica por um breve período (inferior a 1 segundo)

Nosso contato com o ruído pode ser precoce. Existem estudos avaliando o impacto do ruído sobre gestantes e sobre o feto mostrando que as mulheres podem apresentar problemas na gestação, como hipertensão, hiperemese gravídica, parto prematuro e bebês de baixo peso, enquanto que o feto pode até mesmo sofrer lesões auditivas irreversíveis (Lalande e col., 1986; Nurminen e Kurpa, 1989;

Nurminen, 1995; Hartikainen e col., 1994; Kawada, 2004; Schell e col., 2006). Caso um recém nascido necessite de incubadora, poderá ser exposto a um ruído de até 140 dB(A) (Bess e col., 1979). Muitos brinquedos, nos dias de hoje, têm como uma de suas características a emissão de vários ruídos cuja intensidade pode ultrapassar os 100 dB(A) (Celani, 1991).

Atividades industriais e de prestação de serviços que utilizam maquinaria pesada e ruidosa são relativamente comuns na nossa sociedade. Portanto, a exposição de indivíduos aos ruídos que causam lesões na orelha interna humana é freqüente em certos ambientes de trabalho, com importantes implicações sociais e econômicas. A perda de audição ocupacional apresenta consequências legais definidas por legislação e normatização específicas. A perda auditiva relacionada à exposição ao ruído no ambiente de trabalho é conhecida como "Perda Auditiva por Exposição a Ruído Ocupacional" (PAIRO), "Perda Auditiva Ocupacional", "Surdez Profissional" e "Disacusia Ocupacional".

O contato com ambientes de trabalho ruidosos vem se intensificando desde a revolução industrial, porém, a preocupação com o prejuízo à saúde do trabalhador exposto é relativamente recente. Nos Estados Unidos e Europa essa preocupação remonta à década de 1940, ainda assim, como resposta ao alto custo social e econômico que recaiu sobre as indústrias devido às pesadas indenizações trabalhistas. No Brasil, entretanto, a legislação sobre o tema somente começou a ser implantada no fim da década de 1970 com a portaria 3214 de 1978 (Almeida e col., 2000) estabelecendo a obrigatoriedade dos exames audiométricos admissionais, periódicos e demissionais, sempre que o ambiente de trabalho apresentar níveis de pressão sonora superiores a 85 dBA em 8 horas de exposição. Essa portaria estabelece também limites de exposição (Tabela 2) e diferencia ruídos contínuos dos impulsivos. Por fim, a Norma Regulamentadora (NR) 15 da portaria 3214/78 define também os critérios ambientais que caracterizam o trabalho considerado insalubre por exposição ao ruído.

A PAIR constitui-se em doença profissional de enorme prevalência em nosso meio, ocorrendo em numerosos ramos de atividades (Ordem De Serviço INSS/DSS Nº 608, 1998). A Portaria 19/1998 estabelece a definição da PAIR ocupacional, diretrizes e parâmetros mínimos para a avaliação e acompanhamento da saúde auditiva dos trabalhadores expostos ao ruído e, por fim, fornece subsídios para prevenção de ocorrência de casos de PAIR ocupacional em empresas onde esse risco exista. A portaria determina, ainda, que o diagnóstico diferencial é de responsabilidade do médico coordenador do PCMSO (Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional) de cada empresa, ou de médico encarregado pelo mesmo para realizar o exame médico. Devido à complexidade, inclusive no âmbito legal, de um caso de PAIR ocupacional, médicos do trabalho e otorrinolaringologistas em geral referem-se aos casos de PAIR ocupacionais ou não, como quadros com “audiometria sugestiva de

Figura 2: Níveis sonoros (dBA) de algumas situações do dia-a-dia (baseada em Russo, 1997).

Tabela 2: Limites de Tolerância (LTs) para ruído contínuo ou intermitente (NR-15)

Nível de ruído dB(A)	Máxima exposição diária permitida
85	8 horas
86	7 horas
87	6 horas
88	5 horas
89	4 horas e 30 minutos
90	4 horas
91	3 horas e 30 minutos
92	3 horas
93	2 horas e 30 minutos
94	2 horas
95	1 hora e 45 minutos
98	1 hora e 15 minutos
100	1 hora
102	45 minutos
104	35 minutos
105	30 minutos
106	25 minutos
108	20 minutos
110	15 minutos
112	10 minutos
114	8 minutos
115	7 minutos

PAIR”. Nesse trabalho, vamos utilizar o termo PAIR, seja ela ocupacional ou não, e todas as menções a casos de PAIR referem-se a casos onde existem “curvas audiométricas sugestivas de PAIR”, assim, acatando os diagnósticos realizados por médicos do trabalho segundo os parâmetros estabelecidos na portaria 19/1998.

1.4.3. - Susceptibilidade genética e PAIR.

A PAIR, assim como a deficiência auditiva em geral, é uma entidade clínica altamente heterogênea. Tanto a literatura especializada como os profissionais da área destacam a ampla variabilidade dos quadros e “susceptibilidades” verificadas entre os indivíduos. Não é raro que, entre os funcionários de uma empresa expostos ao mesmo tipo de ruído, sejam observados alguns que desenvolvam perdas precoces, outros que desenvolvam perdas mais tardias e alguns que mantenham a audição normal mesmo após anos de exposição. Essas observações sugerem que pode haver fatores genéticos que influenciam a susceptibilidade individual à PAIR. Se a PAIR for realmente uma entidade influenciada pelos genes, o modelo de herança multifatorial é o mais atraente como

candidato a explicar as observações (Van Camp, 2007). Outro indício da participação de fatores genéticos influenciando é a aparente maior resistência à exposição aos ruídos que indivíduos negros apresentam em comparação com os brancos. Jerger e col. (1986) compararam os limiares auditivos de bombeiros com PAIR decorrente da exposição às sirenes. Contaram com 28 homens negros e 28 homens brancos, pareados de acordo com a idade, de acordo com o tempo de trabalho na corporação e quanto à exposição ao ruído fora do local de trabalho. Os autores sugeriram que os brancos seriam mais susceptíveis porque observaram que a perda de audição entre eles era mais grave do que a observada nos negros. Outro estudo realizado por Henselman e col. (1995) avaliou os limiares auditivos registrados pelo programa de conservação da audição do exército americano durante o ano de 1989. Os autores puderam contar com uma amostra de mais de 30.000 soldados americanos expostos ao ruído. Entretanto, não foi possível estabelecer para os indivíduos dessa amostra qual a real exposição ao ruído, se o ruído era intermitente, contínuo ou de impacto. Ainda assim, os autores puderam verificar que houve uma diferença significativa entre os limiares auditivos de negros e brancos. Os autores observaram que os soldados negros apresentavam a audição melhor do que os brancos.

A PAIR é um distúrbio auditivo de etiologia complexa. Um dos fatores endógenos que poderia ajudar a explicar o mecanismo da lesão na orelha interna induzida pelo ruído seria a participação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estudos “*in vitro*” e pesquisas com animais têm fornecido evidências que corroboram essa hipótese (Yamasoba e col., 1998 e 1999; Ohinata e col., 2000 e 2003; Van Campen e col., 2002; Kopke e col., 2002; Pourbakht e Yamasoba, 2003; Lynch e Kil, 2005; Tanaka e col., 2005). Lynch e Kil (2005) realizaram uma revisão na literatura sobre as estratégias utilizadas para reduzir a incidência ou mesmo tratar a PAIR em modelos animais e em humanos. Um dos pontos importantes abordados pelos autores foi o uso de fármacos com ação antioxidante, intervenção precoce apontada como uma das mais promissoras, justamente por serem substâncias que atuam reduzindo a formação e a atividade das EROs.

Um dos principais antioxidantes endógenos do organismo é a glutathiona (GSH). Trata-se de um tripeptídeo hidrossolúvel formado pelos aminoácidos cisteína, ácido glutâmico e glicina. Seu grupo tiol é um potente agente redutor e a GSH é o tiol intracelular de pequeno peso molecular mais abundante, alcançando concentrações de milimolares em alguns tecidos. Tem papel fundamental na desintoxicação de uma ampla variedade de compostos eletrofílicos e de peróxidos, via reações catalisadas por enzimas das famílias das glutathionas S-transferases (GST) e das glutathionas peroxidases (GPx). Sua importância é evidenciada pela presença desse tripeptídeo em vegetais, mamíferos, fungos e inclusive em alguns organismos procariotos. A glutathiona é sintetizada a partir dos aminoácidos glicina, cisteína e ácido glutâmico com a participação consecutiva de duas enzimas: γ -glutamilcisteína sintase, que tem como substratos o glutamato e a cisteína produzindo γ -

glutamilcisteína que reage com uma glicina devido à ação da enzima glutathione sintase (revisão em Townsend e col., 2003) gerando a glutathione. Alterações de concentração iônica, principalmente do K^+ , poderiam afetar o transporte celular do glutamato, afetando a concentração presente de glutathione, levando ao aumento de EROs na orelha interna. Por causa disso, já foi aventada a hipótese de que mutações no gene *GJB2* também poderiam tornar a cóclea mais sensível ao ruído (Smith e Taggart, 2004), já que o produto do gene *GJB2*, proteína constituinte das junções comunicantes intercelulares, atua na reciclagem do potássio.

A existência de mutações no DNA mitocondrial associadas à manifestação de deficiência auditiva herdada não-sindrômica, quando aliada ao fato de que essa organela é a maior fonte de EROs no organismo, é um indício de que talvez genes mitocondriais também possam ter papel relevante na etiologia da PAIR. Assim, nossa hipótese é a de que a PAIR poderia resultar da interação entre diversos fatores genéticos e do ambiente. Do mesmo modo que a manifestação do fenótipo da mutação A1555G é intensificada pelo fator ambiental, que é a exposição aos antibióticos aminoglicosídeos, indagamos nesse estudo se a susceptibilidade que cada indivíduo tem à perda de audição induzida por ruído, considerada também ambiental, seria influenciada por fatores genéticos.

De forma geral, os genes candidatos analisados em estudos sobre susceptibilidade genética à PAIR são aqueles envolvidos basicamente em duas vias metabólicas: a homeostase iônica e as defesas do organismo contra o estresse oxidativo. Carlsson e col. (2004) a partir de uma amostra de 1.200 trabalhadores suecos expostos ao ruído testaram a presença da mutação 35delG em 103 indivíduos suscetíveis ao ruído, 112 resistentes ao ruído e 30 indivíduos selecionados aleatoriamente da população. Apenas dois indivíduos foram detectados como portadores dentre os 245 indivíduos testados, ambos pertencentes ao grupo de indivíduos suscetíveis ao ruído. Segundo os autores, não houve diferença significativa nas frequências de portadores da mutação 35delG nos três grupos. Recentemente, Van Eyken e col. (2007) estudaram a contribuição da mutação 35delG para a presbiacusia (em 2.311 indivíduos de vários países europeus) e para a PAIR. O estudo relativo à PAIR foi realizado a partir de 4.500 trabalhadores poloneses de várias categorias, expostos ao ruído. A partir dessa amostra os autores selecionaram dois grupos, um contendo 10% dos indivíduos mais resistentes ao ruído e 10% dos indivíduos sensíveis ao ruído. A frequência da mutação 35delG nos trabalhadores resistentes ao ruído foi de 2,4% e nos sensíveis foi de 2,3%. Os autores concluíram que, devido ao tamanho de sua amostra, a contribuição da mutação 35delG na manifestação da PAIR estaria praticamente afastada. Van Laer e col. (2006) realizaram estudo de associação envolvendo 35 polimorfismos (SNP) de dez genes candidatos numa amostra de 218 indivíduos (114 resistentes e 104 sensíveis ao ruído) selecionados a partir de uma amostra de 1.261 trabalhadores suecos expostos ao ruído. Os autores encontraram diferenças significativas nas frequências de polimorfismos entre indivíduos sensíveis e resistentes em três genes que codificam proteínas de canais iônicos: *KCNE1*

com três SNP associados, *KCNQ1*, um SNP associado e *KCNQ4*, também com um SNP. Assim, os autores sugerem que os genes *KCNE1*, *KCNQ1* e *KCNQ4* sejam os primeiros genes identificados de susceptibilidade à PAIR.

As GSTs são uma importante família de enzimas que catalizam a conjugação de substâncias exógenas tóxicas com a glutathione. Participam do metabolismo de agentes quimioterapêuticos utilizados no tratamento de cânceres, do metabolismo de inseticidas, de herbicidas, de carcinógenos e de sub-produtos relacionados ao estresse oxidativo (Hayes e col., 2005). Assim, os genes nucleares *GSTM1* (localizado em 1p13.3 e que codifica a enzima glutathione S-transferases μ 1) e *GSTT1* (localizado em 22q11.23 e que codifica a enzima glutathione S-transferases θ 1) têm sido apontados como importantes candidatos a apresentar relação com a variação da predisposição individual a desenvolver doenças relacionadas com fatores ambientais nocivos para a saúde, como câncer, presbiacusia e mesmo PAIR (Pemble e col., 1994; Xu e col. 1998; Sprenger e col., 2000; Au e col., 2001; Forsberg e col., 2001; Strange e col., 2001; Rabinowitz e col., 2002; Townsend e col., 2003; Ates e col., 2005; Carlsson e col., 2005 e Hayes e col., 2005, para revisão).

Alguns indivíduos da população podem apresentar ausência da atividade das enzimas codificadas pelos genes *GSTM1* e *GSTT1*. Como a atividade dessas enzimas é conjugar a glutathione com toxinas endógenas ou exógenas, os indivíduos que apresentam atividade dessas enzimas são chamados “conjugadores”. Os indivíduos com o fenótipo de ausência da atividade são denominados “não-conjugadores”. Indivíduos não-conjugadores em relação a enzima glutathione S-transferase μ 1 (*GSTM1*) apresentam deleção dos exons 4 e 5 de ambos os alelos do gene *GSTM1*, apresentando o que é chamado de genótipo nulo ou 0/0 (Seidegard e Pero, 1988, Brockmöller e col., 1993). No caso do gene *GSTT1*, ocorre a deleção do gene todo e homozigotos em relação a essa deleção também apresentam o chamado genótipo nulo ou 0/0 (Pemble e col., 1994), sendo não-conjugadores quanto à atividade da enzima glutathione S-transferase θ 1 (*GSTT1*). Os alelos nulos desses genes ocorrem com frequência elevada na população geral, caracterizando um polimorfismo. Portadores homozigotos da deleção dos exons 4 e 5 do gene *GSTM1* distribuem-se nas diferentes populações com frequências que vão de desde 22% entre os nigerianos a 63% nos chineses. Nos Estados Unidos, 40% dos descendentes de mexicanos apresentam genótipo 0/0 enquanto os afro-americanos apresentam apenas 23% de indivíduos com o genótipo nulo. Já a frequência do genótipo nulo para o gene *GSTT1* varia de 9% a 65% nas diferentes populações, com uma média de aproximadamente 30% (Au e col., 2001; Townsend e col., 2003; Cho e col., 2005; Bolt e Their, 2006).

Rabinowitz e col. (2002) determinaram o genótipo relativo aos genes *GSTM1* e *GSTT1* de 58 trabalhadores expostos a ruído, de três indústrias. Encaminharam amostras do soro congelado desses indivíduos para análise bioquímica para ser estabelecida a concentração sanguínea das vitaminas “C” e “E” (importantes antioxidantes obtidos na dieta). Por fim, por meio de timpanometria, audiometria

tonal e produto de distorção de emissões otoacústicas evocadas (PDEOAE), foi avaliada a audição desses indivíduos. Com base em sua análise estatística concluíram que: 1) a enzima GSTM1 proporcionava alguma proteção contra a lesão causada pela exposição ao ruído, enquanto que enzima GSTT1 parece não exercer esse papel. 2) não havia correlação entre o limiar auditivo e o nível de vitamina “E”. 3) não havia correlação entre o limiar auditivo e o nível de vitamina “C”; concluíram, portanto, que essas duas vitaminas não teriam ação protetora quando há exposição ao ruído. 4) negros e mulheres expostos ao ruído apresentavam limiares auditivos melhores. Entretanto, os autores enfatizam que seu estudo não permitiu conclusões definitivas, uma vez que foi conduzido com uma amostra muito pequena.

Carlsson e col. (2005) selecionaram entre 1.200 trabalhadores expostos a ruído da Suécia os 10% mais susceptíveis e os 10% mais resistentes a PAIR, totalizando cerca de 200 indivíduos, para estudar a participação de sete genes nucleares envolvidos nas vias de proteção contra estresse oxidativo (*GSTM1*, *GSTT1*, *CAT*, *SOD*, *GPX*, *GSR* e *GSTP1*). Não houve diferença significativa entre a frequência dos alelos e dos genótipos entre os grupos dos “mais suscetíveis” e dos “mais resistentes”. Assim, os autores não encontraram dados que apóiem que a variação genética no conjunto de enzimas antioxidantes estudadas tenha papel na susceptibilidade à PAIR. No entanto, excluíram do estudo uma parcela significativa da amostragem.

Cadoni e col. (2006) investigaram a associação entre surdez súbita e polimorfismos nos genes *GSTM1* e *GSTT1*, também partindo da hipótese da participação das EROs nas lesões cocleares que ocorrem nesse tipo de perda de audição. Os autores realizaram o estudo com 80 pacientes italianos comparados com 80 indivíduos controle da mesma população. Os autores não verificaram diferenças estatísticas significativas em relação às frequências dos genótipos nulos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* entre os dois grupos. Segundo os autores, os poucos estudos sobre surdez súbita são inconclusivos.

Fortunato e col. (2004) estudaram em uma amostra de 94 trabalhadores a associação da manifestação entre a PAIR e polimorfismos em quatro enzimas importantes na defesa antioxidante do organismo. A SOD2 – superóxido dismutase mitocondrial converte o radical livre superóxido, muito reativo, em peróxido de hidrogênio, uma substância menos reativa que é rapidamente neutralizada pela catalase. As paraoxonases (PON) constituem uma família de três enzimas (PON1, PON2 e PON3) cujos substratos e funções biológicas não estão totalmente esclarecidos, mas que dentro das células parecem ter papel na proteção antioxidante; no sangue seriam encontradas associadas às lipoproteínas de alta densidade, aparentemente auxiliando na proteção do organismo contra doenças vasculares como a aterosclerose. Os autores verificaram a associação da PAIR com dois polimorfismos no intron 3 do gene da enzima SOD2 (IVS3-23T/G e IVS3-60T/G) e com um polimorfismo da enzima PON2. Os autores observaram também associação significativa com a idade e com o tabagismo.

A participação de fatores genéticos e a importância das vias de proteção antioxidante na etiologia da PAIR têm recebido contribuições de estudos recentes sobre as proteínas chamadas HSPs (*Heat Shock Proteins*). São proteínas filogeneticamente conservadas relacionadas com a proteção do organismo contra uma série de agressões do ambiente como aquecimento excessivo, falta de oxigenação e exposição a ruídos de intensidade elevada. Como as primeiras proteínas dessa família foram estudadas em organismos expostos a variações de temperatura, essas proteínas foram denominadas hsp (Yoshida e col., 1999; Altschuler e col., 2002; Niu e Canlon, 2002; Prell e col., 2003; Sugahara e col., 2003; Yang e col., 2004; Fairfield e col., 2005; Mikuriya e col., 2005; Yuan e col., 2005; Yang e col., 2006).

Yoshida e col., em 1999, realizaram estudos com camundongos onde observavam que exposição dos animais ao calor levava ao aumento da expressão do gene da proteína HSP70 e que a audição dos animais estava mais protegida contra ruídos intensos caso fossem expostos ao calor antes de serem expostos ao ruído. Yang e col. em 2004, na China, investigaram a relação da presença de anticorpos contra as proteínas HSP60 e HSP70 e a PAIR em uma amostra de 399 trabalhadores expostos a ruídos com intensidades que variavam de 75 a 115 dB. Os autores realizaram imunoenaios para os anticorpos anti-HSP60 e anti-HSP70 e observaram que os indivíduos com PAIR moderada para as altas frequências apresentavam aumento significativo de anti-HSP70 ($p < 0,05$) e indivíduos com PAIR moderada para as baixas frequências apresentavam aumento significativo de anti-HSP60 ($p < 0,01$). Baseados em seus resultados os autores propuseram que os anti-corpos anti-HSP60 e anti-HSP70 podem ter papel na etiologia da PAIR. Entretanto, o exato mecanismo para a ação desses anticorpos na evolução da PAIR ainda necessita de maiores estudos. Yang e col. (2006) genotiparam uma amostra de 194 trabalhadores chineses expostos ao ruído quanto aos polimorfismos 190A/B (rs1043618), 1267A/B (rs1061581), 2437A/B (rs2227956) nos genes *HSP70-1*, *HSP70-2* e *HSP70-hom*, todos localizados no cromossomo 6. Os autores determinaram a frequência dos haplótipos, obtendo nessa amostra seis diferentes haplótipos, sendo que dois deles apresentaram uma frequência significativamente maior no grupo dos afetados por PAIR do que no grupo dos não afetados.

Marano e Ghassemifar (2007), utilizando culturas de queratinócitos humanos da membrana timpânica, analisaram o efeito do choque sonoro sobre a regulação da transcrição de genes que codificam proteínas relacionadas com vias de proteção anti-apoptose: β -actina, Bcl-2a Hsp 27, Hsp60, Hsp 70 e Hsp 90. Culturas primárias de queratinócitos foram expostas ao ultra-som por um curto período para simular uma exposição aguda ao ruído. Após quinze minutos, 2 horas e 24 horas de recuperação as células foram estudadas por meio de técnicas de PCR quantitativo (*real time PCR*) e imuno ensaio (*slot blot immuno-analysis*). Os autores, ao longo do tempo de recuperação, observaram a regulação diferenciada das expressões de todas as proteínas sob análise. Segundo os

autores os níveis dos RNAm coincidiram com os níveis de seus produtos para as proteínas β -actina e Bcl-2a, indicando que elas parecem ser controladas no momento da transcrição. O resultado foi diferente para as proteínas da família das HSPs, pois não houve coincidência entre os níveis dos RNAm e das proteínas sintetizadas. Portanto, o controle transcricional dessas proteínas parece envolver mecanismos mais complexos. Sha e col. (2007) utilizando camundongos verificaram que a exposição ao ruído pode levar à redução da quantidade de ATP intracelular e alterações na permeabilidade das membranas mitocondriais. Esse desequilíbrio ativaria vias de sinalização que culminariam com o desarranjo dos estereocílios das células ciliadas e por fim à morte dessas células. Gong e col. (2007a) utilizando a técnica de *micro-array* (*Affymetrix GeneChip*) compararam o padrão de expressão gênica na cóclea de ratos não expostos ao ruído com ratos que foram expostos. Assim, verificaram que houve aumento na expressão dos genes que codificam proteínas da família das HSP e de pelo menos outros 100 genes. Por outro lado, houve diminuição na expressão de genes de caspases, de proteínas de ligação aos ácidos nucléicos bem como de genes relacionados com a função mitocondrial. Portanto, todos eles são candidatos a ser genes relacionados com a manifestação da em teoria PAIR.

Gong e col., (2007b) analisaram se a expressão do gene que codifica a proteína HSF1 ajudaria a proteger a cóclea contra lesões induzidas por ruído. A proteína HSF1 é um fator de transcrição que regula a expressão de proteínas HSP. Em animais, tanto o calor quanto o ruído de intensidade moderada conferem proteção para a cóclea contra lesões causadas pelo ruído intenso e a proteína HSF1 é candidata a atuar nessa via de proteção. Os autores utilizaram linhagens de camundongos sem o gene da proteína Hsf1 (genótipo nulo $Hsf1^{-/-}$) e de linhagens heterozigotas ($Hsf1^{+/-}$) e verificaram que os camundongos heterozigotos quando expostos ao calor apresentavam uma rápida indução da expressão de várias proteínas HSP em suas cócleas, alteração que não ocorria nos camundongos $Hsf1^{-/-}$. Entretanto, os autores verificaram que o ruído não tinha efeito tão intenso: a indução da expressão de proteínas HSP nos camundongos $Hsf1^{+/-}$ foi menor e, apesar de baixa, houve transcrição dos RNAm das proteínas HSP nos camundongos da linhagem $Hsf1^{-/-}$. Segundo os autores, esse resultado indica que a proteção da cóclea contra o ruído pelas HSPs deve resultar de outras vias de ativação além da indução por HSF1.

Konings e col. (2007) realizaram estudo onde a partir uma amostra de 1.261 trabalhadores suecos expostos ao ruído somados a 4.500 trabalhadores poloneses de várias categorias expostas ao ruído. A partir desse amostra os autores selecionaram dois grupos, um contendo 10% dos indivíduos mais resistentes ao ruído e 10% dos indivíduos sensíveis ao ruído em outro. Os autores estudaram por meio de análises de polimorfismos do tipo SNP se variantes no gene da enzima catalaze (*CAT*) poderiam estar associadas à manifestação da PAIR. Os autores verificaram entre os indivíduos com PAIR o aumento na frequência de dois SNP no gene *CAT* na amostra sueca e de cinco na amostra

polonesa, sendo dois deles compartilhados pelas duas amostras. Entretanto, essa associação só foi significativa quando os autores subdividiram a amostra e consideraram apenas o grupo exposto a ruídos superiores a 92 dB. Os autores concluíram que o gene *CAT* pode ser um gene de susceptibilidade a PAIR, mas que os efeitos de polimorfismos nesse gene só podem ser percebidos quando a intensidade do ruído é levada em conta.

Além desses genes, existem estudos relacionando a PAIR com genes ligados à presbiacusia, pelo menos em camundongos. As regiões dos cromossomos de camundongo que são associadas à presbiacusia foram batizadas de *ahl* (*Age-related Hearing Loss*). Existem estudos que mostram que alelos de genes localizados nessas regiões, além de causar a presbiacusia, também tornaram os animais mais susceptíveis ao ruído (Davis e col., 1999; Harding e col., 2005; Morita e col., 2007).

A importância da ocorrência de parentes afetados por perda de audição na susceptibilidade à PAIR é classicamente aceita entre os profissionais da área de saúde auditiva, porém esse aspecto nunca foi detalhadamente explorado nos estudos sobre PAIR. Alguns estudos sobre PAIR tentam levantar a ocorrência de parentes dos sujeitos afetados por perda de audição, induzida por ruído ou não (Klockhoff e Lyttkens, 1982; Correa Filho e col., 2002). Entretanto, freqüentemente esses estudos não aprofundaram a análise desse dado, uma vez que a maioria deles tem como objetivo confirmar elementos do ambiente de trabalho como causa da perda de audição para propor medidas que atenuem o problema. Assim, a presença da história familiar positiva pode, inclusive, significar a exclusão do sujeito da análise ambiental realizada nesses estudos (Willson e col., 1979; Klockhoff e Lyttkens, 1982; Chuden, 1983; Helmkamp e col., 1984; Talbott e col., 1985; Wu e col., 1987; Almeida e col., 2000; Teixeira e col., 2003; Fleig, 2004; Schmuziger e col., 2006).

O estudo de Klockhoff e Lyttkens (1982) apresentou resultados interessantes, apesar de não focalizar diretamente a questão da PAIR. Os autores, em um estudo caso/controle, reavaliaram, entre outros dados, as audiometrias, os quadros clínicos e o histórico familiar, de trinta crianças que apresentavam curvas audiométricas sugestivas de PAIR, porém, sem nunca terem sido expostas ao ruído. Verificaram a ocorrência de história familiar positiva para problemas auditivos em 76% das crianças com curvas audiométricas sugestivas de PAIR, contra 17% das crianças do grupo controle. A conclusão dos autores foi de que o principal fator etiológico do distúrbio de audição presente nessas crianças era a história familiar.

Correa Filho e col. (2002), em seu estudo sobre a prevalência da PAIR e de hipertensão em 104 condutores de ônibus no município de Campinas, verificaram que 77,9% dos trabalhadores que participaram do estudo mencionaram não ter parentes com problemas auditivos na família contra 22,12% que referiram ter. O diagnóstico de PAIR foi confirmado em 32,7% dos trabalhadores. Entretanto, os autores aparentemente não realizaram a comparação das freqüências dos casos familiares de problemas auditivos observada nos trabalhadores com PAIR em relação a freqüência

observada nos trabalhadores sem PAIR. O estudo que dedicou alguma atenção à análise do histórico da família foi realizado em 2005 por Guerra e col., que estudaram 182 trabalhadores de uma empresa metalúrgica do Rio de Janeiro. Verificaram em apenas 18% da sua amostra de indivíduos com PAIR a ocorrência de outros casos de problemas auditivos. Nesse estudo, a prevalência de casos sugestivos de PAIR foi menor entre os trabalhadores com história familiar de déficit auditivo.

Além de estudos relacionados a marcadores genéticos, é possível estudar a geração de espécies reativas de oxigênio por meio de marcadores bioquímicos. Proteínas, lipídeos e DNA reagem com as EROs produzindo compostos bioquímicos característicos que podem ser detectados e mensurados. A susceptibilidade dos indivíduos a PAIR poderia ser resultado da maior ou menor eficiência de vias bioquímicas relacionadas com a proteção do organismo contra o dano produzido por EROs e essa diferença de eficiência pode estar refletida na diferença na concentração de marcadores bioquímicos encontrados no soro dos indivíduos (Rabinowitz e col., 2002; Van Campen e col., 2002; Arguelles e col., 2004).

Portanto, apesar da importância da PAIR como uma questão de saúde pública, trabalhista e social, ainda são poucos os estudos sistemáticos sobre a susceptibilidade genética a essa condição. A compreensão das bases genéticas dessa característica complexa poderá fornecer ferramentas importantes para a compreensão dessa susceptibilidade, para o manejo dos indivíduos sob risco, diagnóstico diferencial, redução na ocorrência de casos, tratamento e até mesmo a cura. Dada a importância da mitocôndria na homeostase energética e na produção de EROs endógenas, dois pontos que aparentemente são centrais na patogênese da PAIR, os genes mitocondriais são ótimos candidatos a atuarem na manifestação da PAIR. Até o momento, esse é o primeiro trabalho que investiga a associação entre mutações no DNAm e a PAIR.

II - OBJETIVOS

II - OBJETIVOS

O objetivo desse estudo é estudar a influência de fatores genéticos na susceptibilidade à Perda Auditiva Induzida por Ruído (PAIR). Para atingir esse objetivo comparamos uma amostra de indivíduos com PAIR e de indivíduos sem PAIR que trabalharam expostos a ruído quanto a:

- a. Ocorrência de história familiar de deficiência auditiva e/ou PAIR.
- b. Frequência de mutações responsáveis por surdez de herança autossômica recessiva nos genes das conexinas 26(*GJB2*) e 30 (*GJB6*), em homozigose ou heterozigose.
- c. Frequência de mutações mitocondriais nos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1*.
- d. Frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos nos genes *GJB2*, no gene da Conexina 26 e nos genes *GSTM1* e *GSTT1*, que codificam as enzimas glutathione S-transferases da classe $\mu 1$ e $\theta 1$ respectivamente, previamente relacionadas à proteção contra o estresse oxidativo.

O segundo objetivo de nosso estudo é contribuir para o esclarecimento da patogênese da PAIR por meio de estudos funcionais, quantificando a geração de EROs em indivíduos que manifestam PAIR e que não manifestaram mesmo após exposição ocupacional ao ruído. Para isso, realizamos tentativas de padronização de uma metodologia de quantificação de EROs e radicais livres no soro de indivíduos afetados por PAIR e de indivíduos normais.

III – CASUÍSTICA e MÉTODOS

III – CASUÍSTICA e MÉTODOS

III.1. - Casuística.

Nossa amostra consiste de 255 indivíduos selecionados por trabalharem há pelo menos cinco anos em ocupações que os expõem ao ruído, dos quais obtivemos amostras de sangue para extração de DNA. Os indivíduos da casuística eram condutores de transporte coletivo urbano e profissionais que atuam junto à maquinaria pesada que produz ruído, como metalúrgicos, oriundos de uma mesma empresa e funcionários de uma gráfica de grande porte, ambas empresas sediadas na cidade de São Paulo. Outros indivíduos foram encaminhados diretamente ao nosso atendimento no Centro de Estudos do Genoma Humano. Os condutores do transporte coletivo urbano foram averiguados por meio de uma listagem fornecida pelo CEREST (Centro de Referência de Saúde do Trabalhador) e outros foram convidados a participar da pesquisa no Sindicato dos Motoristas e Trabalhadores em Transporte Rodoviário Urbano de São Paulo.

A perda de audição ocupacional é uma entidade clínica com consequências legais, definida por legislação e normatização específicas, de difícil diagnóstico e caracterização. Assim, o item 5 da Portaria 19/1998 determina que o diagnóstico diferencial da PAIR é de responsabilidade do médico do trabalho das empresas onde exista a exposição ao ruído. Os limites de tolerância de um indivíduo a exposição de ruído, contínuo ou intermitente, estão definidos na Norma Regulamentadora (NR) 15 da Portaria nº 3.214/78 do Ministério do Trabalho e são apresentados na Tabela 2. Assim, todos os locais de trabalho que apresentarem níveis de ruído iguais ou superiores aos descritos na Tabela 2 apresentam risco para a saúde auditiva do trabalhador.

Estabelecida a existência de exposição a ruído no ambiente de trabalho, o item 3 da Portaria 19/1998 determina que os trabalhadores sejam submetidos a exames audiométricos admissionais, periódicos (ou seqüenciais) e demissionais, todos observando um repouso auditivo de pelo menos 14 horas antes da realização dos exames. O acompanhamento da saúde auditiva do trabalhador é realizado por meio da comparação entre um exame audiométrico de referência com os seqüenciais. O exame audiométrico de referência permanece o mesmo até o momento em que algum dos exames audiométricos seqüenciais apresentar sugestão de PAIR. Então, o trabalhador realiza um novo exame audiométrico que passará a ser o novo exame audiométrico de referência. Os exames anteriores passam a constituir o histórico evolutivo da audição do trabalhador. O médico do trabalho deve interpretar os resultados desses exames audiométricos para a prevenção e para o diagnóstico da PAIR. O item 4 da Portaria 19 apresenta os seguintes parâmetros para diagnóstico:

- São considerados dentro dos limites aceitáveis os audiogramas que mostram limiares auditivos menores ou iguais a 25 dB(NA), em todas as frequências examinadas.

- São considerados sugestivos de PAIR os audiogramas com limiares auditivos acima de 25 dB(NA) nas frequências de 3.000 e/ou 4.000 e/ou 6.000 Hz e mais elevados do que nas demais frequências testadas, estando estas comprometidas ou não, tanto no teste da via aérea quanto da via óssea, em um ou em ambos os lados.
- São considerados sugestivos de desencadeamento de PAIR os casos em que a comparação entre audiogramas mostra alterações dos limiares auditivos, desde que preencham um dos critérios abaixo:
 - a. a diferença entre as médias aritméticas dos limiares auditivos no grupo de frequências de 3.000, 4.000 e 6.000 Hz iguala ou ultrapassa 10 dB(NA);
 - b. a piora em pelo menos uma das frequências de 3.000, 4.000 ou 6.000 Hz iguala ou ultrapassa 15 dB(NA).
- São considerados sugestivos de agravamento da PAIR, os casos já confirmados nos quais a comparação entre os exames audiométricos mostrem:
 - a. a diferença entre as médias aritméticas dos limiares auditivos no grupo de frequência de 500, 1.000 e 2.000 Hz, ou no grupo de frequências de 3.000, 4.000 e 6.000 Hz iguala ou ultrapassa 10 dB(NA);
 - b. a piora em uma frequência isolada iguala ou ultrapassa 15 dB(NA).

Além desses parâmetros, para que se caracterize de fato a PAIR, a perda de audição tem de ser irreversível, de progressão gradual ao longo do tempo de exposição ao risco, se iniciar em uma ou mais frequências da faixa de 3.000 a 6.000 Hz, podendo atingir as demais frequências que, porém, levarão mais tempo para serem afetadas. Por fim, uma vez cessada a exposição, deve cessar também a progressão da perda auditiva.

Assim, o diagnóstico dos quadros dos indivíduos participantes do estudo não fez parte do escopo desse trabalho. Aceitamos nesse estudo a classificação dos médicos do trabalho que avaliaram clinicamente e que subdividiram os indivíduos estudados em três grupos: PAIR – indivíduos que apresentam alterações nas curvas audiométricas sugestivas de PAIR; NORMAL – os indivíduos expostos ao ruído por pelo menos 5 anos com curvas audiométricas dentro da normalidade e PANO (perda de audição não ocupacional) – indivíduos com curvas audiométricas alteradas mas que não são sugestivas de PAIR. A casuística e sua distribuição nos grupos NORMAL, PANO e PAIR, segundo a classificação adotada nesse estudo, estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Distribuição da casuística de acordo com a ocorrência de perda de audição e das profissões dos indivíduos estudados.

	NORMAIS	PANO	PAIR	TOTAIS
Motoristas e cobradores de ônibus	2	5	81	88
Gráficos	102	39	15	156
Metalúrgicos	0	0	11	11
TOTAL	104	44	107	255

Para os estudos bioquímicos relacionados à geração de EROs reconvocamos 15 indivíduos classificados como PAIR e 15 indivíduos classificados como NORMAL, pareados segundo idade e sexo, para coleta de amostras de soro.

Todos os indivíduos que aceitaram participar do estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas – USP (CEPSH-ICB/USP) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, parecer nº 2089/2003).

III.2. – Métodos.

III.2.1. - Anamnese e levantamento da história familiar.

Todas as pessoas que concordaram em participar do estudo foram submetidas à anamnese para levantamento de seus dados cadastrais, histórico familiar e profissional, além de informações sobre outras possíveis causas ambientais para os distúrbios auditivos. A ficha de anamnese está apresentada no anexo 1.

A ocorrência de problemas auditivos em outros membros das famílias dos indivíduos que constituem a amostra foi indagada para a confecção de genealogias. Cada indivíduo que mencionou a existência de pessoas com “problemas de audição”, “dificuldade de escutar” ou possibilidade de outro afetado na família foi questionado quanto à existência de diagnóstico audiológico do distúrbio, uso de prótese auditiva, idade de manifestação e existência de fatores ambientais que poderiam justificar a presença do distúrbio nos outros afetados da família. Aqueles casos onde o parente afetado apresentava perda decorrente de algum fator obviamente ambiental, exceto exposição ao ruído, foram considerados como casos negativos para a ocorrência de história familiar. Em um outro tipo de análise, consideramos também todas as ocorrências de distúrbio de audição, incluindo as provavelmente ambientais, como histórico familiar positivo.

Os indivíduos da casuística foram classificados em grupos de acordo com sua etnia em “brancos”, “pardos”, “negros”, “indígenas” ou “asiáticos”. A origem dos ancestrais maternos e paternos foi indagada para todos os indivíduos. Assim, foram classificados como “brancos” os

indivíduos que afirmaram que os quatro avós eram descendentes de europeus. Aqueles indivíduos que eram capazes de referir na história dos ancestrais a miscigenação entre europeus e africanos, europeus e indígenas, indígenas e africanos ou entre indígenas, africanos e europeus foram considerados “pardos”. Indivíduos com os quatro avós, maternos e paternos, com origem africana, foram classificados como “negros”. Receberam a classificação “indígenas” os indivíduos cujos quatro avós eram descendentes de indígenas. Finalmente, os sujeitos com ancestrais paternos e maternos japoneses ou chineses foram classificados como “asiáticos”. Caso o indivíduo declarasse não conhecer a origem dos seus ancestrais, a classificação foi baseada na aparência facial e na tonalidade da pele.

Por fim, foi indagada a ocorrência do tabagismo e do alcoolismo social entre os participantes. Foram considerados fumantes aqueles que fumavam pelo menos um cigarro diariamente. Foram considerados como apresentando o hábito de alcoolismo social aqueles que admitiam beber pelo menos uma dose de bebida alcoólica diariamente ou que relatavam que pelo menos uma vez por semana se embriagavam.

III.2.2. - Estudos moleculares.

III.2.2.1. - Extração de DNA.

Foi colhida uma amostra de sangue de todos os indivíduos que aceitaram o convite para participar do estudo. O DNA foi extraído através de técnicas de rotina no Laboratório de Genética Humana, inicialmente por meio de fenol/clorofórmio e, posteriormente, com a utilização de sistemas de purificação de DNA genômico a partir de sangue periférico, principalmente o *GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit* (GE Healthcare).

A concentração de DNA das amostras foi determinada em espectrofotômetro *HITACHI – U-2000 SPECTROPHOTOMETER* e posteriormente, amostras de DNA diluídas foram submetidas aos procedimentos descritos a seguir:

III.2.2.2. - Triagem da mutação 35delG no gene da conexina 26 (GJB2).

A triagem consistiu de uma PCR alelo-específica, descrita por Scott e col. (1998), que utiliza um conjunto de três *primers* designados: COM (5' GAA GTA GTG ATC GTA GCA CAC GTT CTT GCA 3'), NOR (5' TTG GGG CAC GCT GCA GAC GAT CCT GGG GAG 3') e MUT (5' TTG GGG CAC GCT GCA GAC GAT CCT GGG GAT 3').

O *primer* NOR é desenhado de modo a hibridar e permitir a amplificação apenas da sequência selvagem. O *primer* MUT hibrida apenas com a sequência mutada. Cada amostra é submetida a duas reações, uma delas em que estão presentes os *primers* COM e NOR e na outra estão presentes os *primers* COM e MUT. O fato de ocorrer amplificação em uma ou outra ou em ambas as reações

indica os genótipos homozigoto selvagem, homozigoto mutado ou o heterozigoto (Figura 3).

Figura 3: Fotografia do minigel de agarose 2% apresentando resultados de um dos testes realizados em pacientes do Laboratório de Genética Humana da USP afetados por surdez, para estudo da mutação 35delG. **(A)** Padrão de bandas da reação utilizando os *primers* COM e NOR. **(B)** Padrão de bandas da reação utilizando os *primers* MUT e NOR. Pista PM = padrão de peso molecular 100 pb. Pista 1 = padrão de bandas de um indivíduo com a mutação 35delG em heterozigose, utilizado em todos os testes como controle das reações. Pistas 2, 3, 4 = Indivíduos que não apresentam a mutação 35delG, homozigotos selvagens. Pista 5 = Indivíduo com a mutação 35delG em homozigose. Pista 6 = Indivíduo com a mutação 35delG em heterozigose.

A solução para a reação que amplifica a sequência selvagem deve conter 0,5 μ M do *primer* COM e 0,5 μ M do *primer* NOR; a outra solução deve conter 0,5 μ M de *primer* COM e 0,5 μ M de *primer* MUT; em ambas são utilizados 30 ng de DNA total; 1U Taq polimerase (*GE Healthcare*); 1,5 mM $MgCl_2$; 20 mM TRIS pH = 8,4 e 50 mM KCl; 0,2 mM dNTPs (*GE Healthcare*). A PCR consistiu de desnaturação inicial – 5 min a 95°C, 30 ciclos de desnaturação – 40 s a 95°C, hibridação 30 s a 60°C e extensão 1 min a 72°C e extensão final de 10 min a 72°C.

O produto da PCR foi submetido a uma eletroforese em minigel de agarose 2%, a 100V, por cerca de trinta minutos. A visualização das bandas nesse gel foi feita utilizando um transiluminador de luz UV após coloração com brometo de etídeo e o registro do resultado foi feito através de uma fotografia do gel (Figura 3).

III.2.2.3. - Triagem da mutação 167delT no gene da conexina 26 (GJB2).

Para a detecção da mutação 167delT foram utilizados os *primers* 1F 5' GTG TTG TGT GCA TTC GTC TTT TC- 3'e 3R – 5' ACC TTC TGG GTT TTG ATC TCC TC 3' que amplificam um fragmento de 425 pb que inclui a região da mutação 167delT. A solução de reação deve conter de 100 ng a 200 ng de DNA total; 0,5 µM do *primer* 1F e 0,5 µM do *primer* 3R; 1 U de Taq polimerase (*GE Healthcare*); 1,5 mM MgCl₂; 20 mM TRIS pH = 8,4 e 50 mM KCl, 0,2 mM dNTPs (*GE Healthcare*). A PCR é do tipo *Touchdown-PCR* que consiste de um ciclo de 5 min de desnaturação inicial a 94°C, com 14 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, hibridação a 69°C por 40 s com a redução dessa temperatura em 0,5°C em cada ciclo, com extensão por 1 min a 72°C. Em seguida são realizados 23 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, hibridação a 62°C por 40 s, extensão a 72°C por 1 min, por fim, uma extensão final de 10 min a 72°C.

Esse fragmento amplificado foi digerido com a enzima *PstI* (Zelante e cols, 1997). A digestão do fragmento com essa enzima origina quatro fragmentos de restrição (150pb, 138pb, 69pb e 68pb) nas amostras dos indivíduos que não apresentam a mutação e três fragmentos (219pb, 138pb e 68pb) nas amostras que apresentam a mutação, uma vez que essa deleção acarreta a perda de um sítio de restrição para essa enzima. Heterozigotos em relação a essa deleção apresentam os fragmentos de 219pb, 150pb, 138pb, 69pb e 68pb (Figura 4).

Figura 4: Imagem de gel de poliacrilamida a 6% apresentando resultados de testes realizados em pacientes do Laboratório de Genética Humana da USP afetados por surdez para a detecção da mutação 167delT. Pista PM = padrão de peso molecular 50 pb. Nas pistas de 1 e 2 é possível visualizar as bandas de 68pb, 69pb, 150 pb, 138pb e 219pb que indicam que esse indivíduo possui a mutação 167delT em heterozigose. Já nas pistas de 3 a 6 temos as bandas de 68pb, 69pb, 150 pb e 138pb, características dos indivíduos que não apresentam a mutação, portanto homozigotos normais.

Os fragmentos foram separados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, a 100V, por uma hora e meia. A visualização dos fragmentos foi feita após impregnação do gel por nitrato de prata, conforme descrito por Santos e col. (1993). O gel corado e fixado foi transferido para

papéis celofane molhados e esticados sobre vidro. Este último procedimento serviu para secagem e posterior armazenamento do gel por longos períodos (Figura 4).

III.2.2.4. - Triagem das mutações $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ no gene da conexina 30 (*GJB6*).

As deleções que abrangem segmentos do cromossomo 13 que incluem o gene *GJB6* denominadas $\Delta(GJB6-D13S1830)$, descrita por del Castillo e col (2002) e $\Delta(GJB6-D13S1854)$, identificada por del Castillo e col. (2005), foram investigadas por meio de uma PCR multiplex que tria a presença de ambas as deleções (protocolo baseado em del Castillo e col., 2005). Foram utilizados os *primers* *GJB6*-1R, 5'-TTT AGG GCA TGA TTG GGG TGA TTT-3' e BKR-1, 5'-CAC CAT GCG TAG CCT TAA CCA TTT T-3', que amplificam a região da junção do ponto de quebra da deleção $\Delta(GJB6-D13S1830)$; DelBK1, 5'-TCA TAG TGA AGA ACT CGA TGC TGT TT-3' e DelBK2, 5'-CAG CGG CTA CCC TAG TTG TGG T-3', para amplificação do ponto de quebra da deleção $\Delta(GJB6-D13S1854)$; *primer* Cx30Ex1A, 5'-CGT CTT TGG GGG TGT TGC TT-3' e *primer* Cx30Ex1B, 5'-CAT GAA GAG GGC GTA CAA GTT AGA A- 3' que amplificam o exon 1 do gene *GJB6* como controle interno da eficácia das reações de amplificação e para indicar a presença das deleções em heterozigose. A solução de reação deve conter de 100 ng a 200 ng de DNA total; 0,5 μ M do *primer* *GJB6*-1R, 0,5 μ M do *primer* BKR-1, 0,5 μ M do *primer* DelBK1, 0,5 μ M do *primer* DelBK2, 0,5 μ M do *primer* Cx30Ex1A e 0,5 μ M do *primer* Cx30Ex1B; 1 U de Taq polimerase (*GE Healthcare*); 1,5 mM $MgCl_2$; 20 mM TRIS pH = 8,4 e 50 mM KCl, 0,2 mM dNTPs (*GE Healthcare*) A PCR é mesma *Touchdown-PCR* com os ciclos descritos na mutação 167delT (item III.2.2.3). Indivíduos que não são portadores das mutações têm como produto dessa PCR a banda controle de 333 pb que corresponde ao exon 1 do gene *GJB6*. A presença da mutação $\Delta(GJB6-D13S1830)$ em heterozigose acarreta a amplificação de uma banda de 460 pb, além da banda controle, enquanto a deleção $\Delta(GJB6-D13S1854)$ em heterozigose acarreta a amplificação de uma banda de 564 pb, também associada com a banda controle (Figura 5).

O produto da PCR foi submetido a uma eletroforese em minigel de agarose 2%, a 100V, por cerca de trinta minutos. A visualização das bandas nesse gel foi feita utilizando um transiluminador de luz UV após coloração com brometo de etídeo e o registro do resultado foi feito através de uma fotografia do gel (Figura 5)

Figura 5: Fotografia do minigel de agarose 2% apresentando resultados de testes realizados em pacientes do Laboratório de Genética Humana da USP afetados por surdez para a detecção de portadores das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$: Pista 1 = padrão de bandas de uma pessoa portadora da deleção $\Delta(GJB6-D13S1830)$ em heterozigose. Pista 2 = padrão de bandas de uma pessoa portadora da deleção $\Delta(GJB6-D13S1854)$ em heterozigose. Estes dois indivíduos heterozigotos foram utilizados em todos os testes como controle das reações e do padrão de bandas. Pistas 3, 4 e 5 = Indivíduos que não apresentam as deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$, homozigotos selvagens.

III.2.2.5. - Triagem da mutação A1555G no gene mitocondrial MT-RNR1 (subunidade 12S RNAr).

O teste de detecção da mutação A1555G foi baseado no protocolo descrito por Estivill e col. (1998). Utiliza-se de 100 ng a 200 ng de DNA total; 0,4 μ M de cada *primer* (5' GCT CAG CCT ATA TAC CGC CAT CTT CAG CAA 3' e 5' TTT CCA GTA CAC TTA CCA TGT TAC GAC TGG 3'); 1 U de Taq polimerase (*GE Healthcare*); 1,5 mM MgCl₂; 20 mM TRIS pH = 8,4 e 50 mM KCl, 0,2 mM dNTPs (*GE Healthcare*). A solução foi submetida aos ciclos da PCR a seguir: 5 min de desnaturação inicial a 72°C; 30 ciclos de desnaturação – 30 s a 94°C, hibridação – 1 min a 53°C, extensão – 2 min a 72°C e 10 min de extensão final a 72°C, o par de *primers* amplifica uma região de 339 pares de bases (pb). Nessa região existe naturalmente um sítio de clivagem da enzima de restrição *Hae* III. O segundo *primer* foi desenhado de forma a produzir um segundo sítio artificial de restrição para *Hae* III caso ocorra a mutação. A guanina sublinhada é uma substituição artificial, pois nessa posição deveria haver uma timina. Assim, nos produtos de PCR deve sempre existir um sítio de restrição, controle da eficácia da digestão, presente em todos os indivíduos, que produz dois fragmentos: um de 216 pb e outro com 123 pb (Figura 6). O outro sítio criado artificialmente deve ocorrer apenas nos portadores da mutação A1555G e divide o fragmento de 123 pb em dois: um com 93 pb e outro com 30 pb (Figura 6).

Os fragmentos foram separados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, a 100V, por uma hora e meia. A visualização dos fragmentos foi feita após impregnação por nitrato de prata, conforme descrito por Santos e col. (1993). O gel corado e fixado foi transferido para papéis

celofane molhados e esticados sobre vidro. Este último procedimento serviu para secagem e posterior armazenamento do gel por longos períodos (Figura 6).

Figura 6: Fotografia de gel de poliacrilamida a 6% apresentando resultados de testes realizados em pacientes do Laboratório de Genética Humana da USP afetados por surdez para a detecção da mutação A1555G. PM = padrão de peso molecular utilizado foi o DNA do fago Φ X174 digerido com a enzima *HaeIII* (*Invitrogen*). Pista 1 = estão indicadas as bandas de um indivíduo que não apresentou a mutação. Pistas 2 a 4 = indivíduos de uma mesma família, todos portadores da mutação A1555G.

III.2.2.6. - Análise dos polimorfismos dos genes *GJB2*, *GSTM1* e *GSTT1* para estudos de associação.

A) Determinação do Genótipo quanto ao SNP 877098 no gene *GJB2*.

Rothrock e col. (2003) estudaram amostras da Itália, EUA e Brasil de indivíduos com surdez em relação a diversos polimorfismos no gene *GJB2* com o objetivo de estudar as origens da mutação 35delG. O marcador rs877098, um polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) vizinho aos genes *GJB2* e *GJB6*, foi o que apresentou a maior frequência de heterozigose na amostra brasileira dentre os marcadores estudados pelos autores. Por isso, decidimos realizar estudos de associação no gene *GJB2* com esse marcador polimórfico. Utilizando o programa Primer3 v. 0.2 (Rozen e Skaletsky, 2000) desenhamos os *primers* *GJB2*SNPcódg 5'-GAA CAC ATG AGT ATG GCA GAT GA3' e *GJB2*SNPmolde 5'-TGG AAG AGG GGT TAG GAT CA3', que amplificam a região que contém o polimorfismo e o *primer* *GJB2*SNPrs877098 5'-AGG GAG CTT GGA AAT GAA TT3' que permite identificar a ocorrência do alelo “C” ou “T” por meio do *MegaBace SNUPe Genotyping Kit* (*GE Healthcare*), segundo instruções do fabricante. A determinação dos genótipos foi realizada através do programa de computador que faz parte do pacote de programas específicos do analisador genético

MegaBace TM 1000.

B) Análise dos polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*.

Nesse estudo, o protocolo de análise desses dois polimorfismos foi baseado no trabalho de Abdel-Rahman e col. (1996) que triaram a presença das deleções (alelo nulo) dos genes *GSTM1* e *GSTT1* por meio de uma PCR multiplex utilizando os *primers* M1[+] 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C 3' e M1[-] 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G 3', para identificar o alelo nulo do gene *GSTM1* e os *primers* T1[+] 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC 3' e T1[-] 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA 3', para identificar o alelo nulo do gene *GSTT1*; os *primers* 1A1intCon[+] 5'-GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT 3' e 1A1intCon[-] 5'-CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC 3' amplificam o exon 7 do gene *CYP1A1*, como controle interno da eficácia da reação. Utiliza-se de 100 ng a 200 ng de DNA total; 0,4 µM do *primer* M1[+], 0,4 µM do *primer* M1[-], 0,4 µM do *primer* T1[+], 0,4 µM do *primer* T1[-], 0,4 µM do *primer* 1A1intCon[+] e 0,4 µM do *primer* 1A1intCon[-]; 1 U de Taq polimerase (*GE Healthcare*); 1,5 mM MgCl₂; 20 mM TRIS pH = 8,4 e 50 mM KCl, 0,2 mM dNTPs (*GE Healthcare*). As condições de reação foram: desnaturação inicial por 5 min a 94°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 2 min, hibridação a 59°C por 1 min e 1 min de extensão a 72°C, encerrando a PCR com 10 min de extensão a 72°C. A amplificação do gene *GSTM1* produz uma banda de 215 pb e a ausência dessa banda identifica o genótipo nulo (0/0). A presença do gene *GSTT1* gera uma banda de 480 pb e ausência dessa banda identifica o genótipo nulo (0/0) nesse gene. Todas as reações devem apresentar a banda controle de 312 pb para serem consideradas válidas (Figura 7).

O produto da PCR foi submetido a uma eletroforese em minigel de agarose 2%, a 100V, por cerca de trinta minutos. A visualização das bandas nesse gel foi feita utilizando um transiluminador de luz UV após coloração com brometo de etídeo e o registro do resultado foi feito através de uma fotografia do minigel (Figura 7).

III.2.2.7. - Triagem de outras mutações no DNA mitocondrial.

Estudos recentes indicaram que a técnica de dHPLC (*Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*) tem o potencial de detectar mutações no DNAm em heteroplasmia, com frequências a partir de 3% (Christodoulou e col., 2002). Esse aparelho contém uma matriz de cromatografia capaz de reter a dupla fita de um fragmento de DNA liberando-a mediante ao fluxo de um gradiente de agente desnaturante em uma temperatura específica constante. Essa temperatura é

escolhida por programa de computador fornecido juntamente com o aparelho, com base na sequência de bases do fragmento a ser testado. Na técnica de dHPLC, são comparadas as sequências de um fragmento de DNA a ser testado com a de um controle. Os produtos de PCR correspondentes a esses fragmentos de DNAs são misturados e desnaturados. Então, é permitida sua renaturação de modo que se formam homoduplexes (hibridação entre as fitas das amostras teste/teste ou controle/controle) ou heteroduplexes (hibridação entre as fitas teste/controle). Se ocorrer diferença entre as sequências de bases do DNA teste e do controle, os heteroduplexes apresentarão ponto ou pontos de emparelhamento incorreto e serão formadas três classes de moléculas de DNA: os heteroduplexes, os homoduplexes teste/teste e os homoduplexes controle/controle. A matriz da cromatografia tende a reter os heteroduplexes por menos tempo que os homoduplexes. Nesse caso, ocorrerão dois ou até mesmo três momentos distintos de liberação das moléculas de DNA, indicando a presença de diferenças entre o DNA teste e o controle. Foi utilizada a técnica de dHPLC para triar mutações nos genes mitocondriais *MT-RNR1* (gene da subunidade 12S do RNRr) e *MT-TS1* (gene do RNAt^{SER(UCN)}).

Figura 7: Fotografia do minigel de agarose 2% apresentando resultados de um dos testes realizados em amostras de indivíduos participantes desse estudo para a detecção dos alelos nulos dos genes *GSTM1* e *GSTP1*: PM = padrão de peso molecular 100 pb. Pista 1 = presença apenas da banda de 312 pb indicando um indivíduo com o genótipo nulo para os genes *GSTM1* e *GSTT1*. Pistas 2 e 3 = presença das bandas de 215 pb e 312 pb indicando indivíduos com o genótipo 0/0 para o gene *GSTT1* e 0/1 para o gene *GSTM1*. Pistas 4 e 5 = presença das bandas de 312 pb e 480 pb indicando indivíduos com o genótipo 0/0 para o gene *GSTM1* 0/1 para o gene *GSTT1*. Pistas 6 e 7: presença das bandas de 215 pb, 312 pb e 480 pb indicando que os indivíduos possuem pelo menos um alelo normal em ambos os genes *GSTM1* e *GSTT1*.

Um único indivíduo foi utilizado com o controle em todas as reações de formação de heteroduplexes. Esse indivíduo teve os genes *MT-RNR1* e *MT-TS1* completamente sequenciados e a sequência é igual à de referência de Anderson e col. (1981), exceto pela presença da variante 1438G ao invés da 1438A, presente na sequência de referência.

A) PCR do gene mitocondrial *MT-RNR1* para análise por meio de dHPLC.

Para a análise por meio de dHPLC desenhamos *primers* de modo a dividir o gene em dois amplicons, de cerca de 590 pb cada um, utilizando o programa Primer3 v. 0.2 (Rozen e Skaletsky, 2000). O amplicon “A” compreende as posições 591 a 1154 do DNAm e é delimitado pelos *primers* 591(L): 5’ CCT CCT CAA AGC AAT ACA CTG A 3’ e 1154(R): 5’ TGT GGC TCG TAG TGT TCT GG 3’ produzindo um fragmento de 564 pb. O amplicon “B” estende-se da posição 1091 até 1678 do DNAm sendo delimitado pelos *primers* 1091(L): 5’ TGC TTA GCC CTA AAC CTC AA 3’ 1678(R): 5’ GGT TTA GCT CAG AGC GGT CA 3’ produzindo um fragmento de 588 pb. A solução de reação deve conter de 100 ng a 200 ng de DNA total; 0,5 µM do *primer* 591(L), 0,5 µM do *primer* 1154(R) para o amplicon “A” e 0,5 µM do *primer* 1091(L), 0,5 µM do *primer* 1678(R) para o amplicon “B”; em ambos os casos a solução é completada com 1 U de Taq polimerase (*GE Healthcare*); 1,5 mM MgCl₂; 20 mM TRIS pH = 8,4 e 50 mM KCl, 0,2 mM dNTPs (*GE Healthcare*). A PCR é mesma *Touchdown-PCR* com os ciclos descritos na mutação 167delT (item III.2.2.3).

B) PCR do gene mitocondrial *MT-TS1* para análise por meio de dHPLC.

Escolhemos para essa análise a sequência de *primers* utilizada por Hutchin e col. (2000). Trata-se de um segmento com 216 pb contido entre os *primers* correspondentes aos nucleotídeos das posições 7392-7410 (5’GGA TGC CCC CCA CCC TAC C3’) e da sequência complementar às posições 7608-7588 (5’CCT ACT TGC GCT GCA TGT GCC3’). Utilizou-se de 100 ng a 200 ng de DNA total; 0,4 µM do *primer* 7392-7410 e 0,4 µM do *primer* 7608-7588; 1 U de Taq polimerase (*GE Healthcare*); 1,5 mM MgCl₂; 20 mM TRIS pH = 8,4 e 50 mM KCl, 0,2 mM dNTPs (*GE Healthcare*). Os ciclos da PCR são os mesmos descritos para a mutação 167delT (item III.2.2.3).

C) Reação para formação de heteroduplexes.

A presença de heteroplasmia nas mitocôndrias leva à produção de heteroduplexes sem a necessidade de se misturarem amostras teste e controle. Assim, o produto do PCR do DNAm de cada indivíduo foi submetido a duas reações para formação de heteroduplexes: uma sem o uso de DNAm controle para detecção da heteroplasmia e outra com controle para a detecção de mutações em homoplasmia. Essas soluções foram submetidas à 95°C por cinco minutos em banho-maria e deixadas resfriar naturalmente até a temperatura ambiente. Após a reação para formação de heteroduplexes as

amostras foram encaminhadas para análise por dHPLC.

D) Análise no dHPLC.

MT-RNR1 amplicon “A” – as amostras foram injetadas e analisadas sob as temperaturas de 55°C, 57°C e 59°C.

MT-RNR1 amplicon “B” – as amostras foram injetadas e analisadas sob as temperaturas de 57°C, 57,5°C e 59°C.

MT-TS1 – as amostras foram injetadas e analisadas sob as temperaturas de 55 °C, 57 °C e 59 °C.

E) Teste da eficácia de detecção de heteroplasmia.

Padronizamos a triagem de mutações no gene *MT-TS1* (região entre nt 7392 a 7608) simulando a presença de heteroplasmia, misturando amostras de DNA com seqüências diferentes (com mutação e sem mutação) em proporções que variaram de 5% a 50% para a mutação G7521A (Figura 8). Realizamos os mesmos testes para o estudo da região entre os nucleotídeos 591 e 1154 do gene *MT-RNR1* e obtivemos resultados similares, com um padrão claro para a detecção da presença da mutação A1555G em frequências de DNA mutado que variaram de 5% a 50%.

F) Seqüenciamento dos amplicons detectados como alterados pelo dHPLC.

Os indivíduos nos quais as análises por dHPLC indicaram a presença de alterações tiveram os respectivos amplicons seqüenciados. No caso do gene *MT-RNR1* foi necessário desenhar *primers* internos aos amplicons “A” e “B” já que o seqüenciamento apresenta melhor qualidade e confiabilidade em fragmentos de até 300 pb. Assim, uma solução contendo 50 a 60 ng do produto do amplicon “A” foi submetida a duas novas *Touchdown-PCR* (mesmos ciclos já descritos), uma utilizando os *primers* 591(L) e 893(R): 5’ CTG GCA CGA AAT TGA CCA AC 3’ e outra os *primers* 783(L): 5’ AAC GCT TAG CCT AGC CAC AC 3’ e 1154(R). O mesmo ocorreu com o fragmento correspondente ao amplicon “B”, onde se utilizaram para amplificar o primeiro fragmento os *primers* 1091 (L) e 1466(R): 5’ GGC CCT GTT CAA CTA AGC AC 3’ e, para o segundo, 1375(L): 5’ CCC CAG AAA ACT ACG ATA GCC 3’ e 1678(R), novamente com as mesmas condições já descritas. O amplicon que contém o gene *MT-TS1* não necessitou de alteração nos *primers* utilizados para a análise com dHPLC para ser seqüenciado por causa do seu pequeno tamanho.

Figura 8: Após PCR das amostras “teste” (DNAm já seqüenciado de um indivíduo portador do polimorfismo G7521A) e “controle” (DNAm já seqüenciado e sem alterações) as amostras foram misturadas em proporções conhecidas e submetidas à reação para formação de homoduplexes ou heteroduplexes. A) Curva de detecção pelo dHPLC do homoduplex formado com a amostra controle. B) Curva de detecção pelo dHPLC do heteroduplex formado com 50% da amostra controle e 50% da amostra teste. C) Curva de detecção pelo dHPLC do heteroduplex formado com 75% da amostra controle e 25% da amostra teste. D) Curva de detecção pelo dHPLC do heteroduplex formado com 90% da amostra controle e 10% da amostra teste. E) Curva de detecção pelo dHPLC do heteroduplex formado com 95% da amostra controle e 5% da amostra teste.

Purificaram-se os produtos da PCR com o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). A concentração dos produtos de PCR após a purificação foi estimada em seguida por meio da comparação com o “Low DNA mass ladder” (Invitrogen) em eletroforese em minigel de agarose 2%. A seguir procedeu-se com uma reação de seqüenciamento onde adicionou-se cerca de 60 ng dessa amostra de DNA a uma solução contendo inicialmente 5μM de um dos respectivos *primers* e 4 μl do *DYEnamic ET terminator reagent premix*, completando-se o volume final de reação para 10 μl. Essa mistura foi submetida a 20 ciclos de desnaturação por 20 s a 95°C, de hibridação por 15 s a 55°C (todos os *primers* dos amplicons “A” e “B” do gene *MT-RNR1*) ou a 60°C (amplicon do gene *MT-TS1*) e de extensão por 1 min a 60°C.

O seqüenciamento dos fragmentos produzidos a partir de ambos os *primers* (*forward* e *reverse*) foi analisado no aparelho MegaBACE TM 1000 da Amersham Biosciences.

III.2.2.8. - Determinação dos Haplogrupos do DNA mitocondrial.

A) Identificação do macro-haplogrupo africano L.

O Macro-Haplogrupo L, é caracterizado pela presença do sítio de restrição para a enzima *Hpa I* na posição 3.592 do DNA mitocondrial. Para a identificação dos indivíduos pertencentes ao macro-haplogrupo L (L1+L2), amplificamos por PCR o segmento de interesse com os *primers* (5' TAC TAC AAC CCT TCG CTG AC 3' e 5' CTA GGG TGA CTT CAT ATG AG 3'). As reações de PCR foram realizadas em volumes de 25 µl, contendo 100-200 ng de DNA, 45 pmol de cada *primer*, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 20 mM TRIS-HCL pH=8,4 e 1,25 U de Taq polimerase (*GE Healthcare*). Para a amplificação foram realizados 34 ciclos de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos seguidos por uma desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridação a 53 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 10 minutos. As reações de digestão pela enzima de restrição *Hpa I* foram realizadas em volumes de 20µl, contendo 13, 25µl de H₂O, 5µl da amostra de DNA, 1µl de buffer da enzima *Hpa I* e 7,5 U de *Hpa I*, correspondendo a 0,75µl da enzima. Os fragmentos resultantes da digestão foram analisados em gel de agarose a 2% corado com Brometo de Etídeo e exposto à luz UV. A presença de uma banda de 150 pb (correspondendo a dois fragmentos de 150 pb) indica que a digestão pela enzima ocorreu, portanto, a amostra pertence às linhagens africanas L1 ou L2.

B) Identificação do haplogrupo B.

Para a identificação do haplogrupo B de origem ameríndia, o segmento de DNA de interesse foi amplificado com os *primers* (5' TAC TAC AAC CCT TCG CTG AC 3' e 5' CTA GGG TGA CTT CAT ATG AG 3'). A PCR foi realizada em volumes de 25µl, contendo 100-200 ng de DNA, 45 pmol de cada *primer*, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 20 mM TRIS-HCL pH = 8,4 e 1,25 U de Taq polimerase (Invitrogen). Para as amplificações foram realizados 35 ciclos de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, uma desnaturação seguinte a 94 °C durante 20 segundos, hibridação a 55°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. O produto da PCR foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose a 3% a fim de se detectar a deleção de 9 pb, localizada entre os genes da COII (sub-unidade II da citocromo c oxidase) e do RNAt^{Lys}, característica desse haplogrupo. Existem algumas linhagens africanas com o sítio *Hpa I* na posição 3.592 do DNA mitocondrial e a deleção de 9pb. Assim, para confirmar o indivíduo como pertencente ao haplogrupo B ele deve apresentar somente a deleção e não o sítio para a enzima *Hpa I*.

C) Sequenciamento da região hipervariável (HVS-I).

Para o sequenciamento da região hipervariável do DNA mitocondrial (HVS I), o segmento de DNA de interesse foi amplificado com os primers (5' TCA AAG AAC CCT ACA CCA GTC TTG TAA AAC C 3' e 5' CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG 3'). Em seguida foi feita a purificação do produto da PCR e uma reação de sequenciamento com temperatura de hibridação de 60°C. Ambos procedimentos foram realizados conforme já descrito no item anterior (III.2.2.7.E). Alguns indivíduos da casuística foram sequenciados com os primers *forward* e *reverse*, também por meio do aparelho MegaBACE TM 1000 da Amersham Biosciences. O resultado do sequenciamento foi comparado visualmente com a sequência padrão de Anderson e col (1981) entre as posições 16010 e 16498. As posições das substituições encontradas foram marcadas em cada amostra e o conjunto das substituições encontradas foi comparado com a literatura, o que nos permitiu classificar os haplogrupos mitocondriais.

III.2.3. - Estudos de Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) no Soro dos Indivíduos.

Esse estudo foi realizado em colaboração com o Prof. Luís Eduardo Soares Netto, do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP.

A existência de diferenças entre as taxas de produção de EROs em 15 indivíduos do grupo NORMAL em comparação com 15 indivíduos do grupo PAIR foi verificada utilizando o ensaio FOX que detecta a formação de peróxidos (Jiang e col., 1992) e o ensaio com o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB ou reagente de Ellman (Sigma-Aldrich Co.), que detecta a presença do tiol glutationa na forma reduzida (GSH). O reagente de Ellman também pode ser utilizado para a detecção indireta da oxidação de proteínas pela ação de EROs. Os grupos sulfidril (SH) da glutationa e das proteínas reagem com o DTNB produzindo o ácido 2-nitro-5-mercaptop-benzóico (TNB), que apresenta intensa cor amarela. A razão de produção de TNB nessa reação é de um para cada SH. Reagindo com as EROs, as glutationas e os tiois das proteínas tornam-se indisponíveis para a reação com o DTNB. Portanto, é possível quantificar indiretamente a presença de EROs detectando a modificação na produção de TNB medindo sua absorbância no comprimento de onda de 412nm (Habeeb, 1972).

Os ensaios bioquímicos foram realizados com 30 indivíduos, 15 afetados por PAIR e 15 normais, emparelhados em relação à faixa etária, sexo e etnia.

As absorbâncias foram determinadas por meio dos espectrofotômetros *HITACHI – U-2000 SPECTROPHOTOMETER* ou *ANTHOS ZENYTH 200 ST* - leitor de placas.

III.2.3.1. - Reações Preliminares para Determinação do Conteúdo Protéico e para a Remoção do Ferro.

A normalização dos resultados obtidos nos ensaios bioquímicos foi importante para correção das diferenças individuais. Assim, por meio do procedimento descrito no item “A”, foi determinado o conteúdo protéico de cada amostra de soro para que as quantidades de peróxidos de lipídeos, de glutathionas e de tiois de proteínas verificadas fossem registradas em relação ao conteúdo protéico desses soros.

O elemento químico ferro (Fe), que pode estar presente nas amostras devido à hemólise, pode atrapalhar ou mesmo impedir a detecção das EROs, uma vez que o Fe tende a reagir com os marcadores da ocorrência de EROs (peróxidos e grupos tiol). Assim, as amostras foram tratadas com um agente quelante de íons metálicos, conforme procedimentos descritos no item “B”.

A) Ensaio com o Reagente Bradford – Determinação do Conteúdo Protéico.

O conteúdo protéico do soro é muito alto e as proteínas tendem a precipitar quando os reagentes são misturados, turvando a solução e atrapalhando as leituras pelo espectrofotômetro. Assim, decidimos diluir as amostras de soro.

Mistura-se 1 mL do reagente Bradford com 1 µL de soro, que deve ser diluído para concentração de 10% volume/volume. As substâncias devem reagir por 10 min. em temperatura ambiente. Mede-se a absorbância no comprimento de onda de 595 nm.

As concentrações de proteínas em mg/mL foram calculadas através de equações obtidas através de curvas de calibração com gradiente de albumina.

B) Remoção do Ferro presente nas amostras por meio da resina quelante Chelex-100.

Os procedimentos abaixo foram realizados após a determinação do conteúdo protéico do soro descrito no procedimento “A”.

Procedimento 1: Eliminação de íons metálicos do soro total

Inicialmente as amostras de soro foram expostas à resina quelante de metais Chelex-100 (BioRad) para a remoção de íons metálicos. Adicionou-se diretamente sobre o soro um volume da resina correspondente a aproximadamente um terço do volume da amostra, que foi mantida refrigerada e em agitação por uma noite.

Procedimento 2: Precipitação das proteínas do soro

Após o procedimento 1, a amostra foi acidificada com 5% de ácido tricloroacético (TCA) para

precipitar as proteínas do soro e centrifugada. A massa de proteínas precipitadas obtida foi congelada para o ensaio com DTNB.

Procedimento 3: Eliminação de íons metálicos do sobrenadante final

Como a principal fonte de ferro no sangue é a hemoglobina presente nos eritrócitos, as proteínas presentes no soro poderiam ter afetado a ação do quelante no procedimento 1. Dessa forma, a precipitação de proteínas no procedimento 2 deve provocar a liberação de ferro de precipitados de hemoglobina. Portanto, a solução resultante do procedimento 2 foi novamente tratada com a resina Chelex-100 seguindo o mesmo procedimento inicial. A solução obtida foi utilizada nos ensaios a seguir.

III.2.3.2. - Reações para Detecção de Peróxidos de Lipídios, GSH e Grupos Tiol.

A) Ensaio FOX – *Ferrous Oxidation Xilenol Orange*, para detecção de peróxidos presentes no soro dos indivíduos.

Solução 1:

Butylated HidroxTolueno (Sigma, 1378) BHT 79,8 g + metanol 90 mL

Solução 2:

Xilenol Orange 7,6 g + 90 mL da solução 1

Solução de sulfato ferroso 25 mM

196 mg de $2\text{NH}_4.\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ + 20 mL de H_2SO_4 250 mM

Solução de reação:

Para 9 partes da solução de xilenol orange em BHT (solução 2) foi adicionada 1 parte da solução de sulfato ferroso.

Ensaio:

Foram misturadas 9 partes da solução de reação com uma parte do soro diluído à 10% v/v. A reação foi incubada por 30 minutos em banho maria à 37°C. Mediu-se a absorbância da mistura para o comprimento de onda de 560 nm.

B) Ensaio com DTNB.

B.1) para detecção de GSH presentes no soro dos indivíduos.

Para cada amostra foram misturados 18,75 µL da solução de soro diluído à 10% v/v, 18,75 µL do reagente DTNB, 0,1 mM e 112,5 µL de tampão potássio/fosfato 0,1 M, pH 8 (Sambrook e Russell, 2001). Então, mediu-se a absorbância dessas soluções para o comprimento de onda de 412 nm.

B.2) para detecção de grupos tiol nas proteínas do soro dos indivíduos.

Para cada amostra foi ressuspenso em tampão potássio/fosfato 0,1 M, pH 8 um pequeno

fragmento da massa precipitada de proteínas obtida no procedimento 2 do item “III.2.3.1.B”. O conteúdo protéico dessa solução foi determinado pelo método de Bradford conforme o item “III.2.3.1.A”.

Foram misturadas 234 μL de água milliQ, 12 μL do reagente DTNB, 0,1 mM, 37 μL do tampão potássio-fosfato, 37 μL de sódio dodecil sulfato (SDS) 1% v/v e 50 μL da suspensão de proteínas. Então, mediu-se a absorbância dessa mistura para o comprimento de onda de 412 nm.

III.2.4 – Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos com a história familiar, genótipos e polimorfismos foram analisados por meio de testes tradicionais em tabelas de contingência (qui-quadrado e teste exato de Fisher) e por regressão logística. Testamos a influência do sexo, da etnia, do histórico familiar, da presença de tabagismo e de alcoolismo social, da idade e do tempo de exposição ao ruído na manifestação da PAIR por meio de modelos de regressão logística simples e múltipla. A análise de regressão logística simples e múltipla foi realizada por meio de programas comerciais (pacote de análises estatísticas *SPSS 13.0[©] for Windows*) da mesma maneira que testes tradicionais de estatística não-paramétrica (teste de Mann-Whitney). Para os demais testes empregamos programas desenvolvidos no Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP pelo grupo do Dr. Paulo A. Otto.

IV – RESULTADOS

IV – RESULTADOS

IV.1 – Caracterização da casuística e correlações entre perda de audição, sexo, etnia, história familiar, tabagismo, alcoolismos social, idade e tempo de exposição ao ruído.

A caracterização da amostra desse estudo quanto ao número de indivíduos, sua distribuição nos grupos PAIR, PANO e NORMAL e suas profissões já foram apresentadas na Tabela 3. A tabela a seguir apresenta a caracterização das amostras PAIR, PANO e NORMAL quanto ao gênero dos indivíduos (Tabela 4).

Tabela 4: Constituição das amostras PAIR, PANO e NORMAL quanto ao sexo dos indivíduos.

Amostras	Sexo		Total
	Masculino	Feminino	
PAIR	102 (95%)	5 (5%)	107
PANO	37 (84%)	7 (16%)	44
NORMAL	80 (77%)	24 (23%)	104
Total	219	36	255

O teste do qui-quadrado em tabela de contingência indicou que nesse estudo houve predomínio de homens no grupo PAIR ($p < 0,0005$) em relação ao grupo NORMAL. A proporção de homens e mulheres no grupo PANO não diferiu significativamente da observada no grupo NORMAL ($p = 0,327$). Quando os grupos PAIR e PANO foram aglutinados, houve diferença significativa na proporção entre os sexos em relação ao grupo NORMAL ($p = 0,001$). É possível explicar essa desproporção entre os sexos por um viés de averiguação, porque grande parte da amostra do grupo PAIR se constituiu de motoristas do transporte coletivo urbano. Atualmente, na cidade de São Paulo, essa profissão é exercida apenas por homens. Por essa razão, em algumas análises de regressão logística, descritas a seguir, o gênero foi incluído para verificar o efeito desse viés e foi excluído em algumas análises, quando apropriado.

A seguir apresentamos a caracterização das amostras PAIR, PANO e NORMAL quanto à etnia. (Tabela 5).

Tabela 5: Constituição das amostras PAIR, PANO e NORMAL quanto à etnia dos indivíduos.

Amostras	Brancos	Pardos	Indígenas	Asiáticos	Negros	Total
PAIR	55 (52%)	42 (39%)	3 (2%)	1 (1%)	6 (6%)	107
PANO	26 (59%)	15 (34%)	2 (5%)	0	1 (2%)	44
NORMAL	61 (59%)	37 (35%)	2 (2%)	0	4 (3%)	104
Total	142	94	7	1	11	255

Não houve diferença significativa entre os grupos NORMAL e PAIR em relação aos dois mais frequentes grupos étnicos encontrados nesse estudo, ou seja, os indivíduos classificados como “brancos” e “pardos” ($p=0,430$ na análise pelo qui-quadrado em tabela de contingência). Considerando o aglutinado PAIR+PANO também não houve diferença significativa entre as frequências de “brancos” e “pardos” em relação ao grupo NORMAL ($p=0,583$). Também testamos as demais etnias, simultaneamente por meio de análise pelo qui-quadrado em tabela de contingência e não houve diferenças significativas entre os grupos PAIR ou PANO em relação ao grupo NORMAL ($p=0,702$ para PAIR x NORMAL e $p=0,793$ para PANO x NORMAL), bem como para o aglutinado PAIR+PANO em relação ao grupo NORMAL ($p=0,815$).

A Tabela 6 apresenta o resumo dos resultados do levantamento da história familiar dos indivíduos em relação à ocorrência de perda auditiva de causa desconhecida ou PAIR e quanto à ocorrência de casos de perda auditiva provavelmente ambiental (traumatismos, infecções, meningite, perfurações de tímpano).

Tabela 6: Ocorrência de casos de perda de audição na família dos indivíduos pertencentes às amostras PAIR, PANO e NORMAL.

Amostras	Em pelo menos um parente em 1º grau	2º grau ou mais	Total de casos familiares	Com prováveis causas ambientais	Total de indivíduos com casos familiares	da amostra
PAIR	25 (23%)	14 (13%)	39 (36%)	4 (4%)	43 (40%)	107
PANO	5 (11%)	4 (9%)	9 (20%)	2 (4,5%)	11 (25%)	44
NORMAL	6 (6%)	13 (12%)	19 (18%)	5 (5%)	24 (23%)	104
Total	36	31	67	11	78 78	255

Foi realizado o teste do qui-quadrado em tabela de contingência para comparar as frequências de ocorrência de familiares com problemas de audição. Considerando o total de casos positivos (19/104 no grupo NORMAL e 39/107 entre os PAIR), foi observado aumento significativo no número de casos no grupo PAIR ($p=0,003$). Analisando os dados somente incluindo os casos em que um dos parentes afetados seja, obrigatoriamente, parente em primeiro grau (6/104 entre NORMAL e 25/107 entre os PAIR), a diferença é ainda mais significativa ($p<0,0005$). A análise comparativa entre os grupos NORMAL e PANO demonstrou que não há diferença significativa entre esses dois grupos ($p=0,756$). Já considerando o aglutinado entre PAIR e PANO em comparação com NORMAL a diferença continua significativa ($p=0,016$). Quando incluimos na análise aqueles familiares com problemas de audição decorrentes de causas provavelmente ambientais, diferentes da exposição ao ruído, as diferenças entre os grupos PAIR e NORMAL e entre os grupos PAIR+PANO e NORMAL permanecem significativas (valores de p iguais a 0,008 e 0,031, respectivamente). Em resumo, nossos dados indicam que os indivíduos com PAIR apresentam história familiar de perda auditiva significativamente mais frequente do que os indivíduos do grupo NORMAL.

A Tabela 7 apresenta as frequências do tabagismo e do hábito de consumir bebida alcoólica (alcoolismo social) entre os indivíduos da amostra.

Tabela 7: Presença de tabagismo e de alcoolismo social entre os indivíduos das amostras PAIR, PANO e NORMAL.

Amostras	Alcoolismo social			Tabagismo		
	Sim	Não	Total	Sim	Não	Total
PAIR	6 (6%)	101 (94%)	107	75 (70%)	32 (30%)	107
PANO	2 (5%)	42 (95%)	44	21 (48%)	23 (52%)	44
NORMAL	10 (10%)	94 (90%)	104	48 (46%)	56 (54%)	104
Total	18	237	255	144	111	255

A análise pelo qui-quadrado em tabela de contingência mostra que não houve diferença significativa quanto à presença de alcoolismo social entre os grupos PAIR e PANO ($p=0,791$), PAIR e NORMAL ($p=0,272$) e PAIR+PANO e NORMAL ($p=0,186$). Os resultados em relação ao tabagismo apontaram aumento significativo da frequência do tabagismo entre os indivíduos do grupo PAIR em relação aos grupos PANO ($p=0,009$) e NORMAL ($p<0,0005$) assim como na comparação entre PAIR+PANO e o grupo NORMAL ($p<0,0005$).

A tabela 8 apresenta a descrição da casuística em relação à idade e ao tempo de exposição ao ruído, ambos apresentados em anos.

Tabela 8: Médias, desvios-padrão e medianas das idades e dos tempos de exposição ao ruído nos indivíduos das amostras PAIR, PANO e NORMAL.

Amostras	Idade			Tempo de Exposição ao Ruído		
	Média	Desvio-padrão	Mediana	Média	Desvio-padrão	Mediana
PAIR	46.25	7.56	46.00	20.92	8.67	21.00
PANO	45.18	8.47	47.00	19.52	11.30	18.00
NORMAL	39.24	8.34	38.50	15.64	8.40	14.50

Comparando, por meio do teste de Mann-Whitney, as idades e os tempos de exposição ao ruído dos indivíduos dos grupos PAIR, PANO e NORMAL verificamos que não houve diferença significativa entre PAIR e PANO ($p=0,581$ em relação à idade e $p=0,154$ em relação ao tempo de exposição). Entretanto, quando consideramos a comparação entre PANO e NORMAL, houve aumento significativo das idades ($p<0,0005$) dos indivíduos do grupo PANO, mas os tempos de exposição não diferiram ($p=0,080$). Já nas análises de comparação entre o grupo PAIR em relação ao NORMAL e dos grupos PAIR+PANO também em relação ao NORMAL, tanto idade quanto tempo de exposição estavam significativamente aumentados ($p<0,0005$). Na nossa amostra, o aumento da idade e o aumento do tempo de exposição influenciaram na manifestação da PAIR.

Para testar a possível influência conjunta do sexo, etnia, presença ou não de histórico familiar, idade, tempo de exposição ao ruído e hábitos de fumar e consumir bebidas alcoólicas na manifestação

da PAIR na casuística, os dados obtidos na anamnese foram analisados por meio de regressões logísticas simples e múltipla por meio do pacote estatístico computacional *SPSS 13.0 for Windows*. Optamos por analisar a etnia agrupando categorias quando o número de indivíduos nas categorias era pequeno. Assim, mantivemos a etnia “branca” como uma categoria, agrupamos os “pardos” com os “negros” e os “indígenas” foram agrupados com os “asiáticos”, uma vez que esses pares têm maior probabilidade de serem geneticamente semelhantes. No caso da história familiar, foram incluídos todos os casos de perda auditiva, mesmo os com causa provavelmente ambiental.

A Tabela 9 apresenta os resultados da regressão logística simples realizada comparando, independentemente, cada uma das variáveis que foram estudadas. A comparação entre os grupos PAIR e PANO apontou que o risco de ocorrência da PAIR foi quase quatro vezes maior nos homens do que nas mulheres (*odds ratio*=3,859; $p=0,028$; Intervalo de Confiança - I.C. 1,154-12,913) e nos fumantes, cerca de duas vezes e meia maior do que nos não fumantes (*odds ratio*=2,567; $p=0,010$; I.C. 1,247-5,284), quando essas variáveis foram analisadas independentemente. A comparação entre os grupos PANO e NORMAL (o grupo citado em primeiro lugar sempre será o que foi tomado como referência para as análises) demonstrou que as variações da idade e do tempo de exposição nesses grupos influenciaram a manifestação de perda de audição (*odds ratio*=1,091; $p<0,0005$; I.C. 1,041-1,142 e *odds ratio*=1,040; $p=0,044$, I.C 1,001-1,081 respectivamente). As comparações do grupo PAIR em relação ao NORMAL apresentaram resultados semelhantes ao da comparação do aglutinado PAIR+PANO em relação ao NORMAL. Assim, comparando PAIR com NORMAL, o risco de ocorrência da PAIR foi cerca de seis vezes maior nos homens do que nas mulheres (*odds ratio*=6,120; $p<0,0005$; I.C. 2,236-16,753), duas vezes maior entre aqueles com história familiar positiva para a perda de audição do que entre os casos isolados (*odds ratio*=2,734; $p=0,008$; I.C. 1,553-4,814), quase três vezes maior para os fumantes do que para os não fumantes e influenciado significativamente pelo aumento da idade e do tempo de exposição ao ruído (*odds ratio*=2,734; $p<0,0005$; I.C. 1,553-4,814).

A Tabela 10 apresenta os resultados da regressão logística múltipla realizada comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL quanto à influência do conjunto de variáveis que foram estudadas nessa casuística em relação risco de ocorrência da PAIR. Comparando o grupo PAIR em relação ao PANO os resultados dessa nova análise confirmam o observado na Tabela 9. Homens aparentemente têm um risco cerca de quatro vezes maior do que as mulheres de manifestarem a PAIR (*odds ratio*=4,222 $p=0,043$; I.C. 1,044-17,065). O risco de ocorrência de PAIR foi cerca de duas vezes maior entre os fumantes em relação aos não fumantes (*odds ratio*=2,235; $p=0,042$; I.C. 1,029-4,852). Na comparação do grupo PANO em relação ao NORMAL apenas a idade manteve sua influência sobre o risco de ocorrência de perda de audição (*odds ratio*=1,130; $p=0,001$; I.C. 1,054-1,212). Nessa análise, a comparação do grupo PAIR com o NORMAL revelou que o tempo de exposição deixou de ser um fator significativo de risco, enquanto se mantiveram significativas as influências do sexo, histórico

Tabela 9: Resultados das análises de regressão logística simples comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL quanto à influência isolada de cada uma das características da casuística na manifestação da PAIR.

	PAIR x PANO			PANO x NORMAL			PAIR x NORMAL			PAIR+PANO x NORMAL		
	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%
Sexo	0,028	3,859	1,154 - 12,913	0,330	1,586	0,627 - 4,010	0,000	6,120	2,236 - 16,753	0,001	3,475	1,649 - 7,324
Branco	0,871			0,759			0,507			0,515		
P+N	0,789	1,102	0,539 - 2,255	0,894	1,053	0,496 - 2,233	0,521	1,206	0,681 - 2,135	0,269	0,564	0,205 - 1,555
I+A	0,626	1,745	0,185 - 16,447	0,459	1,667	0,432 - 6,434	0,276	1,818	0,620 - 5,334	0,424	0,654	0,231 - 1,851
HF	0,055	2,197	0,982 - 4,913	0,935	1,036	0,446 - 2,408	0,008	2,276	1,244 - 4,164	0,035	1,850	1,044 - 3,277
Tabagismo	0,010	2,567	1,247 - 5,284	0,861	1,065	0,526 - 2,158	0,000	2,734	1,553 - 4,814	0,006	2,036	1,225 - 3,386
AS	0,392	2,554	0,298 - 21,861	0,125	0,197	0,025 - 1,572	0,192	0,502	0,179 - 1,412	0,076	0,411	0,154 - 1,098
Idade	0,415	1,019	0,974 - 1,066	0,000	1,091	1,041 - 1,142	0,000	1,120	1,076 - 1,166	0,000	1,111	1,072 - 1,151
TE	0,245	1,023	0,984 - 1,064	0,044	1,040	1,001 - 1,081	0,000	1,075	1,039 - 1,112	0,000	1,063	1,031 - 1,096

Os valores significativos estão destacados em cinza. Categorias de referência: sexo feminino, etnia branca, caso isolado, ausência do tabagismo e do alcoolismo social.

I.C.=intervalo de confiança.

P+N=pardos e negros.

I+A=indígenas e asiáticos.

HF=histórico familiar.

AS=alcoolismo social.

TE=tempo de exposição.

familiar, tabagismo e idade (*odds ratio*=10,869; $p<0,0005$; I.C. 3,221-36,681; *odds ratio*=2,900; $p=0,006$; I.C. 1,347-6,245; *odds ratio*=2,470; $p=0,012$; I.C. 1,221-4,996 e *odds ratio*=1,151; $p=0,001$; I.C. 1,082-1,225, respectivamente). Por fim, considerando a comparação entre o aglutinado PAIR+PANO em relação ao NORMAL, tabagismo e tempo de exposição deixaram de ser significativos. Homens continuaram a ter maior risco aparente de ocorrência da perda de audição, cerca de cinco vezes maior do que as mulheres (*odds ratio*=5,485; $p<0,0005$; I.C. 2,317-12,986). O risco de ocorrência de distúrbios auditivos entre os indivíduos com histórico familiar de perda de audição é significativamente maior do que grupo de indivíduos sem histórico familiar (*odds ratio*=2,369; $p=0,011$; I.C. 1,218-4,605). A frequência de ocorrência de PAIR ou perda de audição também aumenta significativamente entre os indivíduos com idade maior (*odds ratio*=1,148; $p<0,0005$; I.C. 1,088-1,212).

As análises de regressão logística múltipla são influenciadas por todas as variáveis utilizadas nos testes, isto é, quanto maior o número de variáveis menor o número de indivíduos em cada categoria e menos sensível é a análise. Assim, repetimos a regressão logística incluindo apenas as variáveis que mostraram efeitos significativos nas análises anteriores (sexo, histórico familiar, tabagismo, idade e tempo de exposição). A Tabela 11 apresenta os resultados dessas análises para as comparações entre os grupos PAIR, PANO e NORMAL. Assim, considerando a comparação entre o grupo PAIR e o grupo PANO, o histórico familiar positivo tornou a chance de ocorrência de PAIR cerca de duas vezes maior do que quando não há repetição de problemas auditivos na família (*odds ratio*=2,433; $p=0,040$; I.C. 1,042-5,680). O tabagismo também aumentou a probabilidade de PAIR (*odds ratio*=2,332; $p=0,028$; I.C. 1,094-4,971). Esses resultados confirmam as observações da Tabela 10. Comparando PANO com NORMAL, apenas a idade influenciou o risco de manifestação da perda de audição (*odds ratio*=0,138; $p<0,0005$; I.C. 1,062-1,219). Quando o grupo PAIR foi comparado com o grupo NORMAL, os homens mantiveram a probabilidade cerca de oito vezes maior de ocorrência da PAIR do que as mulheres (*odds ratio*=8,804; $p<0,0005$; I.C. 2,844-27,258). A presença de histórico familiar triplicou a chance de manifestação da PAIR em relação à não ocorrência de histórico familiar (*odds ratio*=3,181; $p=0,002$; I.C. 1,507-6,712). Permaneceu a influência da idade como significativa (*odds ratio*=1,161; $p<0,0005$; I.C. 1,093-1,233). A comparação do aglutinado PAIR+PANO com o grupo NORMAL mostrou que as influências do sexo, do histórico familiar e da idade se mantiveram significativas (*odds ratio*=5,269; $p<0,0005$; I.C. 2,235; *odds ratio*=2,293; $p=0,013$; I.C. 1,192-4,408 e *odds ratio*=1,150; $p<0,0005$; I.C. 1,090-1,213, respectivamente).

Os resultados que indicam a influência significativa do sexo sobre a manifestação da PAIR são resultado do viés presente em nossa amostra que foi enriquecida com indivíduos do sexo masculino devido às próprias particularidades do estudo. Para obtermos indivíduos expostos ao ruído tivemos de optar por convidar indivíduos que exercessem profissões eminentemente masculinas.

Tabela 10: Resultados das análises de regressão logística múltipla comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL quanto à influência do conjunto das características da casuística na manifestação da PAIR.

	PAIR X PANO			PANO x NORMAL			PAIR x NORMAL			PAIR+PANO x NORMAL		
	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%
Sexo	0,043	4,222	1,044 - 17,065	0,064	2,673	0,944 - 7,566	0,000	10,869	3,221 - 36,681	0,000	5,485	2,317 - 12,986
Branco	0,538			0,895			0,321			0,393		
P+N	0,486	1,339	0,590 - 3,039	0,777	1,127	0,494 - 2,568	0,749	1,122	0,553 - 2,275	0,516	1,228	0,661 - 2,281
I+A	0,689	1,321	0,337 - 5,177	0,671	1,390	0,305 - 6,338	0,131	2,857	0,730 - 11,179	0,189	2,234	0,673 - 7,417
HF	0,050	2,397	0,999 - 5,756	0,403	1,495	0,583 - 3,836	0,006	2,900	1,347 - 6,245	0,011	2,369	1,218 - 4,605
Tabagismo	0,042	2,235	1,029 - 4,852	0,576	0,799	0,363 - 1,757	0,012	2,470	1,221 - 4,996	0,138	1,566	0,866 - 2,834
AS	0,618	1,758	0,191 - 16,150	0,108	0,161	0,017 - 1,496	0,271	0,477	0,128 - 1,783	0,063	0,328	0,101 - 1,064
Idade	0,705	1,012	0,951 - 1,078	0,001	1,130	1,054 - 1,212	0,001	1,151	1,082 - 1,225	0,000	1,148	1,088 - 1,212
TE	0,674	1,012	0,958 - 1,069	0,366	0,972	0,914 - 1,034	0,883	0,996	0,943 - 1,052	0,308	0,976	0,931 - 1,023

Os valores significativos estão destacados em cinza. Categorias de referência: sexo feminino, etnia branca, caso isolado, ausência do tabagismo e do alcoolismo social.

I.C.=intervalo de confiança.

P+N=pardos e negros.

I+A=indígenas e asiáticos.

HF=histórico familiar.

AS=alcoolismo social.

TE=tempo de exposição.

Portanto, o aumento de indivíduos do sexo masculino afetados por PAIR, em nossa amostra, reflete provavelmente uma desproporção entre homens e mulheres na constituição da amostra e não necessariamente alguma diferença biológica entre os sexos na susceptibilidade à PAIR. Optamos, assim, por excluir as mulheres da amostra e repetir os testes realizados para verificar o efeito das demais variáveis sobre a manifestação da PAIR. Essas análises estão apresentadas nas Tabelas 12, 13 e 14.

A Tabela 12 apresenta os resultados da regressão logística simples comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL, após a exclusão das mulheres, quanto à influência isolada das características: etnia, histórico familiar, tabagismo, alcoolismo social, idade e tempo de exposição ao ruído, na manifestação da PAIR. Os resultados obtidos são muito semelhantes aos observados na Tabela 9, onde se analisou a amostra total. De fato, nessa análise excluindo as mulheres, as variantes que foram significativas na Tabela 9 permaneceram significativas. Apenas dois resultados diferiram entre as duas análises: primeiro, na comparação entre PAIR e PANO, o histórico familiar, que antes não era significativo, passou a ser, com o risco de ocorrência da PAIR cerca de três vezes e meia maior entre os indivíduos com casos de perda de audição na família do que entre os casos isolados (*odds ratio*=3,473; $p=0,011$; I.C. 1,330-9,066). Segundo, na comparação do aglutinado PAIR+PANO em relação ao grupo NORMAL, o histórico familiar que antes era significativo, nessa análise deixou de ser.

A Tabela 13 apresenta os resultados da regressão logística múltipla comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL, considerando a influência conjunta da etnia, do histórico familiar, do tabagismo, do alcoolismo social, da idade e do tempo de exposição ao ruído na manifestação da PAIR, após a exclusão dos indivíduos do sexo feminino. Os resultados obtidos são similares aos observados quando se utilizou a amostra total (Tabela 10). As únicas diferenças após a exclusão das mulheres surgiram nas comparações envolvendo o histórico familiar: passou a ser significativo ($p=0,007$; I.C. 1,480-11,289) na comparação entre PAIR e PANO e, na comparação entre o grupo PAIR e o NORMAL a *odds ratio* subiu de 2,9 ($p=0,006$; I.C. 1,347-6,245 - Tabela 10) para 3,8 ($p=0,002$; I.C. 1,649-8,754 - Tabela 13). Repetimos a análise de regressão logística excluindo as variáveis que não mostraram efeitos significativos nas análises iniciais. A Tabela 14 contém os resultados da regressão logística múltipla comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL, após a exclusão das mulheres, quanto à influência apenas do histórico familiar, do tabagismo, da idade e do tempo de exposição ao ruído. Mais uma vez os resultados significativos observados anteriormente (Tabela 11) são confirmados. A única diferença foi quanto ao tabagismo na comparação do aglutinado PAIR+PANO em relação ao grupo NORMAL que não era significativo ($p=0,071$, Tabela 11) e observamos na Tabela 14 que o risco de ocorrência da PAIR foi cerca de duas vezes maior entre os fumantes (*odds ratio*=1,954; $p=0,040$; I.C. 1,030-3,707).

Tabela 11: Resultados das análises de regressão logística múltipla comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL quanto à influência do conjunto das características da casuística (apontadas como significativas pela regressão logística simples) na manifestação da PAIR.

	PAIR x PANO			PANO x NORMAL			PAIR x NORMAL			PAIR+PANO x NORMAL		
	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%
Sexo	0,070	3,379	0,906 - 12,599	0,053	2,743	0,988 - 7,618	0,000	8,804	2,844 - 27,258	0,000	5,269	2,235 - 12,425
HF	0,040	2,433	1,042 - 5,680	0,362	1,535	0,611 - 3,859	0,002	3,181	1,507 - 6,712	0,013	2,293	1,192 - 4,408
Tabagismo	0,028	2,332	1,094 - 4,971	0,746	0,880	0,406 - 1,906	0,009	2,496	1,262 - 4,937	0,071	1,708	0,955 - 3,055
Idade	0,530	1,020	0,959 - 1,084	0,000	1,138	1,062 - 1,219	0,000	1,161	1,093 - 1,233	0,000	1,150	1,090 - 1,213
TE	0,888	1,004	0,952 - 1,059	0,151	0,959	0,905 - 1,015	0,559	0,985	0,936 - 1,036	0,207	0,971	0,928 - 1,016

Os valores significativos estão destacados em cinza. Categorias de referência: sexo feminino, caso isolado e ausência do tabagismo.

I.C.=intervalo de confiança.

HF=histórico familiar

TE=tempo de exposição

Tabela 12: Resultados das análises de regressão logística simples comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL, após a exclusão das mulheres, quanto à influência de cada uma das características da casuística na manifestação da PAIR.

	PAIR x PANO			PANO x NORMAL			PAIR x NORMAL			PAIR+PANO x NORMAL		
	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%
Branco	0,664			0,686			0,457			0,499		
P+N	0,726	0,792	0,215 - 2,914	0,386	1,867	0,455 - 7,651	0,517	1,479	0,453 - 4,828	0,411	1,589	0,527 - 4,793
I+A	0,468	1,354	0,597 - 3,068	0,865	1,077	0,458 - 2,530	0,238	1,458	0,779 - 2,727	0,321	1,350	0,747 - 2,440
HF	0,011	3,473	1,330 - 9,066	0,436	0,667	0,240 - 1,848	0,012	2,315	1,200 - 4,467	0,079	1,760	0,936 - 3,309
Tabagismo	0,010	2,790	1,282 - 6,071	0,908	1,047	0,480 - 2,284	0,001	2,921	1,575 - 5,418	0,007	2,163	1,233 - 3,796
AS	0,460	2,250	0,262 - 19,343	0,157	0,219	0,027 - 1,798	0,198	0,493	0,168 - 1,448	0,097	0,418	0,150 - 1,171
Idade	0,486	1,017	0,970 - 1,067	0,000	1,106	1,051 - 1,163	0,000	1,143	1,093 - 1,196	0,000	1,132	1,087 - 1,178
TE	0,450	1,016	0,975 - 1,059	0,020	1,052	1,008 - 1,097	0,000	1,085	1,044 - 1,127	0,000	1,074	1,037 - 1,111

Os valores significativos estão destacados em cinza. Categorias de referência: etnia branca, caso isolado, ausência do tabagismo e do alcoolismo social.

I.C.=intervalo de confiança.

P+N=pardos e negros

I+A=indígenas e asiáticos

HF=histórico familiar

AS=alcoolismo social

TE=tempo de exposição

Tabela 13: Resultados das análises de regressão logística múltipla comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL, após a exclusão das mulheres, quanto à influência do conjunto das características da casuística na manifestação da PAIR.

	PAIR x PANO			PANO x NORMAL			PAIR x NORMAL			PAIR+PANO x NORMAL		
	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%
Branco	0,462			0,880			0,749			0,730		
P+N	0,659	0,730	0,181 - 2,946	0,639	1,461	0,300 - 7,115	0,548	1,548	0,373 - 6,429	0,520	1,516	0,427 - 5,383
I+A	0,310	1,586	0,651 - 3,867	0,930	0,959	0,374 - 2,455	0,564	1,254	0,581 - 2,705	0,559	1,226	0,618 - 2,434
HF	0,007	4,088	1,480 - 11,289	0,944	0,961	0,313 - 2,953	0,002	3,800	1,649 - 8,754	0,026	2,315	1,104 - 4,855
Tabagismo	0,015	2,784	1,220 - 6,354	0,642	0,812	0,338 - 1,952	0,005	2,968	1,400 - 6,292	0,064	1,848	0,966 - 3,535
AS	0,661	1,647	0,177 - 15,294	0,163	0,195	0,020 - 1,935	0,510	0,628	0,158 - 2,503	0,164	0,412	0,118 - 1,436
Idade	0,511	1,023	0,956 - 1,093	0,002	1,123	1,044 - 1,208	0,000	1,162	1,088 - 1,242	0,000	1,147	1,082 - 1,216
TE	0,854	1,006	0,948 - 1,066	0,553	0,981	0,919 - 1,046	0,845	0,994	0,937 - 1,054	0,564	0,985	0,934 - 1,038

Os valores significativos estão destacados em cinza. Categorias de referência: etnia branca, caso isolado, ausência do tabagismo e do alcoolismo social.

I.C.=intervalo de confiança.

P+N=pardos e negros

I+A=indígenas e asiáticos

HF=histórico familiar

AS=alcoolismo social

TE=tempo de exposição

Tabela 14: Resultados das análises de regressão logística múltipla comparando os grupos PAIR, PANO e NORMAL, após a exclusão das mulheres, quanto à influência do conjunto das características da casuística (apontadas como significativas pela regressão logística simples) na manifestação da PAIR.

	PAIR x PANO			PANO x NORMAL			PAIR x NORMAL			PAIR+PANO x NORMAL		
	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%
HF	0,009	3,767	1,391 - 10,204	0,985	1,011	0,334 - 3,059	0,002	3,751	1,647 - 8,546	0,027	2,272	1,095 - 4,712
Tabagismo	0,009	2,950	1,312 - 6,634	0,777	0,882	0,371 - 2,100	0,003	3,094	1,472 - 6,505	0,040	1,954	1,030 - 3,707
Idade	0,501	1,023	0,958 - 1,092	0,001	1,130	1,052 - 1,214	0,000	1,164	1,090 - 1,243	0,000	1,151	1,087 - 1,220
TE	0,886	1,004	0,948 - 1,064	0,376	0,973	0,915 - 1,034	0,837	0,994	0,938 - 1,053	0,468	0,981	0,932 - 1,033

Os valores significativos estão destacados em cinza. Categorias de referência: caso isolado e ausência do tabagismo.

I.C.=intervalo de confiança.

HF=histórico familiar

TE=tempo de exposição

V.2 - Triagem de mutações específicas

A triagem das mutações A1555G (gene *MT-RNR1*), 35delG e 167delT (gene *GJB2*), Δ (*GJB6*-D13S1830) e Δ (*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6*, já identificadas como responsáveis por distúrbios de audição revelou apenas três portadores dessas mutações entre os indivíduos da casuística (Tabela 15).

Tabela 15: Resultados dos testes para mutações específicas responsáveis por distúrbios de audição: A1555G no gene *MT-RNR1*, 35delG e 167delT no gene *GJB2*, Δ (*GJB6*-D13S1830) e Δ (*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6* nos grupos PAIR, PANO e NORMAL.

Gene	Mutação		PAIR	PANO	NORMAL
<i>MT-RNR1</i>	A1555G	P	0	0	0
		A	107	44	104
<i>GJB2</i>	35delG	P	0	1 (heterozigose)	0
		A	107	43	104
	167delT	P	0	0	0
		A	107	44	104
<i>GJB6</i>	Δ (<i>GJB6</i> -D13S1830)	P	0	0	1 (heterozigose)
		A	107	44	103
	Δ (<i>GJB6</i> -D13S1854)	P	1 (heterozigose)	0	0
		A	106	44	104

P=presente; A=ausente

O teste do qui-quadrado em tabela de contingência indicou que a frequência de heterozigotos para as mutações 35delG (gene *GJB2*), Δ (*GJB6*-D13S1830) e Δ (*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6* não diferiu significativamente entre os três grupos (valores de p iguais a 0,227, 0,323 e 0,123, respectivamente).

IV.3 - Polimorfismos dos genes *GJB2*, *GSTM1* e *GSTT1*.

As Tabelas 16, 17 e 18 apresentam os resultados referentes à determinação dos genótipos dos polimorfismos estudados nesse trabalho: o SNP 877098 no gene *GJB2* e os polimorfismos de deleções dos genes *GSTM1* e *GSTT1*.

Para testar a possível associação dos genes *GJB2*, *GSTM1* e *GSTT1* com a manifestação da PAIR, os resultados obtidos no estudo de polimorfismos nesses genes foram analisados primeiramente por meio de uma comparação do tipo caso-controle, por duas maneiras: no primeiro caso, foram comparados os genótipos entre os grupos PAIR e NORMAL. No segundo caso, foram comparados os resultados dos grupos PAIR+PANO e NORMAL. Os testes realizados foram os do qui-quadrado em tabela de contingência.

Nessa amostra, aparentemente, o SNP RS877098 próximo do gene *GJB2* não está associado à susceptibilidade à PAIR quando se comparou o grupo PAIR com o NORMAL ($p=0,585$) e também quando foram comparados os grupos PAIR+PANO com NORMAL ($p=0,369$). As frequências alélicas observadas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 16).

A presença da deleção do gene *GSTM1* não está associada à manifestação da PAIR nessa amostra ($p=0,392$ na comparação PAIR x NORMAL e $p=0,329$ na comparação entre PAIR+PANO e NORMAL). Por fim, a presença da deleção do gene *GSTT1*, aparentemente, também não influenciou a manifestação da PAIR nessa amostra ($p=0,549$ para PAIR x NORMAL e $p=0,478$ para PAIR+PANO x NORMAL).

Para verificar se os resultados do estudo caso-controle não são influenciados pelas variáveis identificadas pelos estudos de regressão logística como fatores que afetam significativamente a manifestação da PAIR, optamos por realizar análises de regressão logística múltipla incluindo, juntamente com os genótipos, as informações sobre o sexo, histórico familiar, tabagismo, idade e tempo de exposição ao ruído. Consideramos nessas análises tanto a amostra completa quanto a amostra após a exclusão das mulheres. As categorias de referência para todas as análises a seguir foram: sexo feminino (quando foi utilizada essa variável), caso isolado e ausência do tabagismo. Os resultados dessas análises estão apresentados nas Tabelas 19, 20, 21 e 22.

Na regressão logística múltipla, referente ao SNP RS877098 (gene *GJB2*), consideramos os homozigotos do alelo “C” como categoria de referência devido ao pequeno aumento na frequência do alelo “T” no grupo PAIR em relação ao NORMAL observado na Tabela 16 (48% e 44%, respectivamente). O objetivo da comparação foi verificar se a presença do alelo “T” aumentou o risco de ocorrência da PAIR. Os resultados não foram significativos tanto na análise da amostra completa como após a exclusão das mulheres (Tabelas 19 e 20). Realizamos também análises de regressão logística múltipla considerando as outras categorias genotípicas (CC e CT) como referência e os resultados também não foram significativos.

Para o caso dos genes *GSTM1* e *GSTT1* optamos por considerar o genótipo nulo (0/0) como categoria de referência. A decisão se baseou no fato de as Tabelas 17 e 18 mostrarem um pequeno aumento na presença dos genótipos “1/?” (presença de pelo menos um alelo) no grupo PAIR em comparação com o grupo NORMAL. As comparações entre os grupos considerando cada loco individualmente, na amostra total ou na amostra excluindo as mulheres, estão apresentadas nas Tabelas 21, 22, 23 e 24.

Como *GSTM1* e *GSTT1* são genes que atuam em vias metabólicas muito semelhantes, analisamos também os efeitos dos genótipos nos dois genes conjuntamente. Seguindo o raciocínio anterior, mantivemos nas análises seguintes como categoria de referência a ausência dos genes, ou seja, a categoria de duplo genótipo nulo (0/0-0/0). Os resultados dessas análises estão representados

nas Tabelas 25 e 26.

Tabela 16: Frequências alélicas e genóticas nos indivíduos dos grupos PAIR, PANO e NORMAL em relação ao SNP 877098 no gene *GJB2*

		PAIR	PANO	NORMAL	Total	
RS 877096	Alelos	C	111 (52%)	40 (46%)	117 (56%)	268
		T	103 (48%)	48 (54%)	91 (44%)	242
	Genótipos	CC	29 (27%)	10 (23%)	35 (34%)	74
		CT	53 (50%)	20 (45%)	47 (45%)	120
		TT	25 (23%)	14 (32%)	22 (21%)	61
	N		107	44	104	255
χ^2 (1 g.l.)		0,0068	0,3056	0,696	0,8103	
p		0,934	0,58	0,404	0,368	

Os valores χ^2 e p são referentes ao teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tabela 17: Frequência dos genótipos dos indivíduos dos grupos PAIR, PANO e NORMAL em relação à deleção no gene *GSTM1*.

Gene <i>GSTM1</i>				Total
Genótipo	PAIR	PANO	NORMAL	
0/0	79 (74%)	32 (73%)	82 (79%)	193
1/?	28 (26%)	12 (27%)	22 (21%)	62
Total	107	44	104	255

0/0=genótipo nulo.

1/?=Presença de pelo menos um alelo.

Tabela 18: Frequência dos genótipos dos indivíduos dos grupos PAIR, PANO e NORMAL em relação à deleção no gene *GSTT1*.

Gene <i>GSTT1</i>				Total
Genótipo	PAIR	PANO	NORMAL	
0/0	24 (22%)	12 (27%)	27 (26%)	142
1/?	83 (78%)	32 (73%)	77 (74%)	113
Total	107	44	104	255

0/0=genótipo nulo.

1/?=Presença de pelo menos um alelo.

Tabela 19: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar a influência de alelos do gene *GJB2* na manifestação da PAIR, utilizando a amostra completa.

	PAIR x NORMAL			PAIR+PANO x NORMAL		
	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%
Sexo	0,000	8,457	2,720 - 26,296	0,000	5,156	2,181 - 12,190
HF	0,002	3,194	1,507 - 6,771	0,016	2,254	1,166 - 4,356
Tabagismo	0,010	2,469	1,246 - 4,890	0,071	1,713	0,955 - 3,073
Idade	0,000	1,159	1,091 - 1,232	0,000	1,148	1,088 - 1,211
TE	0,642	0,988	0,938 - 1,040	0,250	0,973	0,930 - 1,019
CC	0,729			0,570		
CT	0,459	1,346	0,613 - 2,954	0,422	1,322	0,668 - 2,617
TT	0,522	1,376	0,518 - 3,660	0,312	1,527	0,672 - 3,471

Os valores significativos estão destacados em cinza.

HF=histórico familiar;

TE=tempo de exposição ao ruído

CC=homozigoto para o alelo C do polimorfismo SNP RS877096

CT=heterozigoto para o polimorfismo SNP RS877096

TT=homozigoto para o alelo T do polimorfismo SNP RS877096

Tabela 20: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar a influência de alelos do gene *GJB2* na manifestação da PAIR, excluindo as mulheres.

	PAIR x NORMAL			PAIR + PANO x NORMAL		
	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%
HF	0,002	3,752	1,640 - 8,584	0,016	2,215	1,062 - 4,618
Tabagismo	0,003	3,043	1,444 - 6,414	0,042	1,950	1,026 - 3,708
Idade	0,000	1,163	1,089 - 1,242	0,000	1,151	1,086 - 1,219
TE	0,900	0,996	0,940 - 1,056	0,492	0,982	0,933 - 1,034
CC	0,686			0,595		
CT	0,407	1,439	0,609 - 3,401	0,530	1,272	0,599 - 2,701
TT	0,503	1,435	0,498 - 4,136	0,311	1,602	0,644 - 3,988

Os valores significativos estão destacados em cinza.

HF=histórico familiar

TE=tempo de exposição ao ruído

CC=homozigoto para o alelo C do polimorfismo SNP RS877096

CT=heterozigoto para o polimorfismo SNP RS877096

TT=homozigoto para o alelo T do polimorfismo SNP RS877096

Tabela 21: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar se o genótipo nulo ou a presença do gene *GSTM1* influenciaram a manifestação da PAIR, utilizando a amostra completa.

	PAIR x NORMAL			PAIR+PANO x NORMAL		
	p	odds ratio	I.C. 95%	p	odds ratio	I.C. 95%
Sexo	0,000	8,454	2,717 - 26,311	0,000	5,125	2,168 - 12,115
HF	0,002	3,284	1,545 - 6,982	0,011	2,327	1,209 - 4,478
Tabagismo	0,006	2,638	1,321 - 5,265	0,060	1,753	0,976 - 3,147
Idade	0,000	1,163	1,094 - 1,236	0,000	1,150	1,090 - 1,213
TE	0,605	0,987	0,938 - 1,038	0,230	0,972	0,929 - 1,018
1/?	0,189	1,718	0,766 - 3,852	0,295	1,446	0,725 - 2,885

Os valores significativos estão destacados em cinza.

HF=histórico familiar

TE=tempo de exposição ao ruído

1/?=Presença de pelo menos um alelo do gene *GSTM1*.

Tabela 22: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar se o genótipo nulo ou a presença do gene *GSTM1* influenciaram a manifestação da PAIR, excluindo as mulheres.

	PAIR x NORMAL			PAIR+PANO x NORMAL		
	p	odds ratio	I.C 95%	p	odds ratio	I.C 95%
HF	0,001	4,026	1,735 - 9,342	0,023	2,335	1,123 - 4,857
Tabagismo	0,001	3,515	1,626 - 7,595	0,030	2,049	1,071 - 3,919
Idade	0,000	1,168	1,093 - 1,248	0,000	1,151	1,086 - 1,219
TE	0,939	0,998	0,941 - 1,058	0,515	0,983	0,933 - 1,035
1/?	0,073	2,268	0,927 - 5,547	0,239	1,579	0,738 - 3,378

Os valores significativos estão destacados em cinza.

HF=histórico familiar

TE=tempo de exposição ao ruído

1/?=Presença de pelo menos um alelo do gene *GSTM1*.

Tabela 23: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar se o genótipo nulo ou a presença do gene *GSTT1* influenciaram a manifestação da PAIR, utilizando a amostra completa.

	PAIR x NORMAL			PAIR+PANO x NORMAL		
	p	odds ratio	I.C 95%	p	odds ratio	I.C 95%
Sexo	0,000	9,211	2,941 - 28,846	0,000	5,570	2,339 - 13,262
HF	0,001	3,418	1,601 - 7,295	0,009	2,440	1,255 - 4,744
Tabagismo	0,009	2,521	1,263 - 5,033	0,073	1,707	0,951 - 3,064
Idade	0,000	1,163	1,094 - 1,236	0,000	1,153	1,092 - 1,216
TE	0,587	0,986	0,936 - 1,038	0,210	0,971	0,927 - 1,017
1/?	0,091	1,956	0,899 - 4,256	0,133	1,669	0,855 - 3,260

Os valores significativos estão destacados em cinza.

HF=histórico familiar

TE=tempo de exposição ao ruído

1/?=Presença de pelo menos um alelo do gene *GSTT1*.

Tabela 24: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar se o genótipo nulo ou a presença do gene *GSTT1* influenciaram a manifestação da PAIR, excluindo as mulheres.

	PAIR x NORMAL			PAIR+PANO x NORMAL		
	p	odds ratio	I.C 95%	p	odds ratio	I.C 95%
HF	0,001	4,249	1,816 - 9,939	0,016	2,507	1,184 - 5,310
Tabagismo	0,004	3,073	1,444 - 6,539	0,051	1,899	0,996 - 3,620
Idade	0,000	1,166	1,092 - 1,246	0,000	1,155	1,089 - 1,224
TE	0,872	0,995	0,938 - 1,056	0,461	0,981	0,931 - 1,033
1/?	0,077	2,134	0,921 - 4,940	0,139	1,734	0,837 - 3,594

Os valores significativos estão destacados em cinza.

HF=histórico familiar

TE=tempo de exposição ao ruído

1/?=Presença de pelo menos um alelo do gene *GSTT1*.

As Tabelas 25 e 26 mostraram que, aparentemente, a combinação dos dois genótipos influenciou a manifestação da PAIR. Considerando a amostra total (Tabela 25), quando se compara o grupo PAIR com o grupo NORMAL, o risco de ocorrência da PAIR foi cerca de quatro vezes maior em quem apresentou os dois genes (1/?-1/?) do que nos indivíduos com genótipo duplo nulo (*odds ratio*=3,790; *p*=0,020). Considerando o aglutinado PAIR+PANO em comparação com o grupo NORMAL, o *odds ratio* foi 2,668 (*p*=0,049). Excluindo as mulheres (Tabela 26), o *odds ratio* subiu para 5,878 na comparação do grupo PAIR em relação ao NORMAL (*p*=0,006) e para 3,267, considerando o aglutinado PAIR+PANO em relação ao NORMAL (*p*=0,036).

Em resumo, encontramos efeito significativo dos genótipos “1/?-1/?” sobre a manifestação da PAIR. Aparentemente a presença dos dois genes aumenta o risco de ocorrência da PAIR.

Tabela 25: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar se os genótipos nulo ou a presença dos genes *GSTM1* e *GSTT1* influenciaram a manifestação da PAIR, utilizando a amostra completa.

	PAIR x NORMAL			PAIR+PANO x NORMAL		
	p	<i>odds ratio</i>	I.C 95%	p	<i>odds ratio</i>	I.C 95%
Sexo	0,000	9,015	2,826 - 28,754	0,000	5,417	2,264 - 12,957
HF	0,001	3,575	1,650 - 7,746	0,008	2,458	1,263 - 4,785
Tabagismo	0,006	2,668	1,323 - 5,377	0,062	1,754	0,973 - 3,163
Idade	0,000	1,170	1,099 - 1,244	0,000	1,153	1,093 - 1,217
TE	0,548	0,984	0,934 - 1,037	0,209	0,971	0,927 - 1,017
0/0-0/0	0,036			0,089		
0/0?1/?	0,657	1,212	0,519 - 2,828	0,725	1,142	0,545 - 2,392
1/?-1/?	0,020	3,790	1,235 - 11,634	0,049	2,668	1,006 - 7,079

Os valores significativos estão destacados em cinza.

HF=histórico familiar

TE=tempo de exposição ao ruído

0/0-00=categoria de referência: Duplo genótipo nulo.

0/0?1/?=Presença de pelo menos um alelo de qualquer um dos genes.

1/?-1/?=Presença de pelo menos um alelo do gene *GSTM1* e presença de pelo menos um alelo do gene *GSTT1*.

Tabela 26: Comparação dos grupos NORMAL, PAIR+PANO e PAIR por meio de regressão logística múltipla para verificar se o genótipo nulo ou a presença dos genes *GSTM1* e *GSTT1* influenciaram a manifestação da PAIR, excluindo as mulheres.

	PAIR x NORMAL			PAIR+PANO x NORMAL		
	p	<i>odds ratio</i>	I.C 95%	p	<i>odds ratio</i>	I.C 95%
HF	0,001	4,644	1,923 - 11,215	0,016	2,531	1,190 - 5,384
Tabagismo	0,001	3,659	1,665 - 8,042	0,029	2,067	1,075 - 3,975
Idade	0,000	1,179	1,101 - 1,262	0,000	1,157	1,091 - 1,227
TE	0,849	0,994	0,936 - 1,056	0,454	0,980	0,930 - 1,033
0/0-0/0	0,010			0,061		
0/0?1/?	0,704	1,196	0,476 - 3,005	0,784	1,120	0,498 - 2,521
1/?-1/?	0,006	5,878	1,647 - 20,985	0,036	3,267	1,080 - 9,882

Os valores significativos estão destacados em cinza.

HF=histórico familiar

TE=tempo de exposição ao ruído

0/0-00=categoria de referência: Duplo genótipo nulo.

0/0?1/?=Presença de um alelo de qualquer um dos genes.

1/?-1/?=Presença de pelo menos um alelo do gene *GSTM1* e presença de pelo menos um alelo do gene *GSTT1*.

IV.4 – Triagem de outras mutações no DNAm por meio da técnica de dHPLC seguida de seqüenciamento dos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1*.

IV.4.1 – Avaliação do desempenho da técnica de dHPLC

A Tabela 27 apresenta os resultados da análise por dHPLC dos genes *MT-RNR1* (amplicons “A” e “B”) e do amplicon que contém o gene *MT-TS1* (por facilidade, passaremos a nos referir a esse amplicon com o termo “*MT-TS1*”). Todas as amostras dos indivíduos que apresentaram resultados alterados nessa triagem tiveram o amplicon correspondente seqüenciado.

Tabela 27: Identificação por meio da análise por dHPLC de variantes nas seqüências do DNAm dos indivíduos dos grupos PAIR, PANO e NORMAL nos genes mitocondriais *MT-RNR1* e *MT-TS1*.

Amostras	Gene <i>MT-RNR1</i>		Gene <i>MT-TS1</i>	
	Amplicon "A"	Amplicon "B"	Alterados	Total
	Alterados	Alterados	Alterados	
PAIR	56 (52%)	20 (19%)	15 (14%)	107
PANO	20 (45%)	4 (9%)	11 (25%)	44
NORMAL	58 (56%)	36 (35%)	31 (30%)	104
Total	134	60	57	255

O seqüenciamento da região do DNAm correspondente ao amplicon “A” do gene *MT-RNR1* confirmou a presença de alterações em 129 (96%) dos 134 indivíduos da casuística identificados por meio de dHPLC como possíveis portadores de variantes do DNAm. Os falsos positivos somaram cinco casos (4%). O seqüenciamento do amplicon “B” confirmou a presença de variantes do DNAm em todos os casos identificados pelo dHPLC nos três grupos. Então, considerando ambos os amplicons, foram seqüenciados 194 amplicons do gene *MT-RNR1* com apenas cinco falsos positivos (cerca de 3%). A ocorrência de falsos positivos foi maior no amplicon que contém o *MT-TS1*: entre os 57 casos de possíveis portadores de alterações, seis (11%) não foram confirmados.

A presença de falsos negativos foi testada através da seleção aleatória de trinta pessoas entre aquelas que tiveram resultados negativos na triagem por meio do dHPLC, dez de cada grupo. Então, ambas as fitas dos amplicons “A”, “B” do gene *MT-RNR1* e do amplicon que contém o *MT-TS1* foram seqüenciados em amostras desses 30 indivíduos (90 amplicons seqüenciados) e em todos os casos foram confirmadas as seqüências normais, sem falsos negativos.

Em nenhum dos três amplicons foram detectados casos de heteroplasmia nas regiões do DNAm estudadas, nas análises em que foram submetidas ao dHPLC apenas as amostras de DNA teste (sem misturar com a amostra de DNA controle).

IV.4.2 – Resultados do seqüenciamento do Gene *MT-RNR1*

A Tabela 28 apresenta as variantes da seqüência do DNAm_t identificadas pelo seqüenciamento dos amplicons “A” e “B” do gene *MT-RNR1* naqueles indivíduos apontados pela triagem com o dHPLC como possíveis portadores de alterações no DNAm_t. Para garantir o seqüenciamento completo do gene *MT-RNR1* o amplicon “A” abrange um pequeno segmento de DNAm_t a 5’ do gene de interesse. Esse segmento contém o gene do RNAt do aminoácido fenilalanina (*MT-TF*). Da mesma forma, para garantir o completo seqüenciamento do gene *MT-RNR1*, também foi incluído no amplicon “B” um segmento extra de DNAm_t a 3’ do gene de interesse. O segmento extra de DNAm_t contém o gene do RNAt do aminoácido valina (*MT-TV*). Assim, o seqüenciamento permitiu identificar 42 variantes: 39 delas realmente estão no gene *MT-RNR1*; uma delas, a substituição 629T-C, está no gene *MT-TF* e as últimas duas (1612C-G e 1620A-T) estão localizadas no gene *MT-TV*. A Tabela 28 também aponta em quais bancos de dados as variantes já foram descritas e em quais haplogrupos mitocondriais elas foram encontradas. Das 42 variantes identificadas, vinte e cinco já foram descritas e dezessete são novas (MITOMAP - Ruiz-Pesini e col., 2007, URL: <http://www.mitomap.org>; mtDB - Human Mitochondrial Genome Database - Ingman e Gyllensten, 2006, URL: <http://www.genpat.uu.se/mtDB/> e GenBank - Benson e col., 2007, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Apenas duas delas (827A-G e 1243T-C) foram descritas como possivelmente patogênicas (Li e col., 2005; Ballana e col., 2006; Xing e col., 2006; Xing e col., 2006b).

IV.4.3 – Resultados do seqüenciamento do *MT-TS1*

O seqüenciamento do amplicon que contém o gene *MT-TS1* identificou doze variantes de seqüência do DNAm_t nesse segmento (Tabela 29). Para a melhor qualidade do seqüenciamento do *MT-TS1*, o amplicon incluiu segmentos extras de DNAm_t, um a jusante e outro a montante do gene. O segmento a 5’ do *MT-TS1* contém parte do gene *MT-COI*, que codifica uma das subunidades do complexo enzimático da cadeia de transporte de elétrons, a citocromo oxidase I. O segmento final, a 3’ do gene de interesse, contém o gene do RNAt do aminoácido ácido aspártico (*MT-TD*). Assim, quatro das variantes identificadas estão no gene *MT-COI*, cinco estão realmente no gene *MT-TS1* e as últimas três estão no gene *MT-TD*. Foram encontradas cinco variantes novas e sete já descritas (MITOMAP - URL: <http://www.mitomap.org>; mtDB - URL: <http://www.genpat.uu.se/mtDB/> e GenBank - URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Apenas uma delas (7444G-A) é possivelmente patogênica (Pandya e col., 1999; Yuan e col., 2005; Zhu e col., 2006).

Tabela 28: Relação das variantes identificadas nos genes *MT-TF*, *MT-RNR1* e *MT-TV* indicando: o número de portadores de cada uma delas nos grupos PAIR, PANO e NORMAL, o resultado da procura por descrições prévias em bancos de dados e a quais haplogrupos do DNAm elas pertencem.

Genes	Variantes detectadas	Total de portadores na amostra			Bancos de Dados			Haplogrupos Mitocondriais
		PAIR	PANO	NORMAL	MIT	mtDb	GB	
<i>MT-TF</i>	629T-C	0	0	1 1%	s	s	s	L1c3 [#]
<i>MT-RNR1</i>	663A-G	6 6%	1 2%	1 1%	s	s	s	A [#] ; U1a [#] ;
<i>MT-RNR1</i>	680T-C	1 1%	0	0	s	s	s	L2c [#]
<i>MT-RNR1</i>	709G-A	10 9%	4 9%	9 9%	s	s	s	B [#] ; C [#] ; H [#] ; J; K [#] ; K1b1 [#] ; K2 [#] ; K2a4 [#] ; L1 [#] ; L1b [#] ; L1c; L2c [#] ; L3 [#] ; M [#] ; S [#] ; T [#] ; U; W [#]
<i>MT-RNR1</i>	710T-C	2 2%	0	2 2%	s	s	s	C; L1b [#]
<i>MT-RNR1</i>	750A-G	52 49%	17 39%	51 49%	s	s	s	Todos [#] ; A; B; C; D; H; J; L0a; L0k; L1b; L1c; L1cl; L1c2; L2a1; L3b; L3e1; L3e2b; L3e3; L3h1; T
<i>MT-RNR1</i>	752C-T	0	0	1 1%	s	s	s	L3h1
<i>MT-RNR1</i>	769G-A	13 12%	7 16%	24 23%	s	s	s	A; B; C; L0a; L0k; L1 [#] ; L1b; L1c; L1cl; L1c2; L2 [#] ; L2a1; L3 [#]
<i>MT-RNR1</i>	770C-A	1 1%	0	0	n	s	n	L3e1
<i>MT-RNR1</i>	793C-A	1 1%	1 2%	0	n	s	n	U6c [#]
<i>MT-RNR1</i>	800C-A*	1 1%	0	0	n	n	n	L3e1
<i>MT-RNR1</i>	802C-A*	1 1%	0	0	n	n	n	
<i>MT-RNR1</i>	825T-A	6 6%	4 9%	14 13%	s	s	s	B; C; D1 [#] ; L [#] ; L1 [#] ; L0a; L1b; L1c; L1cl; L1c2
<i>MT-RNR1</i>	826A-G*	0	0	1 1%	n	n	n	
<i>MT-RNR1</i>	827A-G	4 4%	5 11%	7 7%	s	s	s	B [#] ; B4b [#] ; L1c
<i>MT-RNR1</i>	839A-T*	1 1%	0	0	n	n	n	L1b
<i>MT-RNR1</i>	850T-A	0	1 2%	0	s	s	s	L0k [#]
<i>MT-RNR1</i>	870C-T	1 1%	0	1 1%	n	s	s	L2d [#]
<i>MT-RNR1</i>	871A-T*	0	0	1 1%	n	n	n	
<i>MT-RNR1</i>	921T-C	0	0	2 2%	s	s	s	L3 [#] ; L3d1 [#]
<i>MT-RNR1</i>	930G-A	2 2%	0	2 2%	s	s	s	A [#] ; L2 [#] ; L5a [#] ; T [#] ; T2b [#]
<i>MT-RNR1</i>	973C-G*	1 1%	0	0	n	n	n	
<i>MT-RNR1</i>	1017A-T*	2 2%	0	0	n	n	n	T
<i>MT-RNR1</i>	1018G-A	12 11%	6 14%	18 17%	s	s	s	C; L0a; L1 [#] ; L1b; L1c; L1cl; L1c2; L2 [#] ; L2a1; L3 [#] ; L3b; L3e1; L3h1
<i>MT-RNR1</i>	1040T-C	0	0	1 1%	n	s	s	L2c [#]
<i>MT-RNR1</i>	1048C-T	4 4%	0	2 2%	s	s	s	C; L [#] ; L0a; L3e1
<i>MT-RNR1</i>	1060A-G*	0	0	1 1%	n	n	n	
<i>MT-RNR1</i>	1154delA	8 7%	3 7%	6 6%	n	n	s	A; H; L0k; L1C; L3e1
<i>MT-RNR1</i>	1191C-T*	1 1%	0	0	n	n	n	
<i>MT-RNR1</i>	1242C-T*	1 1%	0	0	n	n	n	
<i>MT-RNR1</i>	1243T-C	0	0	1 1%	s	s	s	L0d1[#]; L0k[#]; W[#]
<i>MT-RNR1</i>	1310C-T	0	0	1	s	s	s	D5a1 [#]
<i>MT-RNR1</i>	1423A-C*	2 2%	0	0	n	n	n	
<i>MT-RNR1</i>	1438A-G	104 97%	44 100%	102 98%	s	s	s	Todos [#] ; A; J; L0k; L1b; L1c; L2b; L3e1
<i>MT-RNR1</i>	1439A-G*	0	0	1	n	n	n	
<i>MT-RNR1</i>	1442G-A	0	2 5%	1 1%	n	s	s	L2 [#] ; L2b [#]
<i>MT-RNR1</i>	1463G-T*	1 1%	0	0	n	n	n	H;
<i>MT-RNR1</i>	1500C-T*	0	0	1 1%	n	n	n	
<i>MT-RNR1</i>	1503G-A	1 1%	0	0	s	s	s	L1c2 [#] ; L3d1 [#] ; U3a [#]
<i>MT-RNR1</i>	1579C-T*	0	0	1 1%	n	n	n	
<i>MT-TV</i>	1612C-G*	0	0	1 1%	n	n	n	
<i>MT-TV</i>	1620A-T*	0	0	1 1%	n	n	n	

* indica as variantes que foram descritas pela primeira vez nesse trabalho; As variantes possivelmente patogênicas estão indicadas em negrito; MIT=MITOMAP; mtDB=mtDB - Human Mitochondrial Genome Database; GB=GenBank; s=sim; n=não; Os haplogrupos em itálico foram identificados pelo sequenciamento da região HVS-I do DNAm dos indivíduos dessa amostra e # indica os haplogrupos determinados com base na literatura.

Tabela 29: Relação das variantes identificadas no amplicon que contém o gene *MT-TS1* indicando: o número de portadores de cada uma delas nos grupos PAIR, PANO e NORMAL, o resultado da procura por descrições prévias em bancos de dados e a quais haplogrupos do DNAm elas pertencem.

Genes	Variantes detectadas	Total de portadores na amostra			Bancos de Dados			Haplogrupos Mitocondriais
		PAIR	PANO	NORMAL	MIT	mtDb	GB	
<i>MT-COI</i>	7424A-G	1 1%	0	0	s	s	s	H [#] ; L1b; L3 [#] ; L5a [#]
<i>MT-COI</i>	7434A-T*	0	0	1 1%	n	n	n	L2b
<i>MT-COI</i>	7436A-G*	1 1%	0	0	n	n	n	
<i>MT-COI</i>	7444G-A	0	1 1%	0	s	s	s	C; Hb[#]; V[#]
<i>MT-TS1</i>	7450A-T*	1 1%	0	0	n	n	n	
<i>MT-TS1</i>	7462C-T*	1 1%	0	0	n	n	n	C;
<i>MT-TS1</i>	7473A-G	1 1%	0	0	n	s	s	
<i>MT-TS1</i>	7495A-G*	0	0	1 1%	n	n	n	
<i>MT-TS1</i>	7498G-A	1 1%	0	2 2%	n	s	s	L1; L1c3 [#]
<i>MT-TD</i>	7521G-A	13 13%	8 8%	25 24%	s	s	s	A;B;H; H4 [#] ;L0k; L1 [#] ;L2 [#] ;L1b;L1c; L1c2; L2a
<i>MT-TD</i>	7528A-G	0	0	1 1%	n	n	s	
<i>MT-TD</i>	7559A-G	0	1 1%	0	s	s	s	K1a3a

* indica as variantes que foram descritas pela primeira vez nesse trabalho; A única variante possivelmente patogênica está indicada em negrito; MIT=MITOMAP; mtDB=mtDB - Human Mitochondrial Genome Database; GB=GenBank; s=sim; n=não; Os haplogrupos em itálico foram identificados pelo sequenciamento da região HVSI do DNAm dos indivíduos dessa amostra e # indica os haplogrupos determinados com base na literatura.

IV.4.4 – Análise estatística dos resultados obtidos por meio do sequenciamento dos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1* e o possível efeito das variantes sobre a manifestação da PAIR.

Com objetivo de verificar os possíveis efeitos das variantes de DNAm detectadas em nosso estudo sobre a manifestação da PAIR, a análise estatística foi realizada considerando o possível efeito de cada uma das variantes individualmente. Também foi analisado o possível efeito do número total de substituições presentes em cada um dos indivíduos sobre a manifestação da PAIR. Em seguida, foi analisado o possível efeito de diferentes haplótipos de mutações mitocondriais sobre a ocorrência desse fenótipo.

Na análise estatística que se segue sobre o efeito das mutações mitocondriais identificadas nesse estudo, as 54 posições variáveis do DNAm foram identificadas pela numeração apresentada na Tabela 30.

A) Comparação das frequências de cada variante nos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1* individualmente entre os grupos PAIR, PANO e NORMAL.

A Tabela 31 apresenta o resultado da comparação por meio do teste exato de Fisher entre o grupo PAIR e o grupo PANO quanto às frequências de cada uma das variantes do DNAm observadas

nesse estudo. Essa tabela demonstra que não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de indivíduos que apresentaram cada uma das variantes dos genes *MT-TRNR1* e *MT-TS1* e os que não apresentaram entre os grupos PAIR e PANO. Dessa forma, podemos considerar ambos os grupos conjuntamente, aglutinando as amostras.

A Tabela 32 apresenta o resultado da comparação por meio de testes exatos de Fisher entre o grupo NORMAL e os grupos PAIR e PANO aglutinados, quanto às frequências de cada uma das variantes do DNAm observadas nesse estudo. A quantidade de testes realizados (54) diminui a confiabilidade da análise. Assim, frequências superiores a 0,0009 não foram consideradas significativas (segundo a correção de Bonferroni que estabelece que o valor passa a ser $0,05/54=0,0009$). Portanto, nessa análise, o aglutinado dos grupos PAIR+PANO quando comparado ao grupo normal não mostrou nenhuma diferença significativa na frequência das variantes.

Tabela 30: Numeração das posições do DNAm identificadas nos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1* utilizada na análise estatística.

Gene <i>MT-RNR1</i>		<i>MT-TS1</i>
Amplicon "A"	Amplicon "B"	
01 - 629T-C	28 - 1154delA	43 - 7424A-G
02 - 663A-G	29 - 1191C-T	44 - 7434A-T
03 - 680T-C	30 - 1242C-T	45 - 7436A-G
04 - 709G-A	31 - 1243T-C	46 - 7444G-A
05 - 710T-C	32 - 1310C-T	47 - 7450A-T
06 - 750A-G	33 - 1423A-C	48 - 7462C-T
07 - 752C-T	34 - 1438A-G	49 - 7473A-G
08 - 769G-A	35 - 1439A-G	50 - 7495A-G
09 - 770C-A	36 - 1442G-A	51 - 7498G-A
10 - 793C-A	37 - 1463G-T	52 - 7521G-A
11 - 800C-A	38 - 1500C-T	53 - 7528A-G
12 - 802C-A	39 - 1503G-A	54 - 7559A-G
13 - 825T-A	40 - 1579C-T	
14 - 826A-G	41 - 1612C-G	
15 - 827A-G	42 - 1620A-T	
16 - 839A-T		
17 - 850T-A		
18 - 870C-T		
19 - 871A-T		
20 - 921T-C		
21 - 930G-A		
22 - 973C-G		
23 - 1017A-T		
24 - 1018G-A		
25 - 1040T-C		
26 - 1048C-T		
27 - 1060A-G		

Tabela 31: Comparação das frequências de cada variante entre PAIR e PANO nos genes *MT-RNR1* (1 a 42) e *MT-TS1* (43 a 54).

Variante	a	b	c	d	p
1	0	107	0	44	---
2	6	101	1	43	0.674
3	1	106	0	44	1.000
4	10	97	4	40	1.000
5	2	105	0	44	1.000
6	52	55	17	27	0.286
7	0	107	0	44	---
8	13	94	7	37	0.599
9	1	106	0	44	1.000
10	1	106	1	43	0.499
11	1	106	0	44	1.000
12	1	106	0	44	1.000
13	6	101	4	40	0.478
14	0	107	0	44	---
15	4	103	5	39	0.123
16	1	106	0	44	1.000
17	0	107	1	43	0.291
18	1	106	0	44	1.000
19	0	107	0	44	---
20	0	107	0	44	---
21	2	105	0	44	1.000
22	1	106	0	44	1.000
23	2	105	0	44	1.000
24	12	95	6	38	0.783
25	0	107	0	44	---
26	4	103	0	44	0.323
27	0	107	0	44	---
28	8	99	3	41	1.000
29	1	106	0	44	1.000
30	1	106	0	44	1.000
31	0	107	0	44	---
32	0	107	0	44	---
33	2	105	0	44	1.000
34	104	3	44	0	0.553
35	0	107	0	44	---
36	0	107	2	42	0.084
37	1	106	0	44	1.000
38	0	107	0	44	---
39	1	106	0	44	1.000
40	0	107	0	44	1.000
41	0	107	0	44	1.000
42	0	107	0	44	1.000
43	1	106	0	44	1.000
44	0	107	0	44	---
45	1	106	0	44	1.000
46	0	107	1	43	0.291
47	1	106	0	44	1.000
48	1	106	0	44	1.000
49	1	106	0	44	1.000
50	0	107	0	44	---
51	1	106	0	44	1.000
52	13	94	8	36	0.437
53	0	107	0	44	---
54	0	107	1	43	0.291

a=número de portadores e b=número de não portadores da variante no grupo PAIR e c=número de portadores e d=número de não portadores da variante no grupo PANO. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,0009$.

Tabela 32: Comparação das frequências das variantes entre NORMAL e PAIR+PANO nos genes *MT-RNR1* (1 a 42) e *MT-TS1* (43 a 54).

Variante	a	b	c	d	p
1	1	103	0	151	0.408
2	1	103	7	144	0.147
3	0	104	1	150	1.000
4	9	95	14	137	1.000
5	2	102	2	149	1.000
6	51	53	69	82	0.612
7	1	103	0	151	0.408
8	24	80	20	131	0.045
9	0	104	1	150	1.000
10	0	104	2	149	0.515
11	0	104	1	150	1.000
12	0	104	1	150	1.000
13	14	90	10	141	0.081
14	1	103	0	151	0.408
15	7	97	9	142	0.799
16	0	104	1	150	1.000
17	0	104	1	150	1.000
18	1	103	1	150	1.000
19	1	103	0	151	0.408
20	2	102	0	151	0.165
21	2	102	2	149	1.000
22	0	104	1	150	1.000
23	0	104	2	149	0.515
24	18	86	18	133	0.273
25	1	103	0	151	0.408
26	2	102	4	147	1.000
27	1	103	0	151	0.408
28	6	98	11	140	0.800
29	0	104	1	150	1.000
30	0	104	1	150	1.000
31	1	103	0	151	0.408
32	0	104	0	151	---
33	0	104	2	149	0.515
34	102	2	148	3	1.000
35	0	104	0	151	---
36	1	103	2	149	1.000
37	0	104	1	150	1.000
38	1	103	0	151	0.408
39	0	104	1	150	1.000
40	1	103	0	151	0.408
41	1	103	0	151	0.408
42	1	103	0	151	0.408
43	0	104	1	150	1.000
44	1	103	0	151	0.408
45	0	104	1	150	1.000
46	0	104	1	150	1.000
47	0	104	1	150	1.000
48	0	104	1	150	1.000
49	0	104	1	150	1.000
50	1	103	0	151	0.408
51	2	102	1	150	0.569
52	25	79	21	130	0.047
53	1	103	0	151	0.408
54	0	104	1	150	1.000

a=número de portadores e b=número de não portadores da variante no grupo NORMAL e c=número de portadores e d=número de não portadores da variante no grupo PAIR+PANO. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,0009$.

B) Comparação entre os grupos PAIR, PANO e NORMAL do número total de variantes detectadas por indivíduos nos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1*.

A Tabela 33 apresenta os resultados da estatística descritiva do número total de variantes do DNAm na região que contém o gene *MT-RNR1* por indivíduo, entre as amostras PAIR, PANO e NORMAL.

Tabela 33: Número total de variantes do DNAm na região do gene *MT-RNR1* por indivíduo dos grupos PAIR, PANO e NORMAL.

	PAIR	PANO	NORMAL
Média	2,234	2,159	2,433
I.C. 95%	1,956-2,511	1,843-2,475	2,126-2,739
Tamanho da Amostra	107	44	104
Desvio Padrão	1,444	1,641	1,593
Erro Padrão da Média	0,140	0,247	0,156
Mediana	2,000	1,000	2,000

A Tabela 34 apresenta os resultados da estatística descritiva do número total de variantes do DNAm nas regiões que contém os gene *MT-TS1* por indivíduo, entre indivíduos das amostras PAIR, PANO e NORMAL.

Tabela 34: Número de variantes do DNAm na região do amplicon que contém o gene *MT-TS1* por indivíduo dos grupos PAIR, PANO e NORMAL.

	PAIR	PANO	NORMAL
Média	0,178	0,227	0,288
I.C. 95%	0,087-0,268	0,098-0,356	0,188-0,389
Tamanho da Amostra	107	44	104
Desvio Padrão	0,472	0,424	0,513
Erro Padrão da Média	0,046	0,064	0,051
Mediana	0,000	0,000	0,000

A Tabela 35 apresenta a comparação do número de pessoas sem variantes em relação aos indivíduos com pelo menos uma variante entre os grupos PAIR, PANO e NORMAL. Essa tabela mostra que entre os grupos não há diferença significativa da frequência de indivíduos sem alterações na sequência do DNAm em comparação com a frequência de indivíduos com pelo menos uma variante quando consideramos cada amplicon do gene *MT-RNR1*, isoladamente. Entretanto, todos os indivíduos dessa amostra apresentaram pelo menos uma variante na sequência de DNAm quando consideramos o gene *MT-RNR1* inteiro, isso impossibilitou a comparação entre os grupos em relação a esse amplicon. Reunimos os indivíduos sem variantes com aqueles com apenas uma em um grupo e aqueles que apresentavam mais do que uma variante em outro e repetimos os testes (Tabela 36). Os resultados dessa segunda comparação também não foram significativos. Aparentemente a quantidade

de variantes dos genes *MT-RNR1* e *MT-TD* presentes no indivíduo não influencia a manifestação da PAIR.

Tabela 35: Comparações do número de pessoas com 0 em relação a aquelas com pelo menos uma variante no gene *MT-RNR1* (amplicons “A” e “B”) e no amplicon que contém o gene *MT-TS1* entre os grupos PAIR, PANO e NORMAL.

Gene	Amostra	0	>0	χ^2	graus de liberdade	p
<i>MT-RNR1</i> A	NORMAL	48	56	2.968	2	0,227
	PAIR	52	55			
	PANO	27	17			
<i>MT-RNR1</i> A	NORMAL	48	56	0.9360	1	0,333
	PAIR+PANO	79	72			
<i>MT-RNR1</i> B	NORMAL	2	102	1,076	2	0,584
	PAIR	1	106			
	PANO	0	44			
<i>MT-RNR1</i> B	NORMAL	2	102	0,842	1	0,359
	PAIR+PANO	1	150			
<i>MT-RNR1</i> inteiro	NORMAL	0	104			
	PAIR	0	107			
	PANO	0	44			
<i>MT-RNR1</i> inteiro	NORMAL	0	104			
	PAIR+PANO	0	151			
<i>MT-TS1</i>	NORMAL	77	27	4.812	2	0,090
	PAIR	92	15			
	PANO	34	10			
<i>MT-TS1</i>	NORMAL	77	27	3.556	1	0,067
	PAIR+PANO	126	25			

Tabela 36: Comparações do número de pessoas com 0 ou 1 variante em relação a aquelas com mais do que 1 variante no gene *MT-RNR1* (amplicons “A” e “B”) e no amplicon que contém o gene *MT-TS1* entre os grupos PAIR, PANO e NORMAL.

Gene	Amostra	0 ou 1	>1	χ^2	graus de liberdade	p
<i>MT-RNR1</i> A	NORMAL	63	41	4,397	2	0,111
	PAIR	53	54			
	PANO	29	15			
<i>MT-RNR1</i> A	NORMAL	63	41	0,988	1	0,320
	PAIR+PANO	82	69			
<i>MT-RNR1</i> B	NORMAL	99	5	2,075	2	0,354
	PAIR	99	8			
	PANO	39	5			
<i>MT-RNR1</i> B	NORMAL	99	5	1,357	1	0,244
	PAIR+PANO	138	13			
<i>MT-RNR1</i> inteiro	NORMAL	44	60	2,807	2	0,246
	PAIR	47	60			
	PANO	25	19			
<i>MT-RNR1</i> inteiro	NORMAL	44	60	0,717	1	0,397
	PAIR+PANO	72	79			
<i>MT-TS1</i>	NORMAL	101	3	1,645	2	0,439
	PAIR	103	4			
	PANO	44	0			
<i>MT-TS1</i>	NORMAL	101	3	0,013	1	
	PAIR+PANO	147	4			

C) Estudo do desequilíbrio de ligação entre as variantes do DNA mitocondrial.

Os haplótipos que o seqüenciamento dos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1* permitiu identificar nos indivíduos dos grupos PAIR, PANO e NORMAL estão listados nas Tabelas 37 e 38, juntamente com suas frequências absolutas.

As frequências observadas de todos os haplótipos completos nos dois genes mitocondriais são sempre muito baixas, o que não permite uma análise estatística robusta. Dessa forma, as análises dos efeitos dos haplótipos a seguir compreenderam somente dez posições nucleotídicas, selecionadas por serem as mais polimórficas identificadas nesse estudo. Foram selecionadas nove posições no gene

MT-RNR1 e uma no gene *MT-TS1*. Essas dez posições mais polimórficas foram selecionadas a partir das Tabelas 28 e 29 e correspondem às variantes cujas somas das frequências observadas nos três grupos ultrapassaram 8%. Para as análises a seguir, as variantes foram identificadas de acordo com a numeração apresentada na Tabela 39.

A Tabela 40 apresenta as frequências dos haplótipos completos relacionados às dez posições nucleotídicas mais polimórficas do DNAm_t que ocorreram nesse estudo.

Ainda para melhorar a confiabilidade da análise estatística, foram analisados os haplótipos relativos somente a pares de variantes e não a muitas delas simultaneamente (pois isso reduziria muito o número absoluto de indivíduos com cada combinação). A Tabela 41 apresenta as frequências dos haplótipos dos pares de variantes formados a partir das dez posições nucleotídicas mais polimórficas dos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1*.

A Tabela 42 apresenta os resultados da análise de desequilíbrio de ligação entre as dez posições nucleotídicas mais polimórficas dos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1* combinadas duas a duas entre os indivíduos do grupo PAIR. A quantidade de testes realizados (as dez variantes podem ser combinadas de 45 maneiras diferentes) diminui a confiabilidade do teste impondo a necessidade de correção. Utilizando a correção de Bonferroni, os valores de χ^2 inferiores a 10,6 ($p=0,0011$) foram considerados não significativos. Assim, notamos que as frequências observadas das combinações das variantes das posições 2/3 (709/750), 2/9 (709/1438), 3/4 (750/769), 4/5 (769/825), 5/7 (825/1018) e 8/9 (1154/1438) diferiram significativamente das esperadas. A mesma análise aplicada ao grupo PANO (Tabela 43) revelou que as frequências observadas dos haplótipos das posições 3/4 (750/769), 3/7 (750/1018), 4/5 (769/825), 4/7 (769/1018), 4/10 (769/7521), 5/7 (825/1018), 5/10 (825/7521), 7/10 (1018/7521) diferiram significativamente das esperadas. Considerando o aglutinado PAIR+PANO (Tabela 43) o estudo de desequilíbrio de ligação mostrou que as frequências observadas para os haplótipos das posições 2/3 (709/750), 2/9 (709/1438), 3/4 (750/769), 3/6 (750/827), 3/7 (750/1018), 4/5 (769/825), 4/7 (769/1018), 4/10 (769/7521), 5/7 (825/1018), 5/10 (825/7521), 7/10 (1018/7521), 8/9 (1154/7521) também diferiram significativamente das esperadas. Por fim, a Tabela 45 apresenta a análise de desequilíbrio de ligação para os indivíduos do grupo NORMAL. As frequências observadas para os haplótipos das posições 3/4 (750/769), 3/5 (750/825), 4/5 (769/825) e 4/10 (769/7521), diferiram significativamente das esperadas.

Tabela 38: Frequência dos haplótipos completos dos indivíduos dos grupos PAIR, PANO e NORMAL na região correspondente ao *MT-TSI*. O número 1 indica a presença e o 0 indica a ausência da substituição correspondente em relação à sequência de referência (Anderson e col., 1981). A variante é identificada pela numeração de 43 a 54 conforme a Tabela 30.

Gene <i>MT-TSI</i> = 12 posições					
Haplótipos do grupo PAIR		Haplótipos do grupo PANO		Haplótipos do grupo NORMAL	
43-----54	total	43-----54	total	43-----54	total
000000000000	92	000000000000	34	000000000000	77
000000000100	9	000000000001	1	000000000010	1
000000001100	1	000000000100	8	000000000100	22
000000100100	1	000100000000	1	000000001100	2
000001000000	1	-----		000000010100	1
000010000100	1	Total	44	010000000000	1
001000000100	1			-----	
100000000000	1			Total	104

Total	107				

Tabela 39: Numeração que identifica as dez posições mais polimórficas dos genes *MT-RNR1* e *MT-TSI* nas análises estatísticas.

Na Tabela 20 corresponde ao nº		Variante no DNAm ^t	
		Posição	Gene
1 ^a	02	663A-G	<i>MT-RNR1</i>
2 ^a	04	709G-A	<i>MT-RNR1</i>
3 ^a	06	750A-G	<i>MT-RNR1</i>
4 ^a	08	769G-A	<i>MT-RNR1</i>
5 ^a	13	825T-A	<i>MT-RNR1</i>
6 ^a	15	827A-G	<i>MT-RNR1</i>
7 ^a	24	1018G-A	<i>MT-RNR1</i>
8 ^a	28	1154delA	<i>MT-RNR1</i>
9 ^a	34	1438A-G	<i>MT-RNR1</i>
10 ^a	52	7521G-A	<i>MT-TD</i>

Tabela 40: Frequência absoluta dos haplótipos completos dos indivíduos dos grupos PAIR, PANO e NORMAL para as dez posições nucleotídicas mais polimórficas dos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1*. O número 1 indica a presença e o 0 indica a ausência da substituição correspondente em relação à sequência de referência (Anderson e col., 1981).

Dez sítios mais variáveis dos genes <i>MT-RNR1</i> e <i>MT-TS1</i>					
Haplótipos do grupo PAIR		Haplótipos do grupo PANO		Haplótipos do grupo NORMAL	
1-----10	Total	1-----10	Total	1-----10	Total
0000000010	42	0000000010	24	0000000010	29
0000000011	3	0000000011	1	0000000011	3
0000000010	1	0000000110	2	0000000010	12
0000000011	1	0010000010	3	0000000011	1
0000000101	1	0010010010	3	0000000110	1
0000000110	4	0010011010	1	0000000111	1
0000001010	1	0011010011	1	0000000110	2
0000101010	2	0011100011	1	0000001010	1
0010000010	15	0011101011	3	0000001010	2
0010000011	2	0110000010	2	0000001011	1
0010000010	4	0111001011	1	0010000000	1
0010000111	1	0111001111	1	0010000010	5
0010001010	1	1010000010	1	0010000010	5
0010010010	1	-----		0010000011	1
0010010110	1	Total	44	0010001010	2
0010011010	1			0010010010	2
0011000010	2			0010010010	1
0011000010	1			0010011010	2
0011001010	3			0010100010	1
0011100011	2			0011000000	1
0011101010	2			0011000010	1
0110000000	1			0011000011	2
0110000010	3			0011000011	1
0110000010	2			0011000111	2
0110001011	1			0011001011	3
0111000010	2			0011001011	1
0111001101	1			0011100010	2
1010000010	3			0011100011	1
1010000011	1			0011100011	1
1010000010	1			0011101010	2
1010010010	1			0011101011	2
-----				0011101011	1
Total	107			0011110011	1
				0110000010	2
				0110000011	1
				0110000010	1
				0110001010	1
				0110010010	1
				0111100010	1
				0111100011	1
				0111100011	1
				1010000010	1

				Total	104

Tabela 41: Frequências absolutas dos haplótipos relacionados às dez posições nucleotídicas mais polimórficas (combinadas aos pares) dos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1* nos grupos PAIR, PANO e NORMAL.

PAIR						PANO						NORMAL					
i	j	n00	n01	n10	n11	i	j	n00	n01	n10	n11	i	j	n00	n01	n10	n11
1	2	91	10	6	0	1	2	39	4	1	0	1	2	94	9	1	0
1	3	55	46	0	6	1	3	27	16	0	1	1	3	53	50	0	1
1	4	88	13	6	0	1	4	36	7	1	0	1	4	79	24	1	0
1	5	95	6	6	0	1	5	39	4	1	0	1	5	89	14	1	0
1	6	98	3	5	1	1	6	38	5	1	0	1	6	96	7	1	0
1	7	89	12	6	0	1	7	37	6	1	0	1	7	85	18	1	0
1	8	93	8	6	0	1	8	40	3	1	0	1	8	97	6	1	0
1	9	3	98	0	6	1	9	0	43	0	1	1	9	2	101	0	1
1	10	89	12	5	1	1	10	35	8	1	0	1	10	78	25	1	0
2	3	55	42	0	10	2	3	27	13	0	4	2	3	53	42	0	9
2	4	87	10	7	3	2	4	35	5	2	2	2	4	74	21	6	3
2	5	91	6	10	0	2	5	36	4	4	0	2	5	84	11	6	3
2	6	93	4	10	0	2	6	35	5	4	0	2	6	89	6	8	1
2	7	87	10	8	2	2	7	36	4	2	2	2	7	78	17	8	1
2	8	90	7	9	1	2	8	38	2	3	1	2	8	89	6	9	0
2	9	1	96	2	8	2	9	0	40	0	4	2	9	2	93	0	9
2	10	86	11	8	2	2	10	34	6	2	2	2	10	73	22	6	3
3	4	55	0	39	13	3	4	27	0	10	7	3	4	53	0	27	24
3	5	53	2	48	4	3	5	27	0	13	4	3	5	53	0	37	14
3	6	55	0	48	4	3	6	27	0	12	5	3	6	53	0	44	7
3	7	52	3	43	9	3	7	27	0	11	6	3	7	49	4	37	14
3	8	50	5	49	3	3	8	25	2	16	1	3	8	49	4	49	2
3	9	1	54	2	50	3	9	0	27	0	17	3	9	0	53	2	49
3	10	50	5	44	8	3	10	26	1	10	7	3	10	47	6	32	19
4	5	92	2	9	4	4	5	37	0	3	4	4	5	79	1	11	13
4	6	90	4	13	0	4	6	33	4	6	1	4	6	74	6	23	1
4	7	88	6	7	6	4	7	36	1	2	5	4	7	71	9	15	9
4	8	87	7	12	1	4	8	35	2	6	1	4	8	76	4	22	2
4	9	2	92	1	12	4	9	0	37	0	7	4	9	1	79	1	23
4	10	84	10	10	3	4	10	37	1	0	7	4	10	72	8	7	17
5	6	97	4	6	0	5	6	35	5	4	0	5	6	84	6	13	1
5	7	93	8	2	4	5	7	37	3	1	3	5	7	77	13	9	5
5	8	93	8	6	0	5	8	37	3	4	0	5	8	84	6	14	0
5	9	3	98	0	6	5	9	40	0	4	0	5	9	2	88	0	14
5	10	90	11	4	2	5	10	36	4	0	4	5	10	73	17	6	8
6	7	92	11	3	1	6	7	34	5	4	1	6	7	81	16	5	2
6	8	96	7	3	1	6	8	36	3	5	0	6	8	91	6	7	0
6	9	3	100	0	4	6	9	0	39	0	5	6	9	2	95	0	7
6	10	90	13	4	0	6	10	32	7	4	1	6	10	73	24	6	1
7	8	88	7	11	1	7	8	36	2	5	1	7	8	80	6	18	0
7	9	2	93	1	11	7	9	0	38	0	6	7	9	2	84	0	18
7	10	84	11	10	2	7	10	35	3	1	5	7	10	69	17	10	8
8	9	1	98	2	6	8	9	0	41	0	3	8	9	2	96	0	6
8	10	89	10	5	3	8	10	34	7	2	1	8	10	76	22	3	3
9	10	1	2	93	11	9	10	0	0	36	8	9	10	2	0	77	25

i = número da variante a montante

j = número da variante a jusante

n= número de indivíduos com:

00= ausência das duas variantes (i,j)

01= presença da variante à jusante (j)

10= presença da variante à montante (i)

11= presença das duas variantes (i, j)

Tabela 42: Estimativas dos valores de desequilíbrio de ligação entre as dez posições nucleotídicas mais polimórficas dos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1* nos indivíduos do grupo PAIR.

Variante i j	P(00)	P(01)	P(10)	P(11)	P(1,)	P(,1)	VDL	χ^2
1 2	0,850	0,093	0,056	0,000	0,056	0,093	-0,005	0,655
1 3	0,514	0,430	0,000	0,056	0,056	0,486	0,029	6,723
1 4	0,822	0,121	0,056	0,000	0,056	0,121	-0,007	0,879
1 5	0,888	0,056	0,056	0,000	0,056	0,056	-0,003	0,378
1 6	0,916	0,028	0,047	0,009	0,056	0,037	0,007	2,952
1 7	0,832	0,112	0,056	0,000	0,056	0,112	-0,006	0,803
1 8	0,869	0,075	0,056	0,000	0,056	0,075	-0,004	0,514
1 9	0,028	0,916	0,000	0,056	0,056	0,972	0,002	0,183
1 10	0,832	0,112	0,047	0,009	0,056	0,121	0,003	0,122
2 3	0,514	0,393	0,000	0,093	0,093	0,486	0,048	11,667
2 4	0,813	0,093	0,065	0,028	0,093	0,121	0,017	3,293
2 5	0,850	0,056	0,093	0,000	0,093	0,056	-0,005	0,655
2 6	0,869	0,037	0,093	0,000	0,093	0,037	-0,003	0,428
2 7	0,813	0,093	0,075	0,019	0,093	0,112	0,008	0,855
2 8	0,841	0,065	0,084	0,009	0,093	0,075	0,002	0,102
2 9	0,009	0,897	0,019	0,075	0,093	0,972	-0,016	11,970
2 10	0,804	0,103	0,075	0,019	0,093	0,121	0,007	0,637
3 4	0,514	0,000	0,364	0,121	0,486	0,121	0,062	15,652
3 5	0,495	0,019	0,449	0,037	0,486	0,056	0,010	0,831
3 6	0,514	0,000	0,449	0,037	0,486	0,037	0,019	4,395
3 7	0,486	0,028	0,402	0,084	0,486	0,112	0,030	3,771
3 8	0,467	0,047	0,458	0,028	0,486	0,075	-0,008	0,426
3 9	0,009	0,505	0,019	0,467	0,486	0,972	-0,005	0,403
3 10	0,467	0,047	0,411	0,075	0,486	0,121	0,016	0,992
4 5	0,86	0,019	0,084	0,037	0,121	0,056	0,031	17,700
4 6	0,841	0,037	0,121	0	0,121	0,037	-0,005	0,575
4 7	0,822	0,056	0,065	0,056	0,121	0,112	0,042	18,142
4 8	0,813	0,065	0,112	0,009	0,121	0,075	0	0,001
4 9	0,019	0,86	0,009	0,112	0,121	0,972	-0,006	1,298
4 10	0,785	0,093	0,093	0,028	0,121	0,121	0,013	1,655
5 6	0,907	0,037	0,056	0	0,056	0,037	-0,002	0,247
5 7	0,869	0,075	0,019	0,037	0,056	0,112	0,031	19,629
5 8	0,869	0,075	0,056	0	0,056	0,075	-0,004	0,514
5 9	0,028	0,916	0	0,056	0,056	0,972	0,002	0,183
5 10	0,841	0,103	0,037	0,019	0,056	0,121	0,012	2,673
6 7	0,86	0,103	0,028	0,009	0,037	0,112	0,005	0,793
6 8	0,897	0,065	0,028	0,009	0,037	0,075	0,007	1,845
6 9	0,028	0,935	0	0,037	0,037	0,972	0,001	0,120
6 10	0,841	0,121	0,037	0	0,037	0,121	-0,005	0,575
7 8	0,822	0,065	0,103	0,009	0,112	0,075	0,001	0,014
7 9	0,019	0,869	0,009	0,103	0,112	0,972	-0,006	1,516
7 10	0,785	0,103	0,093	0,019	0,112	0,121	0,005	0,258
8 9	0,009	0,916	0,019	0,056	0,075	0,972	-0,017	15,632
8 10	0,832	0,093	0,047	0,028	0,075	0,121	0,019	5,206
9 10	0,009	0,019	0,869	0,103	0,972	0,121	-0,015	8,595

00= frequência observada do haplotipo com ausência das duas variantes

01= frequência observada do haplotipo com presença da variante à jusante

10= frequência observada do haplotipo com presença da variante à montante

11= frequência observada do haplotipo com presença das duas variantes

.1= frequência esperada da variante a jusante

1.= frequência esperada da variante a montante

VDL=valor de desequilíbrio de ligação

χ^2 teste de VDL=0

Os valores significativos estão destacados em cinza. Aplicando a correção de Bonferroni permanecem significativos apenas os valores de χ^2 superiores a 10,6.

Tabela 43: Estimativas dos valores de desequilíbrio de ligação entre os dez sítios mais polimórficos dos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1* nos indivíduos do grupo PANO.

Variante i	Variante i	P(00)	P(01)	P(10)	P(11)	P(1,)	P(,1)	VDL	χ^2
1	2	0,886	0,091	0,023	0,000	0,023	0,091	-0,002	0,102
1	3	0,614	0,364	0,000	0,023	0,023	0,386	0,014	1,625
1	4	0,818	0,159	0,023	0,000	0,023	0,159	-0,004	0,194
1	5	0,886	0,091	0,023	0,000	0,023	0,091	-0,002	0,102
1	6	0,864	0,114	0,023	0,000	0,023	0,114	-0,003	0,131
1	7	0,841	0,136	0,023	0,000	0,023	0,136	-0,003	0,162
1	8	0,909	0,068	0,023	0,000	0,023	0,068	-0,002	0,075
1	10	0,795	0,182	0,023	0,000	0,023	0,182	-0,004	0,227
2	3	0,614	0,295	0,000	0,091	0,091	0,386	0,056	6,988
2	4	0,795	0,114	0,045	0,045	0,091	0,159	0,031	3,822
2	5	0,818	0,091	0,091	0,000	0,091	0,091	-0,008	0,440
2	6	0,795	0,114	0,091	0,000	0,091	0,114	-0,010	0,564
2	7	0,818	0,091	0,045	0,045	0,091	0,136	0,033	4,940
2	8	0,864	0,045	0,068	0,023	0,091	0,068	0,017	2,289
2	10	0,773	0,136	0,045	0,045	0,091	0,182	0,029	2,994
3	4	0,614	0,000	0,227	0,159	0,386	0,159	0,098	13,221
3	5	0,614	0,000	0,295	0,091	0,386	0,091	0,056	6,988
3	6	0,614	0,000	0,273	0,114	0,386	0,114	0,070	8,959
3	7	0,614	0,000	0,250	0,136	0,386	0,136	0,084	11,034
3	8	0,568	0,045	0,364	0,023	0,386	0,068	-0,004	0,038
3	10	0,591	0,023	0,227	0,159	0,386	0,182	0,089	9,847
4	5	0,841	0,000	0,068	0,091	0,159	0,091	0,076	23,257
4	6	0,750	0,091	0,136	0,023	0,159	0,114	0,005	0,071
4	7	0,818	0,023	0,045	0,114	0,159	0,136	0,092	23,608
4	8	0,795	0,045	0,136	0,023	0,159	0,068	0,012	0,731
4	10	0,818	0,023	0,000	0,159	0,159	0,182	0,130	37,459
5	6	0,795	0,114	0,091	0,000	0,091	0,114	-0,010	0,564
5	7	0,841	0,068	0,023	0,068	0,091	0,136	0,056	14,068
5	8	0,841	0,068	0,091	0,000	0,091	0,068	-0,006	0,322
5	10	0,818	0,091	0,000	0,091	0,091	0,182	0,074	19,800
6	7	0,773	0,114	0,091	0,023	0,114	0,136	0,007	0,194
6	8	0,818	0,068	0,114	0,000	0,114	0,068	-0,008	0,413
6	10	0,727	0,159	0,091	0,023	0,114	0,182	0,002	0,013
7	8	0,818	0,045	0,114	0,023	0,136	0,068	0,013	1,061
7	10	0,795	0,068	0,023	0,114	0,136	0,182	0,089	19,824
8	10	0,773	0,159	0,045	0,023	0,068	0,182	0,010	0,497

00= frequência observada do haplotipo com ausência das duas variantes

01= frequência observada do haplotipo com presença da variante à jusante

10= frequência observada do haplotipo com presença da variante à montante

11= frequência observada do haplotipo com presença das duas variantes

.1= frequência esperada da variante a jusante

1.= frequência esperada da variante a montante

VDL=valor de desequilíbrio de ligação

χ^2 teste de VDL=0.

Na posição nove não houve comparação entre os indivíduos do grupo PANO, pois todos são portadores da mesma variante 1438G.

Os valores significativos estão destacados em cinza. Aplicando a correção de Bonferroni permanecem significativos apenas os valores de χ^2 superiores a 10,6.

Tabela 44: Estimativas dos valores de desequilíbrio de ligação entre os nove sítios mais polimórficos dos genes *MT-RNR1* *MT-TS1* considerando conjuntamente os grupos PAIR e PANO.

Variante i	Variante i	P(00)	P(01)	P(10)	P(11)	P(1,)	P(,1)	VDL	χ^2
1	2	0,861	0,093	0,046	0,000	0,046	0,093	-0,004	0,750
1	3	0,543	0,411	0,000	0,046	0,046	0,457	0,025	8,723
1	4	0,821	0,132	0,046	0,000	0,046	0,132	-0,006	1,121
1	5	0,887	0,066	0,046	0,000	0,046	0,066	-0,003	0,521
1	6	0,901	0,053	0,040	0,007	0,046	0,060	0,004	0,908
1	7	0,834	0,119	0,046	0,000	0,046	0,119	-0,006	0,993
1	8	0,881	0,073	0,046	0,000	0,046	0,073	-0,003	0,577
1	9	0,020	0,934	0,000	0,046	0,046	0,980	0,001	0,149
1	10	0,821	0,132	0,040	0,007	0,046	0,139	0,000	0,001
2	3	0,543	0,364	0,000	0,093	0,093	0,457	0,050	18,338
2	4	0,808	0,099	0,060	0,033	0,093	0,132	0,021	6,780
2	5	0,841	0,066	0,093	0,000	0,093	0,066	-0,006	1,094
2	6	0,848	0,060	0,093	0,000	0,093	0,060	-0,006	0,978
2	7	0,815	0,093	0,066	0,026	0,093	0,119	0,015	4,075
2	8	0,848	0,060	0,079	0,013	0,093	0,073	0,006	1,120
2	9	0,007	0,901	0,013	0,079	0,093	0,980	-0,011	11,986
2	10	0,795	0,113	0,066	0,026	0,093	0,139	0,014	2,771
3	4	0,543	0,000	0,325	0,132	0,457	0,132	0,072	27,397
3	5	0,530	0,013	0,404	0,053	0,457	0,066	0,023	5,079
3	6	0,543	0,000	0,397	0,060	0,457	0,060	0,032	11,374
3	7	0,523	0,020	0,358	0,099	0,457	0,119	0,045	11,667
3	8	0,497	0,046	0,430	0,026	0,457	0,073	-0,007	0,416
3	9	0,007	0,536	0,013	0,444	0,457	0,980	-0,004	0,542
3	10	0,503	0,040	0,358	0,099	0,457	0,139	0,036	6,509
4	5	0,854	0,013	0,079	0,053	0,132	0,066	0,044	41,531
4	6	0,815	0,053	0,126	0,007	0,132	0,060	-0,001	0,038
4	7	0,821	0,046	0,060	0,073	0,132	0,119	0,057	40,748
4	8	0,808	0,060	0,119	0,013	0,132	0,073	0,004	0,252
4	9	0,013	0,854	0,007	0,126	0,132	0,980	-0,004	1,075
4	10	0,795	0,073	0,066	0,066	0,132	0,139	0,048	25,082
5	6	0,874	0,060	0,066	0,000	0,066	0,060	-0,004	0,679
5	7	0,861	0,073	0,020	0,046	0,066	0,119	0,038	34,406
5	8	0,861	0,073	0,066	0,000	0,066	0,073	-0,005	0,841
5	9	0,020	0,914	0,000	0,066	0,066	0,980	0,001	0,217
5	10	0,834	0,099	0,026	0,040	0,066	0,139	0,031	19,003
6	7	0,834	0,106	0,046	0,013	0,060	0,119	0,006	0,967
6	8	0,874	0,066	0,053	0,007	0,060	0,073	0,002	0,207
6	9	0,020	0,921	0,000	0,060	0,060	0,980	0,001	0,194
6	10	0,808	0,132	0,053	0,007	0,060	0,139	-0,002	0,062
7	8	0,821	0,060	0,106	0,013	0,119	0,073	0,005	0,443
7	9	0,013	0,868	0,007	0,113	0,119	0,980	-0,004	1,337
7	10	0,788	0,093	0,073	0,046	0,119	0,139	0,030	10,652
8	9	0,007	0,921	0,013	0,060	0,073	0,980	-0,012	15,980
8	10	0,815	0,113	0,046	0,026	0,073	0,139	0,016	4,997
9	10	0,007	0,013	0,854	0,126	0,980	0,139	-0,010	7,116

00= frequência observada do haplotipo com ausência das duas variantes

01= frequência observada do haplotipo com presença da variante à jusante

10= frequência observada do haplotipo com presença da variante à montante

11= frequência observada do haplotipo com presença das duas variantes

.1= frequência esperada da variante a jusante

1.= frequência esperada da variante a montante

VDL=valor de desequilíbrio de ligação

χ^2 teste de VDL=0.

Os valores significativos estão destacados em cinza. Aplicando a correção de Bonferroni permanecem significativos apenas os valores de χ^2 superiores a 10,6.

Tabela 45: Estimativas dos valores de desequilíbrio de ligação entre as dez posições nucleotídicas mais polimórficas dos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1* nos indivíduos do grupo NORMAL.

Variante i i		P(00)	P(01)	P(10)	P(11)	P(1,)	P(,1)	VDL	χ^2
1	2	0,904	0,087	0,010	0,000	0,010	0,087	-0,001	0,096
1	3	0,510	0,481	0,000	0,010	0,010	0,490	0,005	1,049
1	4	0,760	0,231	0,010	0,000	0,010	0,231	-0,002	0,303
1	5	0,856	0,135	0,010	0,000	0,010	0,135	-0,001	0,157
1	6	0,923	0,067	0,010	0,000	0,010	0,067	-0,001	0,073
1	7	0,817	0,173	0,010	0,000	0,010	0,173	-0,002	0,211
1	8	0,933	0,058	0,010	0,000	0,010	0,058	-0,001	0,062
1	9	0,019	0,971	0,000	0,010	0,010	0,981	0,000	0,020
1	10	0,750	0,240	0,010	0,000	0,010	0,240	-0,002	0,320
2	3	0,510	0,404	0,000	0,087	0,087	0,490	0,044	10,239
2	4	0,712	0,202	0,058	0,029	0,087	0,231	0,009	0,584
2	5	0,808	0,106	0,058	0,029	0,087	0,135	0,017	3,340
2	6	0,856	0,058	0,077	0,010	0,087	0,067	0,004	0,301
2	7	0,750	0,163	0,077	0,010	0,087	0,173	-0,005	0,264
2	8	0,856	0,058	0,087	0,000	0,087	0,058	-0,005	0,603
2	9	0,019	0,894	0,000	0,087	0,087	0,981	0,002	0,193
2	10	0,702	0,212	0,058	0,029	0,087	0,240	0,008	0,466
3	4	0,510	0,000	0,260	0,231	0,490	0,231	0,118	32,424
3	5	0,510	0,000	0,356	0,135	0,490	0,135	0,069	16,812
3	6	0,510	0,000	0,423	0,067	0,490	0,067	0,034	7,799
3	7	0,471	0,038	0,356	0,135	0,490	0,173	0,050	7,194
3	8	0,471	0,038	0,471	0,019	0,490	0,058	-0,009	0,628
3	9	0,000	0,510	0,019	0,471	0,490	0,981	-0,010	2,119
3	10	0,452	0,058	0,308	0,183	0,490	0,240	0,065	9,573
4	5	0,760	0,010	0,106	0,125	0,231	0,135	0,094	44,376
4	6	0,712	0,058	0,221	0,010	0,231	0,067	-0,006	0,327
4	7	0,683	0,087	0,144	0,087	0,231	0,173	0,047	8,888
4	8	0,731	0,038	0,212	0,019	0,231	0,058	0,006	0,377
4	9	0,010	0,760	0,010	0,221	0,231	0,981	-0,005	0,833
4	10	0,692	0,077	0,067	0,163	0,231	0,240	0,108	37,415
5	6	0,808	0,058	0,125	0,010	0,135	0,067	0,001	0,004
5	7	0,740	0,125	0,087	0,048	0,135	0,173	0,025	3,830
5	8	0,808	0,058	0,135	0,000	0,135	0,058	-0,008	0,990
5	9	0,019	0,846	0,000	0,135	0,135	0,981	0,003	0,317
5	10	0,702	0,163	0,058	0,077	0,135	0,240	0,045	9,709
6	7	0,779	0,154	0,048	0,019	0,067	0,173	0,008	0,665
6	8	0,875	0,058	0,067	0,000	0,067	0,058	-0,004	0,459
6	9	0,019	0,913	0,000	0,067	0,067	0,981	0,001	0,147
6	10	0,702	0,231	0,058	0,010	0,067	0,240	-0,007	0,391
7	8	0,769	0,058	0,173	0,000	0,173	0,058	-0,010	1,333
7	9	0,019	0,808	0,000	0,173	0,173	0,981	0,003	0,427
7	10	0,663	0,163	0,096	0,077	0,173	0,240	0,035	4,964
8	9	0,019	0,923	0,000	0,058	0,058	0,981	0,001	0,125
8	10	0,731	0,212	0,029	0,029	0,058	0,240	0,015	2,350
9	10	0,019	0,000	0,740	0,240	0,981	0,240	0,005	0,645

00= frequência observada do haplotipo com ausência das duas variantes

01= frequência observada do haplotipo com presença da variante à jusante

10= frequência observada do haplotipo com presença da variante à montante

11= frequência observada do haplotipo com presença das duas variantes

.1= frequência esperada da variante a jusante

1.= frequência esperada da variante a montante

VDL=valor de desequilíbrio de ligação

χ^2 teste de VDL=0.

Os valores significativos estão destacados em cinza. Aplicando a correção de Bonferroni permanecem significativos apenas os valores de χ^2 superiores a 10,6.

D) Comparação da frequência dos haplótipos entre os grupos PAIR, PANO e NORMAL.

Os dados apresentados na Tabela 41 foram utilizados na realização de testes de heterogeneidade da distribuição das frequências dos haplótipos entre as amostras. Inicialmente foram comparados os grupos PAIR e PANO para se verificar a possibilidade de se agruparem essas duas amostras (Tabela 46). Após a correção de Bonferroni, apenas a combinação das variantes do DNAMt nas posições 769/7521 (4/10) apresentou diferença significativa ($\chi^2=14,033$; $p<0,005$). Ainda assim, optamos por agrupar PAIR e PANO porque, caso considerássemos essas amostras separadamente, a perda de informação pela redução do número de indivíduos portadores de haplótipos, para cada uma das 45 combinações, seria maior do que um possível viés resultante de diferenças entre as frequências do haplótipo (4/10). Realizado o teste de heterogeneidade do aglutinado PAIR+PANO em relação ao grupo NORMAL (Tabela 47) observamos que nessa análise não houve diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 46: Resultados dos testes de heterogeneidade entre os haplótipos dos indivíduos do grupo PAIR em relação ao grupo PANO para as dez posições nucleotídicas mais polimórficas no gene *MT-RNR1* {Hipótese nula: PAIR=PANO}

Variante		χ^2_1	χ^2_2	χ^2_3	χ^2_4	χ^2_5
i	j					
1	2	0,655	0,102	0,758	0,750	0,008
1	3	6,723	1,625	8,348	8,723	0,000
1	4	0,879	0,194	1,073	1,121	0,000
1	5	0,378	0,102	0,480	0,521	0,000
1	6	2,952	0,131	3,084	0,908	2,176
1	7	0,803	0,162	0,964	0,993	0,000
1	8	0,514	0,075	0,589	0,577	0,012
1	9	0,183	0,000	0,183	0,149	0,035
1	10	0,122	0,227	0,349	0,001	0,348
2	3	11,667	6,988	18,656	18,338	0,318
2	4	3,293	3,822	7,116	6,780	0,336
2	5	0,655	0,440	1,095	1,094	0,001
2	6	0,428	0,564	0,992	0,978	0,014
2	7	0,855	4,940	5,795	4,075	1,721
2	8	0,102	2,289	2,391	1,120	1,271
2	9	11,970	0,000	11,970	11,986	0,000
2	10	0,637	2,994	3,361	2,771	0,860
3	4	15,652	13,221	28,873	27,397	1,476
3	5	0,831	6,988	7,819	5,079	2,740
3	6	4,395	8,959	13,354	11,374	1,981
3	7	3,771	11,034	14,806	11,667	3,139
3	8	0,426	0,038	0,465	0,416	0,048
3	9	0,403	0,000	0,403	0,542	0,000
3	10	0,992	9,487	10,839	6,509	4,330
4	5	17,700	23,257	40,957	41,531	0,000
4	6	0,575	0,071	0,645	0,038	0,607
4	7	18,142	23,608	41,750	40,748	1,002
4	8	0,001	0,731	0,732	0,252	0,480
4	9	1,298	0,000	1,298	1,075	0,223
4	10	1,655	37,459	39,115	25,082	14,033
5	6	0,247	0,564	0,811	0,679	0,132
5	7	19,629	14,068	33,698	34,406	0,000
5	8	0,514	0,322	0,836	0,841	0,000
5	9	0,183	0,000	0,183	0,217	0,000
5	10	2,673	19,800	22,473	19,003	3,470
6	7	0,793	0,194	0,987	0,967	0,020
6	8	1,845	0,413	2,257	0,207	2,050
6	9	0,120	0,000	0,120	0,194	0,000
6	10	0,575	0,013	0,587	0,062	0,525
7	8	0,014	1,061	1,075	0,443	0,632
7	9	1,516	0,000	1,516	1,337	0,180
7	10	0,258	19,824	20,082	10,652	9,430
8	9	15,632	0,000	15,632	15,980	0,000
8	10	5,206	0,497	5,703	4,997	0,706
9	10	8,595	0,000	8,595	7,116	1,479

χ^2_1 =Valor de χ^2 para o grupo PAIR, 1 grau de liberdade.

χ^2_2 Valor de χ^2 para o grupo PANO, 1 grau de liberdade.

χ^2_3 =Soma dos valores de χ^2 , 2 graus de liberdade.

χ^2_4 =Valor de χ^2 de (PAIR+PANO), 1 grau de liberdade.

χ^2_5 : teste de heterogeneidade= $\chi^2_1 + \chi^2_2 - \chi^2_4$, 1 grau de liberdade.

Os valores significativos estão destacados em cinza. Aplicando a correção de Bonferroni permanecem significativos apenas os valores de χ^2_2 superiores a 10,6.

Tabela 47: Resultados dos testes de heterogeneidade entre os haplótipos dos indivíduos do grupo NORMAL e (PAIR + PANO) para as dez posições nucleotídicas mais polimórficas nos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1* {Hipótese nula: NORMAL=PAIR+PANO}

Variante		χ^2_1	χ^2_2	χ^2_3	χ^2_4	χ^2_5
i	j					
1	2	0,096	0,750	0,846	0,819	0,027
1	3	1,049	8,723	9,773	9,291	0,481
1	4	0,303	1,121	1,424	1,722	0,000
1	5	0,157	0,521	0,678	0,858	0,000
1	6	0,073	0,908	0,981	0,544	0,436
1	7	0,211	0,993	1,205	1,358	0,000
1	8	0,062	0,577	0,639	0,590	0,049
1	9	0,020	0,149	0,169	0,165	0,004
1	10	0,320	0,001	0,320	0,171	0,149
2	3	10,239	18,338	28,577	28,440	0,137
2	4	0,584	6,780	7,364	5,440	1,924
2	5	3,340	1,094	4,434	0,391	4,043
2	6	0,301	0,978	1,279	0,160	1,120
2	7	0,264	4,075	4,339	1,211	3,128
2	8	0,603	1,120	1,723	0,167	1,556
2	9	0,193	11,986	12,179	5,965	6,214
2	10	0,466	2,771	3,237	2,627	0,610
3	4	32,424	27,397	59,820	59,822	0,000
3	5	16,812	5,079	21,891	21,161	0,730
3	6	7,799	11,374	19,173	19,205	0,000
3	7	7,194	11,667	18,861	18,879	0,000
3	8	0,628	0,416	1,045	1,012	0,033
3	9	2,119	0,542	2,661	2,221	0,440
3	10	9,573	6,509	16,082	16,246	0,000
4	5	44,376	41,531	85,908	91,562	0,000
4	6	0,327	0,038	0,365	0,270	0,094
4	7	8,888	40,748	49,636	43,068	6,568
4	8	0,377	0,252	0,629	0,502	0,127
4	9	0,833	1,075	1,908	1,848	0,060
4	10	37,415	25,082	62,498	67,508	0,000
5	6	0,004	0,679	0,683	0,200	0,483
5	7	3,830	34,406	38,236	28,134	10,101
5	8	0,990	0,841	1,832	1,892	0,000
5	9	0,317	0,217	0,534	0,467	0,067
5	10	9,709	19,003	28,712	29,094	0,000
6	7	0,665	0,967	1,633	1,667	0,000
6	8	0,459	0,207	0,667	0,005	0,662
6	9	0,147	0,194	0,341	0,341	0,388
6	10	0,391	0,062	0,453	0,354	0,099
7	8	1,333	0,443	1,776	0,083	1,693
7	9	0,427	1,337	1,764	0,474	1,290
7	10	4,964	10,652	16,616	18,827	0,000
8	9	0,125	15,980	16,105	9,107	6,998
8	10	2,350	4,997	7,347	6,595	0,752
9	10	0,645	7,116	7,761	1,664	6,097

χ^2_1 =Valor de χ^2 para o grupo NORMAL, 1 grau de liberdade.

χ^2_2 Valor de χ^2 para o aglutinado PAIR+PANO, 1 grau de liberdade.

χ^2_3 =Soma dos valores de χ^2 , 2 graus de liberdade.

χ^2_4 =Valor de χ^2 de (NORMAL+PAIR+PANO), 1 grau de liberdade.

χ^2_5 : teste de heterogeneidade= $\chi^2_1 + \chi^2_2 - \chi^2_4$, 1 grau de liberdade.

Os valores significativos estão destacados em cinza. Aplicando a correção de Bonferroni permanecem significativos apenas os valores de χ^2 superiores a 10,6.

IV.5 – Estudos de Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) no Soro dos Indivíduos

A Tabela 48 apresenta as concentrações de peróxidos detectadas no soro dos 30 indivíduos selecionados para os testes de detecção de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo.

Tabela 48: Concentração de peróxidos presentes no soro dos indivíduos, determinada por meio do ensaio FOX.

NORMAL	IDADE	Concentração Normalizada	PAIR	IDADE	Concentração Normalizada
PAIR42	31	3,169	PAIR257	30	9,839
PAIR280	33	5,665	PAIR31	31	10,799
PAIR279	34	6,364	PAIR261	33	13,107
PAIR158	36	3,664	PAIR258	42	10,028
PAIR150	39	3,337	PAIR260	42	9,217
PAIR270	40	4,765	PAIR265	42	5,385
PAIR268	41	10,155	PAIR262	43	16,082
PAIR118	42	16,599	PAIR264	43	14,090
PAIR271	44	5,545	PAIR259	44	2,806
PAIR36	47	4,853	PAIR19	46	4,873
PAIR128	47	13,243	PAIR263	48	6,924
PAIR67	48	4,919	PAIR112	49	13,107
PAIR80	49	7,242	PAIR117	51	12,942
PAIR140	49	7,781	PAIR174	53	11,421
PAIR281	53	0,096	PAIR173	54	9,409

Concentração normalizada = μM de peróxido/mg de proteína por ml de soro $\times 10^{-2}$

A análise por meio de regressão linear não detectou correlação estatisticamente significativa entre a idade e a variação nas concentrações de peróxidos presentes no soro dos indivíduos ($R^2=0,05$). A análise também não detectou correlação significativa entre a presença da PAIR e a variação nas concentrações de peróxidos ($R^2=0,150$). Entretanto, o teste de Mann-Whitney identificou uma diferença significativa da mediana das concentrações de peróxido, que era maior no grupo PAIR ($p=0,048$).

A Tabela 49 apresenta as concentrações de grupos sulfidril (GSH, cisteínas e proteínas) detectadas no soro dos 30 indivíduos selecionados para os testes de detecção de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo.

A análise por meio de regressão linear não encontrou correlação estatisticamente significativa entre a idade e a variação nas concentrações de grupos sulfidril presentes no soro dos indivíduos ($R^2=0,240$). A análise não detectou diferença significativa entre as concentrações

de grupos sulfidrilica entre os indivíduos do grupo NORMAL em relação ao grupo PAIR ($R^2=0,114$), resultados confirmados pelo teste de Mann-Whitney ($p=0,073$).

Tabela 49: Concentração de grupos sulfidrilica presentes no soro dos indivíduos, determinada por meio do ensaio como reagente DTNB.

NORMAL	IDADE	Concentração Normalizada	PAIR	IDADE	Concentração Normalizada
PAIR42	31	5,781	PAIR257	30	7,119
PAIR280	33	1,774	PAIR31	31	5,535
PAIR279	34	8,637	PAIR261	33	5,772
PAIR158	36	2,615	PAIR258	42	3,535
PAIR150	39	3,518	PAIR260	42	4,716
PAIR270	40	1,885	PAIR265	42	2,791
PAIR268	41	3,208	PAIR262	43	4,733
PAIR118	42	2,389	PAIR264	43	5,885
PAIR271	44	2,686	PAIR259	44	2,671
PAIR36	47	6,945	PAIR19	46	3,750
PAIR128	47	3,808	PAIR263	48	2,851
PAIR67	48	1,933	PAIR112	49	3,773
PAIR80	49	3,366	PAIR117	51	5,387
PAIR140	49	3,881	PAIR174	53	3,180
PAIR281	53	3,853	PAIR173	54	5,404

Concentração normalizada = μM de sulfidrilica/mg de proteína por ml de soro $\times 10^{-2}$

V - DISCUSSÃO

V - DISCUSSÃO

V.1. - Caracterização da casuística e correlações entre perda de audição, sexo, etnia, história familiar, tabagismo, alcoolismos social, idade e tempo de exposição ao ruído.

O primeiro desafio do nosso trabalho foi obter uma amostra grande de indivíduos expostos a níveis elevados de ruído e com registros confiáveis do estado de sua audição. A presença de ruído nas empresas permitiu a obtenção de um registro detalhado do estado da audição dos indivíduos da casuística, graças à audiometrias periódicas que, pela legislação, tais empresas são obrigadas a realizar com seus funcionários.

Houve, no entanto, dificuldade em obter amostras. Havia o receio por parte dos dirigentes de que o estudo atrapalhasse a rotina da empresa. Uma empresa negou colaboração porque, na época de nosso contato, estava empenhada em aproveitar a boa demanda por seus produtos. Foi alegado que nossa presença deslocando funcionários para entrevistas e coleta de amostras de sangue comprometeria o andamento dos trabalhos. Suspeitamos também, que, em alguns casos, a recusa em colaborar foi resultado do receio de que a nossa pesquisa pudesse revelar falhas na prevenção da PAIR. Entretanto, nossa amostra alcançou tamanho razoável para um estudo de associação, uma abordagem interessante para a análise da suscetibilidade genética à PAIR, dado que o modelo de herança multifatorial é atraente para explicar essa condição.

Em primeiro lugar, observamos que a constituição étnica da nossa amostra era igual nos grupos caso e controle. Nossos resultados de testes do qui-quadrado, regressões logística simples e múltipla (Tabelas 5, 9, 10, e 13) mostraram que não houve diferença nas proporções de indivíduos dos diferentes grupos étnicos em nossa amostra. Isso é desejável em estudos de associação, pois reduz possíveis efeitos da estratificação étnica sobre as frequências alélicas nos grupos PAIR, PANO e NORMAL. Dessa forma, pudemos realizar as comparações considerando a amostra total. Há estudos que apontaram uma maior resistência de indivíduos negros ao ruído (Jerger e col., 1986; Henselman e col., 1995). Entretanto, nossa amostra não foi constituída de modo a permitir averiguar essa questão.

Outro problema inerente à constituição de nossa amostra foi a diferença de averiguação entre homens e mulheres. Como conseguimos indivíduos afetados por PAIR principalmente entre motoristas de ônibus, acabamos conseguindo uma amostra de indivíduos afetados por PAIR quase exclusivamente masculina. Já o grupo NORMAL foi obtido junto a uma empresa gráfica, um setor que permite uma maior participação feminina. Por essa razão, o grupo NORMAL acabou contando com mais mulheres. Assim, esse estudo não permite conclusões quanto à influência do

sexo na manifestação da PAIR.

Considerando o histórico familiar, observamos um aumento significativo de indivíduos com histórico familiar positivo entre os indivíduos com PAIR. Tanto as normas brasileiras quanto americanas alertam para a existência de uma correlação entre o histórico familiar de perda de audição positivo e o aumento no risco da manifestação de PAIR (ORDEM DE SERVIÇO INSS/DSS Nº 608; Prince, 2003). Para nossa surpresa, poucos estudos avaliaram a importância desse fator, apesar de o questionamento quanto à existência de pessoas da família com problemas de audição ser um item presente praticamente em todas as anamneses ocupacionais. Então, é possível que diversos estudos tenham feito a coleta da informação sobre o histórico familiar, porém esse dado poucas vezes foi analisado e publicado. De qualquer forma, o senso comum entre os profissionais da área aponta que antecedentes familiares aumentam o risco de ocorrência da PAIR. Por outro lado, os dois trabalhos realizados no país, que avaliaram a ocorrência de problemas auditivos na família dos indivíduos das suas casuísticas verificaram que não havia aumento na frequência de parentes com perda de audição (Correa Filho e col., 2002; Guerra e col., 2005). Não encontramos publicações no exterior que mencionassem a relação entre a história familiar e PAIR. Nosso levantamento minucioso do histórico familiar permitiu verificar que realmente há risco maior quando o indivíduo já tem um parente com problemas de audição (Tabelas 6, 9, 10, 11, 12, 13 e 14). Confirmando o observado, quando restringimos o critério considerando apenas os casos em que os indivíduos tivessem parentes em primeiro grau afetados, a redução da amostra não se refletiu em uma perda de significância; pelo contrário, o valor de p diminuiu para $< 0,0005$. Esse fato pode ser apontado como um indicativo da participação de genes na manifestação da PAIR. Quanto menor o grau de parentesco, maior a proporção de alelos que os indivíduos compartilham e maior o risco de perda de audição. Nosso achado é compatível com um modelo de herança multifatorial para explicar a PAIR.

Cruickshanks e col. (1998) apresentaram resultados de um estudo que sugeria que o hábito de fumar aumentava o risco de desenvolvimento de perdas auditivas mesmo sem associação ao ruído. Correa Filho e col., (2002) não observaram correlação entre a ocorrência de PAIR e o hábito de fumar. Por outro lado, Guerra e col. (2005) verificaram em seu estudo que o tabagismo, tanto atual como pregresso, foi um fator relevante no risco de manifestação da PAIR. Trabalhos no exterior também têm verificado que o tabagismo é um fator associado ao aumento de risco de manifestação da PAIR (Barone e col., 1987; Mizoue e col., 2003; Fortunato e col., 2004). Além disso, estudos recentes têm indicado que o tabagismo entre trabalhadores expostos ao ruído não somente aumenta o risco de ocorrência como e pode acelerar a lesão auditiva associada à PAIR (Wild e col., 2005; Pouryaghoub e col., 2007). No nosso estudo, por meio do

teste do qui-quadrado em tabela de contingência (Tabela 7), verificamos aumento no número de fumantes com PAIR na comparação realizada, tanto com o grupo de pessoas com perdas de causas não definidas (PANO), quanto com o grupo de pessoas com audição normal, dado que foi confirmado na análise de regressão logística simples (Tabelas 9 e 12). Já nas análises por meio de regressão logística múltipla (Tabelas 10, 11 e 13) o tabagismo deixou de ser significativo para o aglutinado PAIR+PANO em relação ao grupo NORMAL. A aparente discordância entre os resultados foi resolvida quando foram excluídas as mulheres das análises por regressão logística (Tabela 12) e se diminuiu o número de variáveis estudadas na regressão (Tabela 14), confirmando o efeito significativo do tabagismo. Nossos dados, portanto, somam-se ao conjunto de evidências que apontam o tabagismo como um fator que agrava o risco de desenvolvimento da PAIR.

O papel da interação do ruído com o álcool na manifestação da PAIR é controvertido. Existem estudos que observaram que a presença de álcool no sangue reduz a ação de mecanismos protetores da orelha interna (Robinette e Brey, 1978; Robinette e col., 1981), o que poderia deixar o indivíduo mais susceptível à lesão induzida pelo ruído. Experimentos com animais e humanos têm demonstrado que o efeito do álcool sobre a audição (bem como sobre todos os outros sentidos) é de principalmente deprimir o sistema nervoso central. Assim, o que geralmente se observou foi um atraso entre o estímulo sonoro e a sua percepção (Hari e col., 1979; Wecker e Ison 1984). Larsen e col. (1981) verificaram que em coelhos o álcool causou aumento no fluxo sanguíneo da cóclea. Uma das causas da lesão coclear induzida pelo ruído seria a alteração do fluxo sanguíneo. O ruído causaria vasoconstrição nos vasos da estria vascular diminuindo a oxigenação da cóclea (Oliveira, 1997). A falta de oxigênio tornaria o ambiente coclear mais reduzido. A normalização da circulação criaria uma situação de reperusão. O oxigênio, ao retornar para a cóclea rica em substâncias reduzidas, poderia levar a um agravamento de uma lesão por aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (Yamasoba e col., 1998 e 1999; Ohinata e col., 2000 e 2003; Van Campen e col., 2002; Kopke e col., 2002; Pourbakht e Yamasoba, 2003; Lynch e Kil, 2005; Tanaka e col., 2005). Portanto, a combinação de ruído (que causa vasoconstrição) e álcool (que aumenta o fluxo sanguíneo) em teoria poderia ser mais prejudicial à audição.

Church (1987) por meio de experimento com ratos e analisando a audição de 12 crianças afetadas por síndrome do álcool fetal concluiu que o álcool prejudica o desenvolvimento do aparelho auditivo (Gerber e col, 1995, para revisão). Outro estudo confirmou essa observação (Du e Hamre, 2001). Campo e col. (1998) verificaram que a interação do álcool com tolueno agrava a perda de audição induzida por esse solvente em ratos. Campo e Lataye (2000)

verificaram a importância das interações entre o ruído e solventes e álcool como combinações intensificadoras de lesões na cóclea. Entretanto, não estudaram a ação da combinação entre álcool e ruído. Liu e col. (2004), em um estudo em que cobaias eram expostas concomitantemente ao ruído e ao álcool, verificaram alterações na gravidade da perda de audição nos animais. Porém, o aumento dos limiares auditivos não foi significativo e os autores concluíram que em seu experimento a combinação de ruído e álcool não intensificou a lesão coclear em comparação com a causada somente por ruído.

Pearson e col. (1999) verificaram que o álcool afetou principalmente a audição em baixas frequências. Porém, o efeito pareceu envolver principalmente o processamento no sistema nervoso central e não as estruturas periféricas. No estudo realizado por Upile e col. (2007) foram comparadas audiometrias de 30 indivíduos saudáveis e ouvintes antes e depois do consumo de álcool (até que a concentração no sangue de todos os indivíduos fosse 30u/l). Os autores verificaram que o álcool prejudicou o desempenho da audição desses indivíduos, também, nas baixas frequências. Outra observação interessante foi o fenômeno de aumento de ocorrência de problemas auditivos que os autores chamaram de “surdez de festa” (*cocktail party deafness*), que segundo os autores, decorre principalmente devido à grande tolerância da nossa sociedade ao ruído e ao alcoolismo social. No nosso estudo, não detectamos associação entre o alcoolismo e a manifestação da PAIR.

Outro fator que é comumente citado como relacionado ao risco de desenvolvimento da PAIR é a idade. A norma internacional ISO 1999 recomenda que dos limiares obtidos de indivíduos com PAIR sejam descontados os limiares esperados decorrentes da idade, ou seja, ela assume que envelhecimento e ruído se somam resultando em perda mais grave. Gates e col. (2000) observaram em uma série de idosos com pelo menos 70 anos (do *The Framingham Heart Study* de Massachusetts) que haviam desenvolvido PAIR, que eles apresentavam um padrão diferente na evolução da presbiacusia. Os autores observaram que esses idosos não mostravam aumento nos limiares auditivos nas frequências já afetadas pela PAIR, porém as frequências adjacentes pioravam em uma taxa mais acelerada. Os autores sugeriram para explicar o observado que, aparentemente, o dano causado pelo ruído se prolongava por muito tempo depois de cessada a exposição. Rosenhall (2003) observou resultado semelhante, também com uma amostra geriátrica, da cidade de Gothenburg na Suécia. A questão que se coloca, portanto, seria se a presbiacusia aumenta o risco de PAIR ou o ruído acelera o envelhecimento da orelha. Nosso estudo aparentemente aponta que o aumento da idade, pelo menos na faixa etária dos 30 aos 50 anos, aumenta o risco do indivíduo desenvolver PAIR (Tabela 10 e Tabela 11 e Tabela 12). Na literatura existem estudos que corroboram nossa observação de relação entre o aumento da idade

e o aumento no risco de desenvolvimento da PAIR (Marques, 1998; Rossi, 2002; Guerra e col., 2005; Ribeiro e Camara, 2006). Quanto ao tempo de exposição, nosso estudo aponta que os anos que o funcionário é exposto ao ruído aumentam a probabilidade de a PAIR se instalar, fato que freqüentemente também é observado em outros estudos (Marques, 1998; Rossi, 2002; Guerra e col., 2005; Ribeiro e Camara, 2006).

V.2 – Susceptibilidade a PAIR e marcadores genéticos.

Em relação à susceptibilidade genética à PAIR, alguns estudos com camundongos têm apontado a participação de genes relacionados com a presbiacusia na susceptibilidade genética à PAIR (Davis e col., 1999; Harding e col., 2005; Morita e col., 2007). Também já se suspeitou que mutações em genes associadas à manifestação de surdez sensorineural não-sindrômica de herança autossômica recessiva poderiam se associar à manifestação da PAIR. Entretanto, apenas a mutação 35delG (*GJB2*) foi testada e com resultados negativos. Carlsson e col. (2004) identificaram apenas dois heterozigotos com a mutação 35delG entre os 103 indivíduos com PAIR. Não observaram a mutação entre os indivíduos controle. Os autores concluíram que não havia diferença significativa nas freqüências de portadores da mutação 35delG entre os grupos, resultado semelhante ao obtido no presente estudo. Recentemente, resultado similar foi publicado por Van Eyken e col. (2007). Porém, esse estudo contou com uma amostra maior. Os autores observaram as freqüências de 2,4% da mutação 35delG em heterozigose nos trabalhadores resistentes e de 2,3% nos sensíveis. Nossos resultados também apontam que a mutação 35delG não tem participação na manifestação da PAIR (Tabela 15). Além da mutação 35delG, testamos a presença da mutação 167delT (*GJB2*) e das deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ no gene *GJB6*. Verificamos que em nossa amostra essas alterações também não influenciaram a ocorrência da PAIR. Entretanto, o tamanho da nossa amostra dificilmente permitiria detectar diferenças significativas nas freqüências dessas mutações que são raras na população.

Por fim, os resultados da análise de associação com o polimorfismo RS877098 (Tabelas 16, 21 e 22), um SNP próximo aos genes *GJB2* e *GJB6*, não detectaram efeito significativo desse polimorfismo sobre a manifestação da PAIR.

Um dos resultados mais intrigantes do nosso trabalho foi a aparente associação dos genes *GSTM1* e *GSTT1* com a manifestação da PAIR. Quando analisados isoladamente, nenhum deles mostrou efeito significativo. Verificamos que a presença de ambos os genes (ou seja do genótipo que leva à produção de ambas as enzimas) aumentou a probabilidade de manifestação da PAIR. Há mais indivíduos afetados entre aqueles que apresentam o genótipo 1/? para ambos os genes

(Tabelas 25 e 26) do que para os demais genótipos. A função das enzimas da família GST é promover a conjugação de substâncias, em geral muito reativas, com a glutathione, resultando em substâncias menos reativas, que o organismo elimina com facilidade. Portanto, as enzimas GSTM1 e GSTT1 são parte de mecanismos de desintoxicação do organismo, tanto em relação às substâncias exógenas quanto às resultantes de processos internos naturais. Portanto, seria esperado que a presença de ambas as enzimas tornasse o indivíduo mais resistente ao ruído. Entretanto, algumas vezes, a conjugação de uma substância tóxica pode resultar em um produto ainda mais prejudicial. Então, a enzima agiria como uma ativadora de uma função indesejada ao invés de desintoxicar o organismo. Como exemplo, podemos citar que o solvente diclorometano, quando conjugado com a glutathione, produz S-clorometilglutathione, uma substância instável e reativa que tem capacidade de modificar moléculas de DNA (Hayes e col., 2005). Então, dependendo do substrato, as atividades das enzimas GSTM1 e GSTT1 podem ser protetoras ou prejudiciais. A maioria dos indivíduos do grupo PAIR são motoristas de ônibus ou gráficos. Tanto os motores dos veículos quanto as tintas utilizadas no ambiente gráfico podem emitir pequenas quantidades de vapores de substâncias resultantes de reações ou presentes na composição dos combustíveis e das tintas, estas podem ser inaladas e acabar servindo de substrato para enzimas da família das GSTs. Portanto, especulamos que, no contexto da ocupação desses indivíduos, a presença dessas enzimas poderia intensificar os efeitos prejudiciais do ruído. Outros estudos já haviam tentado averiguar a contribuição dos genes que codificam essas enzimas na manifestação da PAIR. Rabinowitz e col. (2002) obtiveram resultados que apontavam que a enzima GSTM1 conferiria alguma proteção contra o ruído e quanto à enzima GSTT1, os autores não detectaram influência. A amostra do estudo, entretanto, era reduzida, contando com apenas 58 indivíduos. Já Carlsson e col. (2005), utilizando a metodologia de selecionar a partir de uma grande amostra os extremos de resistência e de sensibilidade ao ruído, não encontraram evidência da participação das enzimas GSTM1 e GSTT1 na susceptibilidade à PAIR.

Devemos levar em conta nessa análise a perda de informação sobre essas enzimas devido à técnica utilizada para a determinação dos genótipos. A PCR que utilizamos amplifica segmentos dos genes. A ausência de produto significa a deleção de ambos os alelos de cada gene. A presença do produto, entretanto, pode significar a presença de apenas um alelo do gene ou de ambos (homozigoto selvagem). Uma forma de diferenciar os heterozigotos dos homozigotos selvagens seria desenhar *primers* que hibridassem nas proximidades dos pontos de junção fazendo com que a PCR só ocorresse quando houvesse a deleção dos genes. O teste resultante da combinação dos dois exames apresentaria bandas indicando a presença dos alelos e bandas indicando a deleção, revelando os heterozigotos. Porém, devido às características das deleções

desses genes, que envolvem grandes segmentos de DNA repetitivo, os pontos de quebra não foram ainda identificados com precisão (Pemble e col., 1994; Xu e col. 1998; Sprenger e col., 2000). Isso oferece desafios ao desenvolvimento de uma técnica que permita distinguir os três genótipos. Então, os indivíduos identificados como 1/?-1/? podem representar quatro categorias: 1/1-1/1 (presença de dois alelos do gene *GSTM1* e presença de dois alelos do gene *GSTT1*), 1/0-1/1 (deleção de apenas um alelo do gene *GSTM1* e presença de dois alelos do gene *GSTT1*), 1/1-1/0 (presença de dois alelos do gene *GSTM1* e deleção de apenas um alelo do gene *GSTT1*) e 1/0-1/0 (deleção de apenas um alelo no gene *GSTM1* e deleção de apenas um alelo no gene *GSTT1*). Caso os heterozigotos fossem identificados poderíamos talvez detectar em qual genótipo a frequência da PAIR estaria realmente aumentada. De qualquer forma, homozigotos ou heterozigotos para ambos os genes apresentam, bioquimicamente, o mesmo fenótipo: presença da atividade de ambas as enzimas. O nosso resultado aponta que a presença de ambas as enzimas ativas está relacionada a um aumento no risco de ocorrência da PAIR e que ainda existe a necessidade de mais estudos sobre a relação entre a susceptibilidade à PAIR e as enzimas *GSTM1* e *GSTT1*.

Apesar de o papel do estresse oxidativo se tornar cada vez mais evidente na etiologia da lesão associada à PAIR (Yamasoba e col., 1998 e 1999; Ohinata e col., 2000 e 2003; Van Campen e col., 2002; Kopke e col., 2002; Pourbakht e Yamasoba, 2003; Lynch e Kil, 2005; Tanaka e col., 2005), não existem trabalhos verificando o efeito de variantes do DNAmT na manifestação da PAIR. No nosso trabalho, não identificamos portadores da mutação mitocondrial A1555G entre os indivíduos com PAIR. Portanto, apesar de sua importância para a surdez sensorineural não-sindrômica, essa mutação aparentemente não está relacionada à manifestação da PAIR (Tabela 15). A triagem por meio do dHPLC e o seqüenciamento dos genes mitocondriais *MT-RNR1* e *MT-TS1* permitiu afastar a presença de todas as demais mutações certamente patogênicas nesses dois genes já associadas com a manifestação de surdez sensorineural não-sindrômica (Tabela 1, p. 10).

A triagem inicial por meio da técnica de dHPLC representou uma importante economia de recursos. Caso tivéssemos optado por seqüenciar toda a casuística isso representaria um total de 1530 seqüenciamentos (*forward* e *reverse* dos três amplicons de todos os indivíduos da casuística). A partir da triagem com o dHPLC tivemos de seqüenciar o amplicon “A” de 134 indivíduos (268 reações de seqüenciamento), o amplicon “B” de 60 indivíduos (120 reações de seqüenciamento) e no caso do amplicon que contém o gene *MT-TS1*, apenas 57 pessoas (114 reações de seqüenciamento). Em outras palavras, estudamos as variantes de seqüências do DNAmT de todos os indivíduos da casuística com apenas 502 reações de seqüenciamento. Houve

alguns falsos positivos que, entretanto, não sabemos explicar a razão.

Nossos resultados obtidos com o seqüenciamento dos genes mitocondriais *MT-RNR1* e *MT-TS1* trouxeram grande quantidade de dados. Identificamos 54 variantes de posições nucleotídicas do DNAm, 32 já descritas em outros estudos e 22 novas, importantes para o estudo do conjunto de variantes de DNAm conhecidas. São 152 pessoas com seqüências de DNAm diferentes da seqüência de referência de Anderson e col. (1981). Observamos maior incidência de alterações na região do DNAm que abrange os nucleotídeos 591 a 1154 (amplicon “A” do gene *MT-RNR1*) em comparação com a região que vai do nucleotídeo 1091 até o 1678 (amplicon “B” do gene *MT-RNR1*). Então, no gene *MT-RNR1* encontramos 26 variantes no amplicon “A” e apenas 13 no amplicon “B”. Esse dado sugere que a região do gene *MT-RNR1* que se estende das proximidades do nucleotídeo 663 (posição da variante mais a 3’ identificada no amplicon “A”) até as proximidades do nucleotídeo 1060 (variante mais a 5’ no amplicon “A”) seria mais tolerante a variações do que a região do DNAm que corresponde ao nosso amplicon “B”. Especificamente, a partir dos nossos resultados apresentados na Tabela 30, podemos apontar a região compreendida entre os nucleotídeos 700 e 900 como uma região do amplicon “A” com grande freqüência de variantes. Esses resultados são curiosos se levarmos em conta que são regiões codificadoras de um RNA funcional das mitocôndrias, a subunidade 12S do RNAr.

A mutação mitocondrial A1555G está na região do amplicon “B”. Essa mutação é comprovadamente patogênica e é a causa mais freqüente de surdez sensorineural não-sindrômica de herança materna e de surdez induzida por aminoglicosídeos de herança materna. Outra mutação que certamente é patogênica é a C1494T, que também está na região do DNAm que corresponde ao amplicon “B”. A mutação C1494T deve ser realmente patogênica porque, segundo estudos de conformação secundária do RNAr, o nucleotídeo 1494C está próximo do nucleotídeo 1555A (Hamasaki e col., 1997; Zhao e col., 2005). Assim, tanto a mutação C1494T como a mutação A1555G causam um pareamento de bases no RNAr mitocondrial humano que não existe nas seqüências selvagens (U-A no caso da mutação C1494T e C-G no caso da mutação A1555G). Portanto, ambas as mutações podem ser apontadas como evidências favoráveis de que a região correspondente ao amplicon “B” tolera menos variação. As mutações A1555G e C1494T localizam-se em um segmento do DNAm que corresponde no RNA ribossomal mitocondrial a uma região importante no processo de tradução (Hamasaki e col., 1997; Noller, 2006 para revisão). Nosso trabalho, portanto, permite sugerir que a região do gene *MT-RNR1* que abrange as proximidades do nucleotídeo 700 até o 900 (amplicon “A”) estaria fora da região crítica para a função do ribossomo mitocondrial, por essa razão, alterações na seqüência do DNAm seriam melhor toleradas e mais freqüentes nessa região.

No entanto, há mutações possivelmente patogênicas descritas que se localizam na região do amplicon “A” (Tabela 1), muito variável. A mutação A827G está nessa região e tem tido sua patogenicidade discutida (Kong e col., 2003; Yao e col., 2006). Os trabalhos que identificaram essa mutação em seus estudos argumentam que a mutação A827G é patogênica, porém com baixa penetrância. Assim, apenas a presença por si só dessa mutação não seria suficiente para levar à manifestação da surdez, havendo necessidade de fatores genéticos ou ambientais. As evidências que apóiam as suposições dos autores são: a mutação A827G ocorreu em indivíduos com perdas auditivas, não costuma ser encontrada entre indivíduos com audição normal e a comparação entre seqüências de DNAmT de outras espécies tem demonstrado que a adenina na posição 827 seria evolutivamente conservada. De fato, Li e col. (2004) identificaram um portador entre 164 crianças com problemas auditivos e nenhum entre os 226 indivíduos ouvintes de diferentes etnias da sua amostra controle e, também verificaram que o nucleotídeo adenina nesta posição em relação à mesma posição no DNAmT de boi, rato e *Xenopus laevis* seria conservada. Li e col. (2005) identificaram cinco portadores em uma amostra de 128 crianças apresentando surdez não-sindrômica com relatos de uso de antibióticos aminoglicosídeos. Entretanto, nesse estudo houve a identificação de dois portadores entre os 144 indivíduos ouvintes da amostra controle. Por fim, Xing e col. (2006) descreveram duas grandes famílias chinesas não aparentadas, portadoras da mutação A827G onde a surdez apresentava penetrância incompleta (em uma das famílias apenas três indivíduos eram afetados). Nesse estudo, nenhum dos 40 indivíduos da amostra controle apresentou a mutação. Yao e col. (2006), questionaram o estudo de Li e col. (2005), alertando para o fato de que muitos estudos sobre o DNAmT desconsideram a relação entre os haplogrupos mitocondriais e as mutações que identificam. Segundo Yao e col. (2006), o grupo de Li negligenciou o fato de que a mutação A827G, junto com C15535T, define o haplogrupo B4bd. Segundo Bandelt e col. (2006), se uma mutação define um haplogrupo ou subhaplogrupo, é muito improvável que esta mutação seja patogênica. Quanto ao argumento de conservação do nucleotídeo adenina nas posições homologas nas seqüências de DNAmTs de mamíferos, Yao e col. (2006) apresentou o exemplo da mutação T2885C, que é um polimorfismo bem conhecido de africanos e está em uma posição altamente conservada entre diferentes espécies.

Nosso trabalho pôde acrescentar informações quanto à patogenicidade da mutação A827G. Nos indivíduos da nossa casuística em que foi possível determinarmos os haplogrupos, verificamos que, dentre os 16 portadores da mutação A827G, a nove indivíduos tinham DNA mitocondrial que pertencia ao haplogrupo B. No grupo PAIR, um indivíduo pertencia ao haplogrupo B e dois, ao H. No grupo PANO apenas um indivíduo não pertencia ao haplogrupo B e

entre os sete indivíduos do grupo NORMAL, apenas dois não pertenciam ao haplogrupo B. Apesar da predominância do haplogrupo B, a existência de indivíduos que certamente pertencem a outros haplogrupos não confirma a mutação A827G como sendo exclusiva do haplogrupo B4bd.

Entretanto, pelo discutido quanto à frequência de variantes nos amplicons “A” e “B”, observamos que essa mutação se encontra numa região que não parece crítica para as funções do ribossomo mitocondrial. Além disso, identificamos sete portadores (7%) dessa mutação em indivíduos do grupo NORMAL. Apesar de termos identificado essa mutação entre os indivíduos com problemas auditivos (4% dos indivíduos do grupo PAIR e 11% dos indivíduos do grupo PANO), representando 5% do total de indivíduos com perda de audição, as frequências observadas nos três grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. As pessoas do grupo NORMAL portadoras da mutação A827G passaram mais de 10 anos expostas ao ruído (precisamente 10, 12, 15, 16, 18 e 26 anos) e apresentaram audiometrias com curvas dentro dos parâmetros de uma audição normal. Portanto, nosso trabalho indica que a mutação A827G associada ao ruído, aparentemente, não causa problemas de audição. Também julgamos improvável que ela esteja realmente relacionada à deficiência auditiva, dada sua frequência elevada no grupo NORMAL.

Nosso trabalho também ofereceu informações úteis na discussão sobre a patogenicidade de outras duas mutações descritas na literatura como associadas à manifestação de surdez não síndrômica (T1243C e G7444A). Identificamos apenas um portador de cada uma delas. O portador da mutação T1243C, que pertence ao grupo NORMAL, relatou seis anos de exposição ao ruído sem a utilização de protetores auriculares, porém sua audiometria apresentou curvas normais. Assim, esse fato é um indício de que em nossa amostra a mutação T1243C não está relacionada à ocorrência de problemas de audição. De fato, Bandelt e col. (2006) foram contundentes em sua crítica aos médicos geneticistas que todo momento redescobrem “novas mutações patogênicas” que na verdade são variantes bem conhecidas dos pesquisadores da filogeografia do DNAm. Os autores apontam justamente a variante T1243C como exemplo desse equívoco. A variante é relativamente freqüente no oeste da Eurásia, em indivíduos do haplogrupo mitocondrial W, portanto, dificilmente seria uma variante patogênica.

A mutação G7444A, entretanto, foi detectada em um único indivíduo do grupo PANO, com uma perda de audição bilateral, classificada como moderada que se manifestou aos 51 anos de idade. Esse indivíduo alegou trabalhar há mais de 45 anos exposto ao ruído. Entretanto, segundo a avaliação do médico do trabalho, a audiometria desse indivíduo não apresenta uma curva sugestiva de PAIR. Aparentemente, nosso achado favoreceria a hipótese de patogenicidade dessa mutação no entanto o caso era isolado na genealogia. Além disso, estudos filogeográficos

já relataram a ocorrência dessa variante em indivíduos dos haplogrupos Hb e V (Tabela 29) com dez seqüências contendo essa variante registradas no banco de dados MtDB. O portador da mutação G7444A identificado no nosso estudo pertence ao haplogrupo C. Outro dado importante foi a identificação de dois indivíduos portadores da mutação G7444A no grupo controle de indivíduos ouvintes no trabalho de nosso laboratório, Abreu-Silva e col. (2006). Infelizmente, dificuldades técnicas não permitiram o término da genotipagem das linhagens mitocondriais de toda a casuística até o momento, o que poderia auxiliar com mais informações sobre essa questão, mas nossos dados apontam contra a hipótese de patogenicidade.

Aparentemente, os diversos estudos que buscam identificar mutações patogênicas, no caso dos estudos relacionados ao DNAm, têm negligenciado o correto pareamento entre os indivíduos da amostra controle e os indivíduos portadores das mutações candidatas. Todos os estudos buscam verificar a ocorrência das mutações em amostras controle obtidas aleatoriamente na população. No caso do DNAm, o haplogrupo ou, pelo menos, a origem geográfica dos indivíduos deve ser levada em consideração. As bases de dados que acumulam informações sobre as seqüências de DNAm já descritas são úteis pois, muitas vezes os testes em indivíduos da população poderiam ser substituídos por simples buscas nesses bancos de dados. As mutações A827G, T1243C e G7444A já estavam listadas no MtDB, MITOMAP e GenBank (Tabelas 28 e 29) e, no mínimo, não poderiam ser descritas como “novas”. Com uma rápida consulta pudemos verificar que no MtDB existem registradas 54 seqüências de DNAm que contém a mutação A827G, 57 seqüências contém a mutação T1243C e dez contém a mutação G7444A e o trabalho mais antigo listado pelo MtDB como contendo as três seqüências data de 2000 (Ingman e col.). Além de apresentar as seqüências propriamente ditas, esses bancos de dados indicam as referências bibliográficas dos trabalhos que as identificaram. Então, a partir da localização de cada variante do DNAm foi possível obter o estudo correspondente (Tabela 47). O levantamento da literatura que descreveu as mesmas mutações que foram detectadas nesse trabalho mostrou que as descrições foram feitas em trabalhos de genética de populações, que buscavam estabelecer as relações filogeográficas entre as diversas populações humanas. Geralmente as amostras desses estudos são representativas de grupos étnicos específicos, ou são amostras aleatórias oriundas de determinada região geográfica, e não eram provenientes de indivíduos afetados por doenças, distúrbios ou qualquer anormalidade genética. Em resumo, nossos dados e os da literatura não favorecem a hipótese de que as mutações A827G, T1243C e G7444A sejam realmente patogênicas.

A análise estatística das freqüências de todas as variantes identificadas nesse estudo não detectou diferença significativas entre os três grupos (Tabela 32). Aparentemente, não existem nas regiões do DNAm estudadas variantes que isoladamente influenciam na manifestação da

Tabela 50: Relação dos estudos populacionais sobre variabilidade genética do DNAmT que identificaram em suas amostras as mesmas variantes encontradas nesse estudo.

Referência Bibliográfica	Posição nucleotídica das variantes no DNAmT
Achilli e col., 2004	709; 750; 1438
Achilli e col., 2005	709; 750
Behar e col., 2006	709; 7559
Coble e col., 2004	709; 750; 930; 1018; 7559
Fraumene e col., 2006	663; 709; 930; 7521
Herrnstadt e col., 2002	629; 663; 709; 710; 750; 769; 825; 827; 870; 921; 930; 1018; 1048; 1243; 1438; 1442; 7424; 7444; 7521; 7559
Ingman e col., 2000	663; 680; 709; 710; 750; 769; 825; 827; 850; 921; 1018; 1048; 1243; 1438; 1442; 1503; 7424; 7444; 7521
Ingman e Gyllensten, 2003	629; 709; 710; 1048; 1438; 7498
Kivisild e col., 2006	629; 663; 680; 710; 750; 769; 825; 827; 870; 921; 930; 1018; 1040; 1048; 1243; 1438; 1442; 1503; 7424; 7444; 7473; 7498; 7521
Kong e col., 2003	663; 709; 710; 752; 827; 921; 930; 1048; 1438; 1442
Maca-Meyer e col., 2001	663; 680; 709; 769; 825; 827; 1018; 1048; 1442; 7424; 7498; 7521
Maca-Meyer e col., 2003	709; 793
Macaulay e col., 2005	663; 709; 769; 825; 1018; 1048; 7521
Merriwether e col., 2005	1048; 1503
Mishmar e col., 2003	663; 680; 709; 710; 769; 825; 827; 921; 930; 1018; 1048; 1243; 1438; 1442; 7424; 7521
Moilanen e col., 2003	709; 750; 930; 1243; 1438; 7444
Olivieri e col., 2006	709; 793; 930; 1438; 1442
Palanichamy e col., 2004	709; 930; 1243; 1442; 7424
Pierson e col., 2006	709; 1243; 1438
Rajkumar e col., 2005	709;
Roostalu e col., 2007	709; 1438
Starikovskaya e col., 2005	663; 709; 710; 752; 827; 1438
Tanaka e col., 2004	629; 663; 752; 770; 827; 1048; 1310; 1438; 1442; 7424; 7521
Thangaraj e col., 2005	709; 1438

PAIR. Também não identificamos diferenças significativas entre os grupos quanto ao número total de mutações presentes em cada indivíduo (Tabela 35 e 36). Assim, o número de mutações presentes nessas regiões também parece não causar efeito na manifestação da PAIR.

Verificamos que as análises de desequilíbrio de ligação apresentaram resultados estatisticamente significativos (Tabelas 42, 43, 44 e 45). Assim, no grupo PAIR as combinações 2/3 (709/750), 2/9 (709/1438), 3/4 (750/769), 4/5 (769/825), 5/7 (825/1018) e 8/9 (1154/1438) e no grupo PANO as combinações 3/4 (750/769), 3/7 (750/1018), 4/5 (769/825), 4/7 (769/1018), 4/10 (769/7521), 5/7 (825/1018), 5/10 (825/7521), 7/10 (1018/7521) encontravam-se em desequilíbrio de ligação. No grupo NORMAL as combinações que se encontravam em desequilíbrio de ligação eram 3/4 (750/769), 3/5 (750/825), 4/5 (769/825) e 4/10 (769/7521). Entretanto, o teste de heterogeneidade não identificou diferença significativa entre as frequências de qualquer das combinações no grupo NORMAL em relação ao aglutinado PAIR+PANO. Portanto, não foi possível determinar se alguma dessas combinações contribuiu na susceptibilidade ou predisposição do indivíduo à PAIR. Assim, aparentemente a influência de variações na sequência dos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1* não são determinantes para a manifestação da PAIR. A ocorrência de desequilíbrio de ligação entre alguns pares de variantes sugere que essas sequências foram herdadas de uma sequência de DNAm comum. Um estudo aprofundado dos haplogrupos associados a essas combinações pode vir a enriquecer as informações sobre variações nas regiões codificadoras do DNAm e suas relações com a filogeografia.

V.3. - Estudos de Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) no Soro dos Indivíduos.

A análise por meio de regressão linear não evidenciou correlação entre a manifestação da PAIR e a presença de peróxidos no soro dos indivíduos afetados. Entretanto, o teste de Mann-Whitney identificou um aumento significativo nas concentrações de peróxidos no soro dos indivíduos do grupo PAIR. Esse resultado pode ser indicativo de uma tendência de aumento na produção de EROs em indivíduos que manifestam a PAIR. Se essa tendência puder ser confirmada em outros experimentos, isso seria mais uma evidência de que a PAIR pode estar relacionada com o desequilíbrio na produção de EROs ou nos sistemas bioquímicos de proteção do organismo contra essas substâncias nocivas, também em seres humanos. Nossos resultados indicam que a pesquisa da participação das EROs deve ser aprofundada.

Em resumo, nosso estudo evidenciou a influência da história familiar de perda auditiva na probabilidade de manifestação da PAIR e o possível papel das enzimas GSTT1 e GSTM1 na susceptibilidade a essa condição. Nossos achados reforçam a ideia de que a susceptibilidade à PAIR possa ser determinada por fatores genéticos.

VI - RESUMO E ABSTRACT

VI.1. - RESUMO

A exposição contínua ao ruído de alta intensidade é o fator ambiental mais importante como causa de problemas auditivos em adultos. Esses tipos de perdas crônicas e irreversíveis causadas pelo ruído são chamados de Perdas Auditivas Induzidas por Ruído (PAIR). O objetivo desse estudo foi estudar a influência de fatores genéticos na susceptibilidade à PAIR. Para atingir esse objetivo comparamos uma amostra de indivíduos com PAIR e de indivíduos sem PAIR que trabalharam expostos ao ruído em relação à etnia, à história familiar de perda auditiva, idade, tempo de exposição ao ruído, tabagismo e alcoolismo social. Para verificar a possível contribuição de fatores genéticos, testamos a presença de mutações conhecidas como causas frequentes de surdez. As mutações testadas foram 35delG e 167delT no gene *GJB2*, as deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ no gene *GJB6* e A1555G no gene *MT-RNR1*. Determinamos as frequências alélicas e genotípicas de um polimorfismo no gene *GJB2* (SNP RS877098) e dos polimorfismos do tipo presença/deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1*. Também verificamos a ocorrência e a frequência de variações nas seqüências dos genes mitocondriais *MT-RNR1* e *MT-TS1*, dois genes mitocondriais importantes como causa de surdez de herança materna. Nossa amostra constituiu-se de 107 indivíduos que apresentavam audiometrias sugestivas de PAIR (grupo PAIR), 44 indivíduos afetados por perdas de audição com curvas audiométricas que não eram sugestivas de PAIR (grupo PANO) e 104 indivíduos com audição normal (grupo NORMAL). Nossos resultados apontaram aumento significativo no número de parentes afetados por problemas de audição no grupo PAIR. O tabagismo, a idade e o tempo de exposição ao ruído também influenciaram significativamente na manifestação da PAIR. Aparentemente, não houve contribuição das mutações associadas à manifestação de surdez, 35delG e 167delT no gene *GJB2*, $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ no gene *GJB6* e A1555G no gene *MT-RNR1*. Não houve diferença significativa nas frequências dos alelos do SNP RS87098 (gene *GJB2*) entre os afetados e os não afetados. Observamos um aumento significativo do genótipo que corresponde a presença dos dois genes das enzimas *GSTM1* e *GSTT1* entre os indivíduos do grupo PAIR, sugerindo possível papel dessas enzimas relacionadas a proteção contra espécies reativas de oxigênio na etiologia da PAIR. Não observamos associação significativa entre nenhuma das 54 variantes de seqüências do DNA mitocondrial averiguadas nos genes *MT-RNR1* e *MT-TS1* (32 já previamente descritas e 22 detectadas nesse estudo) e a ocorrência de PAIR. Não observamos associação significativa da PAIR com o número total de variantes de seqüência do DNA mitocondrial observado em cada indivíduo. Não foi detectada associação significativa com os haplótipos constituídos por pares de variantes de

seqüência do DNA mitocondrial. A comparação entre a concentração de peróxidos e de grupos sulfidril no soro de 15 indivíduos com PAIR com amostras de 15 indivíduos sem PAIR não revelou diferenças significativas. Em resumo, nosso estudo evidenciou a influência da história familiar de perda auditiva na probabilidade de manifestação da PAIR e o possível papel das enzimas GSTT1 e GSTM1 na susceptibilidade a essa condição. Nossos achados reforçam a idéia de que a susceptibilidade à PAIR possa ser determinada por fatores genéticos.

VI.2. - ABSTRACT

Chronic exposure to loud noise is the most important environmental cause of hearing impairment among adults. Chronic and irreversible hearing loss due to exposure to noise is named Noise Induced Hearing Loss (NIHL). The aim of this study was to investigate the influence of genetic factors in the susceptibility to NIHL. We compared individuals with and without NIHL regarding ethnic origin, familial history of hearing loss, age, noise exposure time, alcohol consumption and smoking habits. In order to investigate genetic factors associated to NIHL we screened frequent deafness causative mutations. The investigated mutations were 35delG and 167delT in the *GJB2* gene, Δ (*GJB6*- D13S1830) and Δ (*GJB6*- D13S1854) in the *GJB6* gene and A1555G in the *MT-RNR1* gene. Allelic and genotypic frequencies were determined for the SNP RS877098 in the *GJB2* gene, and for the polymorphic deletions of *GSTM1* and *GSTT1* genes. We also investigated the frequency of variants in the mitochondrial genes *MT-RNR1* and *MT-TS1*, which are known to harbor many hearing loss causative mutations. Our sample comprised 107 individuals with suggestive NIHL audiograms, 44 individuals with hearing impairment and non-suggestive NIHL audiograms, and 104 normal hearing individuals. A significant increase in the number of relatives affected by hearing impairment was detected in the NIHL group, when compared to the normal hearing group. Smoking habits, age and noise exposure time significantly affected the probability of NIHL. We did not detect any effect of the deafness-causing mutations 35delG and 167delT in the *GJB2* gene, Δ (*GJB6*- D13S1830) and Δ (*GJB6*- D13S1854) in the *GJB6* gene, and A1555G in the *MT-RNR1* gene. There was no significant difference in allelic and genotypic frequencies of SNP RS87098 (gene *GJB2*), but the presence of the two genes encoding *GSTM1* and *GSTT1* enzymes was increased in the NIHL group. We did not detect any significant association of any of the 54 sequence variants in the mitochondrial genes *MT-RNR1* and *MT-TS1* (32 previously described and 22 novel) with the occurrence of NIHL. No significant associations were observed between NIHL and either the total number of sequence variants detected in each individual or haplotypes (combinations of two variants). The comparison of peroxides and sulfhydryl groups concentrations in serum from 15 individuals with NIHL and 15 individuals without NIHL did not show significant differences. In conclusion, our study demonstrated a significant effect of family history of hearing loss on the probability of presenting NIHL and pointed to a possible role of *GSTT1* and *GSTM1* enzymes on the susceptibility to this condition. These findings reinforce the idea that susceptibility to NIHL has a genetic basis.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. **Cancer Lett.** **107(2)**:229-33. 1996
- Abe S, Kelley PM, Kimberling WJ, Usami SI. Connexin 26 gene (*GJB2*) mutation modulates the severity of hearing loss Connexin 26 gene (*GJB2*) mutation modulates the severity of hearing loss associated with the 1555A-->G mitochondrial mutation. **Am J Med Genet.** **103(4)**: 334-8. 2001.
- Abreu-Silva RS, Lezirovitz K, Braga MC, Spinelli M, Pirana S, Della-Rosa VA, Otto PA, Mingroni-Netto RC. Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNA^{Ser}(UCN) mitochondrial mutations in hearing-impaired Brazilian patients. **Braz J Med Biol Res.** **39**:219-26. 2006.
- Achilli A, Rengo C, Battaglia V, Pala M, Olivieri A, Fornarino S, Magri C, Scozzari R, Babudri N, Santachiara-Benerecetti AS, Bandelt HJ, Semino O, Torroni A. Saami and Berbers--an unexpected mitochondrial DNA link. **Am J Hum Genet.** **76(5)**:883-6. 2005
- Achilli A, Rengo C, Magri C, Battaglia V, Olivieri A, Scozzari R, Cruciani F, Zeviani M, Briem E, Carelli V, Moral P, Dugoujon JM, Roostalu U, Loogväli EL, Kivisild T, Bandelt HJ, Richards M, Villems R, Santachiara-Benerecetti AS, Semino O, Torroni A. The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. **Am J Hum Genet.** **75(5)**:910-8. 2004.
- Almeida SIC, Albernaz PLM, Zaia PA, Xavier OG, Karazawa EHI. História natural da perda auditiva ocupacional provocada por ruído. **Rev Ass Med Brasil.** **46**: 143-58. 2000.
- Altschuler RA, Fairfield D, Cho Y, Leonova E, Benjamin IJ, Miller JM, Lomax MI. Stress pathways in the rat cochlea and potential for protection from acquired deafness. **Audiol Neurotol.** **7**:152-6. 2002.
- Ancient mitochondrial M haplogroups identified in the Southwest Pacific. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **102(37)**:13034-9. 2005. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(46)16904. 2005
- Anderson S, Bankier AT, Barrel BG, de Buijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. **Nature.** **290**: 457-465. 1981.
- Andrén L, Lindstedt G, Björkman M, Borg KO, Hansson L. Effect of noise on blood pressure and 'stress' hormones. **Clin Sci (Lond).** **62(2)**:137-41. 1982.
- Arguelles S, Garcia S, Maldonado M, Machado A, Ayala A. Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? **Biochim Biophys Acta.** **1674(3)**:251-9. 2004
- Ates NA, Ünal M, Tamer L, Derici E, Karakas S, Ercan B, Pata YS, Akbas Y, Vayisoglu Y, Çamdeviren H. Glutathione S-Transferase Gene Polymorphisms in Presbycusis. **Otol & Neur.** **26**: 392–397. 2005.
- Au WW, Oh HY, Grady J, Salama SA, Heo MY. Usefulness of Genetic Susceptibility and Biomarkers for Evaluation of Environmental Health Risk. **Environ. Mol. Mutagen.** **37**:215–225. 2001

- Babisch W, Beule B, Ising H, Kersten N, Schust M, Wende H. Noise burden and the risk of myocardial infarction: false interpretation of results due to inadequate treatment of data. **Eur Heart J.** **27**: 623-4. 2006.
- Bacino C, Prezant TR, Bu X, Fournier P, Fischel-Ghodsian N. Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness. **Pharmacogenetics.** **5**(3):165-72. 1995.
- Ballana E, Morales E, Rabionet R, Montserrat B, Ventayol M, Bravo O, Gasparini P, Estivill X. Mitochondrial 12S rRNA gene mutations affect RNA secondary structure and lead to variable penetrance in hearing impairment. **Biochem Biophys Res Commun.** **341**(4):950-7. 2006
- Ballana E, Morales E, Rabionet R, Montserrat B, Ventayol M, Bravo O, Gasparini P, Estivill X. Mitochondrial 12S rRNA gene mutations affect RNA secondary structure and lead to variable penetrance in hearing impairment. **Biochem Biophys Res Commun.** **341**: 950-7. 2006.
- Bandelt HJ, Salas A, Bravi CM. What is a 'novel' mtDNA mutation--and does 'novelty' really matter? **J Hum Genet.** **51**: 1073-82. 2006.
- Barone JA, Peters JM, Garabrant DH, Bernstein L, Krebsbach R. Smoking as a risk factor in noise-induced hearing loss. **J Occup Med.** **29**: 741-5. 1987.
- Behar DM, Metspalu E, Kivisild T, Achilli A, Hadid Y, Tzur S, Pereira L, Amorim A, Quintana-Murci L, Majamaa K, Herrnstadt C, Howell N, Balanovsky O, Kutuev I, Pshenichnov A, Gurwitz D, Bonne-Tamir B, Torroni A, Villems R, Skorecki K. The matrilineal ancestry of Ashkenazi Jewry: portrait of a recent founder event. *Am J Hum Genet.* **78**(3):487-97. 2006.
- Béria JU, Raymann BC, Gigante LP, Figueiredo AC, Jotz G, Roithman R, Selaimen da Costa S, Garcez V, Scherer C, Smith A. Hearing impairment and socioeconomic factors: a population-based survey of an urban locality in southern Brazil. **Rev Panam Salud Publica.** **21**(6): 381-7. 2007.
- Berry, A.; Scott, H. S.; Kudoh, J.; Talior, I; Korostishevsky, M.; Wattenhofer, M.; Guipponi, M.; Barras, C.; Rossier, C.; Shibuya, K.; Wang, J.; Kawasaki, K.; Asakawa, S.; Minoshima, S.; Shimizu, N.; Antonarakis, S.; Bonn-Tamir, B.; Refined Localization of Autosomal Recessive Nonsyndromic Deafness DFNB10 Locus Using 34 Novel Microsatellite Markers, Genomic Structure, and Exclusion of Six Known Genes in the Region; **Genomics.** **68**: 22-29, 2000.
- Bess FH, Peek BF, Chapman JJ. Further observations on noise levels in infant incubators. **Pediatrics.** **63**(1):100-6. 1979.
- Bolt HM, Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. **Curr Drug Metab.** **7**:613-28. 2006.
- Braga MCC, Otto PA, Spinelli M. Recurrence Risks in Cases of Nonsyndromic Deafness. **Braz J Dysm Speech-Hear Dis.** **2**: 33-40. 1999.
- Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. **Oncogene.** **25**: 4647-62. 2006.
- Brockmller J, Kerb R, Drakoulis N, Nitz M, Roots I. Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class mu isoenzymes mu and psi in lung cancer patients and controls. **Cancer Res.** **53**(5):1004-11. 1993.
- Brownell WE. How the Ear Works - Nature's Solutions For Listening. **Volta Review** **99**: 9-28. 1999.

- Bykhovskaya Y, Estivill X, Taylor K, Hang T, Hamon M, Casano RA, Yang H, RotterJI, Shohat M, Fischel-Ghodsian N. Candidate locus for a nuclear modifier gene for maternally inherited deafness. **Am J Hum Genet.** **66(6):** 1905-10. 2000.
- Bykhovskaya Y, Mengesha E, Wang D, Yang H, Estivill X, Shohat M, Fischel-Ghodsian N. Human mitochondrial transcription factor B1 as a modifier gene for hearing loss associated with the mitochondrial A1555G mutation. **Mol Genet Metab.** **82(1):**27-32. 2004a.
- Bykhovskaya Y, Mengesha E, Wang D, Yang H, Estivill X, Shohat M, Fischel-Ghodsian N. Phenotype of non-syndromic deafness associated with the mitochondrial A1555G mutation is modulated by mitochondrial RNA modifying enzymes *MTOT1* and *GTPBP3*. **Mol Genet Metab.** **83(3):**199-206. 2004b.
- Bykhovskaya Y, Shohat M, Ehrenman K, Johnson D, Hamon M, Cantor RM, Aouizerat B, Bu X, Rotter JI, Jaber L, Fischel-Ghodsian N. Evidence for complex nuclear inheritance in a pedigree with nonsyndromic deafness due to a homoplasmic mitochondrial mutation. **Am J Med Genet.** **77(5):** 421-6. 1998.
- Bykhovskaya Y, Yang H, Taylor K, Hang T, Tun RYM, Estivill X, Casano RAMS, Majamaa K, Shohat M, Fischel-Ghodsian N. Modifier locus for mitochondrial DNA disease: Linkage and linkage disequilibrium mapping of a nuclear modifier gene for maternally inherited deafness. **Genet Med.** **3(3):** 177-180. 2001.
- Cadoni G, Boccia S, Scipione S, Arzani D, Cianfagna F, Ricciardi G, Paludetti G, Agostino S. Glutathione s-transferase gene polymorphisms in italian patients with suddensensorineural hearing loss. *Otol Neurotol.* **27:** 1166-9. 2006.
- Campo P, Lataye R. Noise and solvent, alcohol and solvent: two dangerous interactions on auditory function. **Noise Health.** **3:** 49-57. 2000.
- Carlsson PI, Danermark B, Borg E. Marital status and birthrate of deaf people in two Swedish counties: the impact of social environment in terms of deaf community. **Am Ann Deaf.** **Winter;149(5):**415-20. 2004-2005
- Carlsson PI, Laer LV, Borg E, Bondeson ML, Thys M, Fransen E, Van Camp G. The influence of genetic variation in oxidative stress genes on human noise susceptibility. **Hearing Research.** "In Press". 2005.
- Casano RAMS, Bykovskaya Y, Johnson DF, Hamon M, Torricelli F, Bigozzi M, Fischel-Ghodsian N. Hearing Loss Due to the Mitochondrial A1555G Mutation in Italian Families. **Am. J. Med. Genet.** **79:** 388-391. 1998.
- Celani AC. Brinquedos e seus níveis de ruído. **Rev. Dist. Com.,** [S. l.], v. 4, n. 1, p. 49-58, 1991.
- Cho HJ, Lee SY, Ki CS, Kim JW. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in the Korean population. **J Korean Med Sci.** **20:**1089-92. 2005.
- Christodoulou J, Biggin A, Thorburn DR, Bennetts B. Mutation screening of the mitochondrial genome using denaturing high-performance liquid chromatography. (Abstract) **Am J Hum Genet.** **71(4):** 427. 2002.
- Chuden H. Is there noise-induced hearing loss in the low and middle tone frequencies? **Laryngol Rhinol Otol (Stuttg).** **62:**481-4. 1983

- Church MW. Chronic in utero alcohol exposure affects auditory function in rats and in humans. **Alcohol**. **4**: 231-9. 1987.
- Coble MD, Just RS, O'Callaghan JE, Letmanyi IH, Peterson CT, Irwin JA, Parsons TJ. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Int J Legal Med*. 118(3):137-46. 2004.
- Correa Filho HR, Costa LS, Hoehne EL, Perez MA, Nascimento LC, de Moura EC. Perda auditiva induzida por ruído e hipertensão em condutores de ônibus. **Rev Saúde Pública**. **36**:693-701. 2002.
- Corwin JT. Identifying the genes of hearing, deafness, and dysequilibrium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **95**: 12080-12082. 1998.
- Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE, Wiley TL, Nondahl DM, Tweed TS. Cigarette smoking and hearing loss: the epidemiology of hearing loss study. **JAMA**. **279**: 1715-9. 1998.
- Cummins JM. Mitochondria: potential roles in embryogenesis and nucleocytoplasmic transfer. **Hum Reprod Update**. **7**: 217-28. 2001.
- Davis A, Hind S. The newborn hearing screening programme in England. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**. **67 Suppl 1**: S193-6. 2003.
- Davis RR, Cheever ML, Krieg EF, Erway LC. Quantitative measure of genetic differences in susceptibility to noise-induced hearing loss in two strains of mice. **Hear Res**. **134**:9-15. 1999.
- Davis RR, Kozel P, Erway LC. Genetic influences in individual susceptibility to noise: a review. **Noise Health**. **5**:19-28. 2003.
- de Nobrega M, Weckx LL, Juliano Y. Study of the hearing loss in children and adolescents, comparing the periods of 1990-1994 and 1994-2000. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**. **69**: 829-38. 2005.
- del Castillo FJ, Rodriguez-Ballesteros M, Alvarez A, Hutchin T, Leonardi E, de Oliveira CA, Azaiez H, Brownstein Z, Avenarius MR, Marlin S, Pandya A, Shahin H, Siemering KR, Weil D, Wuyts W, Aguirre LA, Martin Y, Moreno-Pelayo MA, Villamar M, Avraham KB, Dahl HH, Kanaan M, Nance WE, Petit C, Smith RJ, Van Camp G, Sartorato EL, Murgia A, Moreno F, del Castillo I. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(*GJB6*-d13s1854), found in trans with mutations in the *GJB2* gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. **J Med Genet**. **42**(7):588-94. 2005.
- del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, Menendez I, Moreno F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. **N Engl J Med**. **346**(4): 243-9. 2002.
- 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, Auboïs A, Joannard A, Petit C, e col. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. **Hum Mol Genet**. **6**(12): 2173-2177; 1997.
- Du X, Hamre KM. Increased cell death in the developing vestibulocochlear ganglion complex of the mouse after prenatal ethanol exposure. **Teratology**. **64**: 301-10. 2001.
- Eisen MD e Ryugo DK. Hearing molecules: contributions from genetic deafness. **Cell. Mol. Life Sci**. **64**: 566 – 580. 2007.

- el-Schahawi M, Lopez de Munain A, Sarrazin AM, Shanske AL, Basirico M, Shanske S, DiMauro S. Two large Spanish pedigrees with nonsyndromic sensorineural deafness and the mtDNA mutation at nt 1555 in the 12s rRNA gene: evidence of heteroplasmy. **Neurology**. **48**:453-6. 1997.
- Engel-Yeger B, Zaaroura S, Zlotogora J, Shalev S, Hujeirat Y, Carrasquillo M, Saleh B, Pratt H. Otoacoustic emissions and brainstem evoked potentials in compound carriers of connexin 26 mutations. **Hear Res**. **175(1-2)**: 140-51. 2003.
- Estivill X, Govea N, Barcelo E, Badenas C, Romero E, Moral L, Scozzri R, D'Urbano L, Zeviani M, Torroni A. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. **Am J Hum Genet**. **62(1)**: 27-35. 1998.
- Fairfield DA, Lomax MI, Dootz GA, Chen S, Galecki AT, Benjamin IJ, Dolan DF, Altschuler RA. Heat shock factor 1-deficient mice exhibit decreased recovery of hearing following noise overstimulation. **J Neurosci Res**. 2005 Aug 15;81(4):589-96. 2005.
- Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Chaltraw WE, Wendt KA, Nelson RA, Arnos KS, Falk RE. Mitochondrial gene mutation is a significant predisposing factor in aminoglycoside ototoxicity. **Am J Otolaryngol**. **18**:173-8. 1997.
- Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial mutations and hearing loss: paradigm for mitochondrial genetics. **Am J Hum Genet**. **62(1)**: 15-9. 1998.
- Fischel-Ghodsian, N. Mitochondria Deafnes Mutations Review; **Hum Mut**. **13**: 261-270; 1999
- Fleig R. Perda Auditiva Induzida por Ruído em Motoristas de Caminhão de Lixo Urbano. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção da Universidade Federal de Santa Catarina. 2004.
- Forsberg L, Faire U,† Morgenstern R. Oxidative Stress, Human Genetic Variation, and Disease. **Archs Bioch. Bioph**. **389**: 84–93. 2001.
- Fortunato G, Marciano E, Zarrilli F, Mazzaccara C, Intrieri M, Calcagno G, Vitale DF, La Manna P, Saulino C, Marcelli V, Sacchetti L. Paraoxonase and superoxide dismutase gene polymorphisms and noise-induced hearing loss. **Clin Chem**. **50**: 2012-8. 2004.
- Fraumene C, Belle EM, Castrì L, Sanna S, Mancosu G, Cosso M, Marras F, Barbuji G, Pirastu M, Angius A. High resolution analysis and phylogenetic network construction using complete mtDNA sequences in sardinian genetic isolates. Mol Biol Evol. 23(11):2101-11. 2006.**
- Gallo-Teran J, Morales-Angulo C, Rodriguez-Ballesteros M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo I, Moreno F. [Prevalence of the 35delG mutation in the GJB2 gene, del (GJB6-D13S1830) in the GJB6 gene, Q829X in the OTOF gene and A1555G in the mitochondrial 12S rRNA gene in subjects with non-syndromic sensorineural hearing impairment of congenital/childhood onset] **Acta Otorrinolaringol Esp**. **56**:463-8. 2005.
- Gardner JC, Goliath R, Viljoen D, Sellars S, Cortopassi G, Hutchin T, Greenberg J, Beighton P. Familial streptomycin ototoxicity in a South African family: a mitochondrial disorder. **J Med Genet**. **34**: 904-906. 1997.
- Gates GA, Schmi P, Kujawa SG, Nam B, D'Agostino E. Longitudinal threshold changes in older men with audiometric notches. **Hearing Research** **141**: 220-228. 2000.

- GenBank/NCBI** - Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. **Nucleic Acids Res.** **36(Database issue):** D25-30. 2008 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Gerber SE, Epstein L, Mencher LS. Recent changes in the etiology of hearing disorders: perinatal drug exposure. **J Am Acad Audiol.** **6:** 371-7. 1995.
- Giordano C, Pallotti F, Walker WF, Checcarelli N, Musumeci O, Santorelli F, d'Amati G, Schon EA, DiMauro S, Hirano M, Davidson MM. Pathogenesis of the deafness-associated A1555G mitochondrial DNA mutation. **Biochem Biophys Res Commun.** **293(1):** 521-9. 2002.
- Gong TWL, Dootz1 GA, Dolan DF, Lomax MI. Differential gene expression in response to mild and loud noise in rat cochleae. **6th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference.** Hinxton - UK. Abstract P129. 2007a.
- Gong TWL, Dootz1 GA, Fullarton L, Benjamin IJ, Kohrman1 DC, Dolan DF, Richard A. Altschuler RA, Lomax MI. Role of HSF1 and heat shock proteins following heat shock and noise stress. **6th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference.** Hinxton - UK. Abstract P126. 2007b.
- Gravina LP, Foncuberta ME, Estrada RC, Barreiro C, Chertkoff L. Carrier frequency of the 35delG and A1555G deafness mutations in the Argentinean population. Impact on the newborn hearing screening. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol.** **71:**639-43. 2007.
- Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. A biochemical basis for the inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. **Hum Mol Genet.** **9(12):** 1787-93. 2000.
- Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. Biochemical evidence for nuclear gene involvement in phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation. **Hum Mol Genet.** **5(7):** 963-71. 1996.
- Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. Nuclear background determines biochemical phenotype in the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation. **Hum Mol Genet.** **10:**573-80. 2001.
- Guan MX, Yan Q, Li X, Bykhovskaya Y, Gallo-Teran J, Hajek P, Umeda N, Zhao H, Garrido G, Mengesha E, Suzuki T, del Castillo I, Peters JL, Li R, Qian Y, Wang X, Ballana E, Shohat M, Lu J, Estivill X, Watanabe K, Fischel-Ghodsian N. Mutation in TRMU related to transfer RNA modification modulates the phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S ribosomal RNA mutations. **Am J Hum Genet.** **79:**291-302. 2006.
- Guerra MR, Lourenco PM, Bustamante-Teixeira MT, Alves MJ. Prevalência de perda auditiva induzida por ruído em empresa metalúrgica. **Rev Saude Publica.** **39:**238-44. 2005.
- Habeeb A.F.S.A. 1972. Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. **Methods Enzymol.** **25:** 457-464
- Halliwell B, & Gutteridge JMC. (1999) in Free Radicals in biology and Medicine (Hallywell, B e Gutteridge, J.M.C., eds.) third edition. Claredon Press. Oxford. pp. 284-307, 393-413. 1999.
- Hamasaki K, Rando RR. Specific Binding of Aminoglycosides to a Human rRNA Construct Based on a DNA Polymorphism Which Causes Aminoglycoside-Induced Deafness. **Biochemistry.** **36:** 12323-12328, 1997.
- Harding GW, Bohne BA, Vos JD. The effect of an age-related hearing loss gene (Ahl) on noise-induced hearing loss and cochlear damage from low-frequency noise. **Hear Res.** **204:**90-100. 2005.

- Hari R, Sams M, Järvillehto T. Auditory evoked transient and sustained potentials in the human EEG: II. Effects of small doses of ethanol. **Psychiatry Res.** **1**: 307-12. 1979.
- Harlan WR, Sharrett AR, Weill H, Turino GM, Borhani NO, Resnekov L. Impact of the environment on cardiovascular disease. Report of the American Heart Association Task Force on environment and the cardiovascular system. **Circulation.** **63(1)**:243A-246A. 1981.
- Harlan WR. Physical and psychosocial stress and the cardiovascular system. **Circulation.** **63**: 66A-271A. 1981.
- Hartikainen AL, Sorri M, Anttonen H, Tuimala R, Läärä E. Effect of occupational noise on the course and outcome of pregnancy. **Scand J Work Environ Health.** **20(6)**:444-50. 1996.
- Hawkins RD e Lovett M. The developmental genetics of auditory hair cells. **Hum Mol Genet.** **13**: R289–R296. 2004.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione Transferases. **Annu. Rev. Pharmacol Toxicol** **45**:51–88. 2005.
- Helmkamp JC, Talbott EO, Margolis H. Occupational noise exposure and hearing loss characteristics of a blue-collar population. **J Occup Med.** **26**:885-91. 1984
- Henselman LW, Henderson D, Shadoan J, Subramaniam M, Saunders S, Ohlin D. Effects of noise exposure, race, and years of service on hearing in U.S. Army soldiers. **Ear Hear.** **16(4)**:382-91. 1995
- Herrnstadt C, Elson JL, Fahy E, Preston G, Turnbull DM, Anderson C, Ghosh SS,
- Hutchin TP & Cortopassi GA. Mitochondrial defects and hearing loss. **Cell Mol Life Sci.** **57(13-14)**:1927-37, 2000.
- Hutchin TP, Parker MJ, Young ID, Davis AC, Pulleyn LJ, Deeble J, Lench NJ, Markham AF, Mueller RF. A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene in a family with non-syndromic sensorineural hearing impairment. **Journal of Medical Genetics.** **37(9)**:692-4. 2000.
- Hutchin TP, Stoneking M, Qiu W-W, Fischel-Ghodsian N, Cortopassi G. Association of a Particular Point Mutation of the Mitochondrial DNA with a Amynoglicoside-Induced Deafness. (Abstract). **Am J Hum Genet.** **53 (suppl.)**: A20. 1993.
- Ingman M, Gyllensten U. Mitochondrial genome variation and evolutionary history of Australian and New Guinean aborigines. **Genome Res.** **13**:1600-6. 2003.
- Ingman M, Kaessmann H, PaÈaÈbo S, Gyllensten U, Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. **Letters to Nature** **408(7)**. 2000.
- Ising H, Kruppa B. Health effects caused by noise: evidence in the literature from the past 25 years. **Noise Health.** **6(22)**:5-13. 2004.
- ISO 1999. (1990) Acoustics – Determination of occupational noise exposure and estimation of noise induced hearing impairment. International Standard International Organization for Standardization. Geneva, second edition,.
- Jerger J, Jerger S, Pepe P, Miller R. Race difference in susceptibility to noise-induced hearing loss. **Am J Otol.** **7**: 425-9. 1986.
- Jiang, Z., Y., James, H., V. e Simon, P. W. Ferrous Ion Oxidation in the Presence of Xylenol Orange Detection of Lipid Hydroperoxide in Low Density Lipoprotein” **Analytical**

- Biochemistry. 202:** 384-389. 1992.
- Jin L, Yang A, Zhu Y, Zhao J, Wang X, Yang L, Sun D, Tao Z, Tsushima A, Wu G, Xu L, Chen C, Yi B, Cai J, Tang X, Wang J, Li D, Yuan Q, Liao Z, Chen J, Li Z, Lu J, Guan MX. Mitochondrial tRNASer(UCN) gene is the hot spot for mutations associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. **Biochem Biophys Res Commun.** **361:** 133-9. 2007.
- Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 8ª ed. Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro – RJ. 408-413. 1995.
- Kawada T. The effect of noise on the health of children. **J Nippon Med Sch.** **71(1):**5-10. 2004.
- Keats BJ, Berlin CI. Genomics and hearing impairment. **Genome Res.** 9:7-16. 1999.
- Kivisild T, Shen P, Wall DP, Do B, Sung R, Davis KK, Passarino G, Underhill PA, Scharfe C, Torroni A, Scozzari R, Modiano D, Coppa A, de Knijff P, Feldman MW, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ. The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. **Genetics** **172 (1):** 373-387. 2006.
- Klockhoff I, Lyttkens L. Hearing defects of noise trauma type with lack of noise exposure. **Scand Audiol.** 1982.
- Kokotas H, Petersen MB, Willems PJ. Mitochondrial deafness. **Clin Genet.** **71:** 379-91. 2007.
- Kong QP, Yao YG, Sun C, Bandelt HJ, Zhu CL, Zhang YP. Phylogeny of east Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences. **Am J Hum Genet.** **73(3):**671-6. 2003.
- Kong QP, Yao YG, Sun C, Bandelt HJ, Zhu CL, Zhang YP. Phylogeny of east Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences. **Am J Hum Genet.** **73:** 671-6. 2003.
- Konings A, Van Laer L, Michel S, Malczyk M, Carlsson PI, Bondeson ML, Huyghe J, Borg E, Sliwinska-Kowalska M, Van Camp G. Investigation of 3 variations in HSP70 genes as cause of noise-induced hearing loss in two independent populations. **6th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference.** Hinxton - UK. Abstract P127. 2007.
- Konings A, Van Laer L, Pawelczyk M, Carlsson PI, Bondeson ML, Rajkowska E, Dudarewicz A, Vandeveld A, Fransen E, Huyghe J, Borg E, Sliwinska-Kowalska M, Van Camp G. Association between variations in CAT and noise-induced hearing loss in two independent noise-exposed populations. **Hum Mol Genet.** **16(15):**1872-83. 2007
- Kopke RD, Coleman JK, Kopke RD, Coleman JK, Liu J, Campbell KC, Riffenburgh RH. Candidate's thesis: enhancing intrinsic cochlear stress defenses to reduce noise-induced hearing loss. **Laryngoscope.** **112(9):**1515-32. 2002.
- Kupka S, Toth T, Wrobel M, Zeissler U, Szyfter W, Szyfter K, Niedzielska G, Bal J, Zenner HP, Sziklai I, Blin N, Pfister M. Mutation A1555G in the 12S rRNA gene and its epidemiological importance in German, Hungarian, and Polish patients. **Hum Mutat.** **19:**308-9. 2002.
- Lalande NM, Héту R, Lambert J. Is occupational noise exposure during pregnancy a risk factor of damage to the auditory system of the fetus? **Am J Ind Med.** **10(4):**427-35. 1986.
- Lambert AJ, Brand MD. Research on mitochondria and aging, 2006-2007. **Aging Cell.** **6:** 417-20. 2007.
- Larsen HC, Angelborg C, Hultcrantz E. Effect of ethanol on cochlear blood flow. **Arch Otorhinolaryngol.** **233:** 19-23. 1981.

- Lerer I, Sagi M, Ben-Neriah Z, Wang T, Levi H, Abeliovich D. A deletion mutation in GJB6 cooperating with a GJB2 mutation in trans in non-syndromic deafness: A novel founder mutation in Ashkenazi Jews. **Hum Mutat.** **18**: 460. 2001.
- Lezirovitz K, Nicastro FS, Pardono E, Abreu-Silva RS, Batissoco AC, Neustein I, Spinelli M, Mingroni-Netto RC. Is autosomal recessive deafness associated with oculocutaneous albinism a "coincidence syndrome"? **J Hum Genet.** **51(8)**:716-20. 2006
- Lezirovitz K, Pardono E, de Mello Auricchio MT, de Carvalho E Silva FL, Lopes JJ, Abreu-Silva RS, Romanos J, Batissoco AC, Mingroni-Netto RC. Unexpected genetic heterogeneity in a large consanguineous Brazilian pedigree presenting deafness. **Eur J Hum Genet.** 2007
- Li R, Greinwald JH Jr, Yang L, Choo DI, Wenstrup RJ, Guan MX. Molecular analysis of the mitochondrial 12S rRNA and tRNASer(UCN) genes in paediatric subjects with non-syndromic hearing loss. **J Med Genet.** **41**: 615-20. 2004.
- Li X, Guan MX. A human mitochondrial GTP binding protein related to tRNA modification may modulate phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation. **Mol Cell Biol.** **22**:7701-11. 2002.
- Li Z, Li R, Chen J, Liao Z, Zhu Y, Qian Y, Xiong S, Heman-Ackah S, Wu J, Choo DI, Guan MX. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. **Hum Genet.** **117**: 9-15. 2005.
- Liao Z, Zhao J, Zhu Y, Yang L, Yang A, Sun D, Zhao Z, Wang X, Tao Z, Tang X, Wang J, Guan M, Chen J, Li Z, Lu J, Guan MX. The ND4 G11696A mutation may influence the phenotypic manifestation of the deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation in a four-generation Chinese family. **Biochem Biophys Res Commun.** **362**:670-6. 2007.
- Liu TC, Hsu CJ, Hwang JH, Tseng FY, Chen YS. Effects of alcohol and noise on temporary threshold shift in Guinea pigs. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.** **66**: 124-9. 2004.
- Lynch ED, Kil J. Compounds for the prevention and treatment of noise-induced hearing loss. **Drug Discov Today.** **10(19)**:1291-8. 2005.
- Maca-Meyer N, González AM, Larruga JM, Flores C, Cabrera VM. Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions. **BMC Genet.** **2**: 13. 2001.
- Maca-Meyer N, González AM, Pestano J, Flores C, Larruga JM, Cabrera VM. Mitochondrial DNA transit between West Asia and North Africa inferred from U6 phylogeography. **BMC Genet.** **16**:4:15. 2003.
- Macaulay V, Hill C, Achilli A, Rengo C, Clarke D, Meehan W, Blackburn J, Semino O, Scozzari R, Cruciani F, Taha A, Shaari NK, Raja JM, Ismail P, Zainuddin Z, Goodwin W, Bulbeck D, Bandelt HJ, Oppenheimer S, Torroni A, Richards M. Single, rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. **Science.** **308(5724)**:1034-6. 2005.
- Malik S, Sudoyo H, Sasmono T, Winata S, Arhya IN, Pramoonjago P, Sudana W, Marzuki S. Nonsyndromic sensorineural deafness associated with the A1555G mutation in the mitochondrial small subunit ribosomal RNA in a Balinese family. **J Hum Genet.** **48**:119-24. 2003a.
- Malik SG, Pieter N, Sudoyo H, Kadir A, Marzuki S. Prevalence of the mitochondrial DNA A1555G mutation in sensorineural deafness patients in island Southeast Asia. **J Hum Genet.** **48**:480-3. 2003b.

- Marano RJ, Ghassemifar R. Ultra-sonic stimulation of cultured primary human tympanic membrane keratinocytes leads to the regulation of antiapoptotic and stress genes. **6th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference**. Hinxton - UK. Abstract P98. 2007.
- Marques SR. Os efeitos do ruído em motoristas de ônibus urbanos do município de São Paulo. São Paulo. 1998. (Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica.)
- Matthijs G, Claes S, Longo-Mbenza B, Cassiman J-J. Non-Syndromic Deafness Associated with a Mutation and a Polymorphism in the Mitochondrial 12S Ribosomal RNA Gene in a Zairean Pedigree. **Eur. J. Hum. Genet.** **4**: 46-51. 1996.
- McGuirt WT, Prasad SD, Griffith AJ, Kunst HP, Green GE, Shpargel KB, Runge C, Huybrechts C, Mueller RF, Lynch E, King MC, Brunner HG, Cremers CW, Takanosu M, Li SW, Arita M, Mayne R, Prockop DJ, Van Camp G, Smith RJ. Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). **Nat Genet** **23(4)**: 413-9; 1999.
- Mchugh R K e Friedman R A. Genetics of Hearing Loss: Allelism and Modifier Genes Produce a Phenotypic Continuum. **Anat Rec Part** **288A**:370–381, 2006.
- Merriwether DA, Hodgson JA, Friedlaender FR, Allaby R, Cerchio S, Koki G, Friedlaender JS.
- Mikuriya T, Sugahara K, Takemoto T, Tanaka K, Takeno K, Shimogori H, Nakai A, Yamashita H. Geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, prevents acoustic injury in the guinea pig. **Brain Res.** **1065**:107-14. 2005.
- Mishmara D, Ruiz-Pesinia E, Golikb P, Macaulay V, Clarke AG, Hosseinib S, Brandona M, Easleyf K, Cheng E, Brownb MD, Sukerniki RI, Olckersj A, Wallace DC. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans, **PNAS.** **100 (1)**:171–176. 2003.
- MITOMAP** - Ruiz-Pesini, E., Lott, M.T., Procaccio, V., Poole, J., Brandon, M.C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P., and Wallace, D.C. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Research* 35 (Database issue):D823-D828. 2007. URL: <http://www.mitomap.org>.
- Mizoue T, Miyamoto T, Shimizu T. Combined effect of smoking and occupational exposure to noise on hearing loss in steel factory workers. **Occup Environ Med** **60**: 56–9. 2003.
- Mkaouar-Rebai E, Tlili A, Masmoudi S, Louhichi N, Charfeddine I, Ben Amor M, Lahmar I, Driss N, Drira M, Ayadi H, Fakhfakh F. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA and tRNA^{Ser}(UCN) genes in Tunisian patients with nonsyndromic hearing loss. **Biochem Biophys Res Commun.** **340**:1251-8. 2006.
- Moilanen JS, Majamaa K. Phylogenetic network and physicochemical properties of nonsynonymous mutations in the protein-coding genes of human mitochondrial DNA. **Mol Biol Evol.** **20**:1195-210. 2003
- Moraes CT, Atencio DP, Oca-Cossio J, Diaz F. Techniques and pitfalls in the detection of pathogenic mitochondrial DNA mutations. **J Mol Diagn.** **5**: 197-208. 2003.
- Morales Angulo C, Gallo Terán J, del Castillo I, Moreno Pelayo MA, García-Mantilla J, Moreno Herrero F. Audiometric features of familial hearing impairment transmitted by mitochondrial inheritance (A1555G). **Acta Otorrinolaringol Esp.** **53**: 641-8. 2002.
- Morita Y, Hirokawa S, Kikkawa Y, Nomura T, Yonekawa H, Shiroishi T, Takahashi S, Kominami R. Fine mapping of Ahl3 affecting both age-related and noise-induced hearing loss. **Biochem Biophys Res Commun.** **355**: 117-21. 2007.

- Mroczek-Tońska K, Kisiel B, Piechota J, Bartnik E. Leber hereditary optic neuropathy--a disease with a known molecular basis but a mysterious mechanism of pathology. **J Appl Genet.** **44**:529-38. 2003.
- mtDB - Human Mitochondrial Genome Database** - Ingman, M. e Gyllensten, U. mtDB: Human Mitochondrial Genome Database, a resource for population genetics and medical sciences. **Nucleic Acids Res** **34**: D749-D751. 2006. URL: <http://www.genpat.uu.se/mtDB/>
- Niu X, Canlon B. Protective mechanisms of sound conditioning. **Adv Otorhinolaryngol.** **59**:96-105. 2002.
- Noller HF. Biochemical characterization of the ribosomal decoding site. **Biochimie.** **88**: 35-41. Epub 2006.
- Norris VW, Arnos KS, Hanks WD, Xia X, Nance WE, Pandya A. Does universal newborn hearing screening identify all children with GJB2 (Connexin 26) deafness? Penetrance of GJB2 deafness. **Ear Hear.** **27**:732-41. 2006.
- Nurminen T, Kurppa K. Occupational noise exposure and course of pregnancy. **Scand J Work Environ Health.** **15**(2):117-24. 1989.
- Nurminen T. Female noise exposure, shift work, and reproduction. **J Occup Environ Med.** **37**(8):945-50. 1995.
- Ohinata Y, Miller JM, Schacht J. Protection from noise-induced lipid peroxidation and hair cell loss in the cochlea. **Brain Res.** **966**(2): 265-73. 2003.
- Ohinata Y, Yamasoba T, Schacht J, Miller JM. Glutathione limits noise-induced hearing loss. **Hear Res.** **146**(1-2): 28-34. 2000.
- Olefsky JM, Beal MF, Davis RE, Howell N. Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. **Am J Hum Genet.** **70**(5):1152-71.2002. Erratum in: *Am J Hum Genet* **71**(2):448-9. 2002
- Oliveira, JAA. Fisiologia Clínica da audição – cóclea ativa. In: PAIR – Perda Auditiva Induzida por Ruído. vol I. org: Nudelmann AA, Costa EA, Ibañez RN. Ed. Bagagem comunicação Ltda. Porto Alegre RS. pp. 101-142. 1997.
- Olivieri A, Achilli A, Pala M, Battaglia V, Fornarino S, Al-Zahery N, Scozzari R, Cruciani F, Behar DM, Dugoujon JM, Coudray C, Santachiara-Benerecetti AS, Semino O, Bandelt HJ, Torroni A. The mtDNA Legacy of the Levantine Early Upper Palaeolithic in Africa. **Science.** **314**: 1767-1770. 2006.
- Ordem de serviço INSS/DSS Nº 608. 05/08/1998. <http://www81.dataprev.gov.br/sislex/index.asp>.
- Oshima T, Kudo T, Ikeda K. Point mutation of the mitochondrial genome in Japanese deaf-mutism. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.** **63**:329-32. 2001.
- OSTergaard E, Montserrat-Sentis B, Gronskov K, Brondum-Nielsen K. The A1555G mtDNA mutation in Danish hearing-impaired patients: frequency and clinical signs. **Clin Genet.** **62**:303-5. 2002.
- Palanichamy MG, Sun C, Agrawal S, Bandelt HJ, Kong QP, Khan F, Wang CY, Chaudhuri TK, Palla V, Zhang YP. Phylogeny of mitochondrial DNA macrohaplogroup N in India, based on complete sequencing: implications for the peopling of South Asia. **Am J Hum Genet.** **75**(6):966-78. 2004.

- Pandya A, Xia X, Radnaabazar J, Batsuuri J, Dangaansuren B, Fischel-Ghodsian N, Nance WE. Mutation in the Mitochondrial 12S rRNA Gene in Two Families from Mongolia with Matrilineal Aminoglycoside Ototoxicity. **J. Med. Gent.** **34**: 169-172. 1997.
- Pandya A, Xia XJ, Erdenetungalag R, Amendola M, Landa B, Radnaabazar J, Dangaasuren B, Van Tuyle G, Nance WE. Heterogenous point mutations in the mitochondrial tRNA Ser(UCN) precursor coexisting with the A1555G mutation in deaf students from Mongolia. **Am J Hum Genet.** **65**(6): 1803-1806. 1999.
- Parker WD Jr, Swerdlow RH. Mitochondrial dysfunction in idiopathic Parkinson disease. **Am J Hum Genet.** **62**: 758-62. 1998
- Pearson P, Dawe LA, Timney B. Frequency selective effects of alcohol on auditory detection and frequency discrimination thresholds. **Alcohol Alcohol.** **34**: 741-9. 1999.
- Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB. Human glutathione S transferase a (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. **Biochem. J.** **300**: 271-276. 1994.
- Petit, C.; Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. **Nature Genetics.** **14**: 385-391; 1996.
- Pierson MJ, Martinez-Arias R, Holland BR, Gemmell NJ, Hurles ME, Penny D. Deciphering past human population movements in Oceania: provably optimal trees of 127 mtDNA genomes. **Mol Biol Evol.** **23**(10):1966-75. 2006.
- Portaria Nº 19, de 09/04/1998 <http://www.mte.gov.br/Empregador/segsau/Legislacao/Portarias/1998/conteudo/port19.asp>
- Pourbakht A, Yamasoba T. Ebselen attenuates cochlear damage caused by acoustic trauma. **Hear Res.** **181**(1-2):100-8. 2003.
- Pouryaghoub G, Mehrdad R, Mohammadi S. Interaction of smoking and occupational noise exposure on hearing loss: a cross-sectional study. **BMC Public Health** **7**: 137. 2007.
- Prell CG, Dolan DF, Schacht J, Miller JM, Lomax MI, Altschuler RA. Pathways for protection from noise induced hearing loss. **Noise Health.** **5**:1-17. 2003.
- Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JJ, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. **Nat Genet.**:289-94. 1993.
- Promenade Round the Cochlea - <http://www.iurc.montp.inserm.fr/cric51/audition/english/start.htm>. 2007
- Rabinowitz PM, Pierce Wise J Sr, Hur Mobo B, Antonucci PG, Powell C, Slade M. Antioxidant status and hearing function in noise-exposed workers. **Hear Res.** **173**(1-2):164-71. 2002.
- Rajkumar R, Banerjee J, Gunturi HB, Trivedi R, Kashyap VK. Phylogeny and antiquity of M macrohaplogroup inferred from complete mt DNA sequence of Indian specific lineages. **BMC Evol Biol.** **5**(1):26. 2005 Erratum in: *BMC Evol Biol.* **6**(9):9. 2006.
- Ramsebner R, Lucas T, Schoefer C, Ludwig M, Baumgartner WD, Wachtler FJ, Kirschhofer K, Frei K. Relevance of the A1555G Mutation in the 12S rRNA Gene for Hearing Impairment in Austria. **Otol Neurotol.** **28**: 884-886. 2007.

- Reid FM, Vernham GA, Jacobs HT. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. **Human Mutation** 3(3):243-7. 1994.
- Ribeiro AM, Câmara Vde M. Perda auditiva neurossensorial por exposição continuada a níveis elevados de pressão sonora em trabalhadores de manutenção de aeronaves de asas rotativas. **Cad Saude Publica**. **22**: 1217-24. 2006.
- Richard C. Strange*, Monica A. Spiteri, Sudarshan Ramachandran, Anthony A. Fryer. Glutathione-S-transferase family of enzymes. **Mutation Research** **482** 21–26. 2001
- Richard C. Strange*, Monica A. Spiteri, Sudarshan Ramachandran, Anthony A. Fryer. Glutathione-S-transferase family of enzymes. **Mutation Research** **482** 21–26. 20001
- Robinette MS, Alper RR, Brey RH. The effects of alcohol on the acoustic Reflex Relaxation Index. **J Aud Res**. **21**: 159-65. 1981.
- Robinette MS, Brey RH. Influence of alcohol on the acoustic reflex and temporary threshold shift. **Arch Otolaryngol**. **104**: 31-7. 1978.
- Roostalu,U., Kutuev,I., Loogvali,E.L., Metspalu,E., Tambets,K., Reidla,M., Khusnutdinova,E., Usanga,E., Kivisild,T. and Villems,R. Origin and expansion of haplogroup h, the dominant human mitochondrial DNA lineage in west eurasia: the near eastern and caucasian perspective. **Mol. Biol. Evol**. **24**: 436-448. 2007.
- Rosenhall U. The influence of ageing on noise-induced hearing loss. *Noise Health*. 5:47-53. 2003.
- Rossi MM. Impacto do ruído urbano sobre a audição: estudo comparativo entre operadores de tráfego da CET e guardas florestais. São Paulo. 2002. (Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da USP.)
- Rothrock CR, Murgia A, Sartorato EL, Leonardi E, Wei S, Lebeis SL, Yu LE, Elfenbein JL, Fisher RA, Friderici KH. Connexin 26 35delG does not represent a mutational hotspot. **Hum Genet**. **113(1)**:18-23. 2003
- Rozen S e Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386. 2000.
- Ruiz RC, Moreira M, Mascharetti M, Almeida MMI, Petresco S, Ruiz V. Análise da função auditiva de trabalhadores em indústrias de papel e papelão de Sorocaba e região. <http://www.geocities.com/~jorgereis/tese3.html>. 1995.
- Russo ICP. Noções gerais de acústica e psico-acústica. In: PAIR – Perda Auditiva Induzida por Ruído, vol I. org: Nudelmann AA, Costa EA, Ibañez RN. Ed. Bagagem comunicação Ltda. Porto Alegre RS. pp. 49-76. 1997.
- Sambrook J e Russell D W. Molecular cloning/Laboratory manuals. CSHL Press. 2001.
- Samuels DC, Carothers AD, Horton R, Chinnery PF. The power to detect disease associations with mitochondrial DNA haplogroups. **Am J Hum Genet**. **78**: 713-20. 2006.
- Santos F, Pena SDJ, Epplen JT. Genetic and Population Study of a Y-Linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a Simple Non-Isotopic Technique. **Hum Genet** **90**: 655-656. 1993
- Schell LM, Gallo MV, Denham M, Ravenscroft J. Effects of pollution on human growth and development: an introduction. **J Physiol Anthropol**. **25**: 103-12. 2006.

- Schmuziger N, Patscheke J, Probst R. Hearing in nonprofessional pop/rock musicians. **Ear Hear.** **27**:321-30. 2006.
- Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yairi Y, Srisailapathy CR, Rosengren SS, Markham AF, Mueller RF, Lench NJ, Van Camp G, Smith RJ, Sheffield VC. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. **Hum Mutat.** **11(5)**: 387-94. 1998.
- Sedlak, J. & Lindsay, R.H. (1968) Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem** **25**: 192-205.
- Seidegard J, Pero RW. The genetic variation and the expression of human glutathione transferase mu. *Klin Wochenschr.* 1988;66 Suppl 11:125-6.
- Sha SH, Hongyan Jiang, Transient ATP-depletion by noise trauma activates Andra E. Talaska and Jochen Schacht Rac/Rho small GTPase pathways. **6th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference.** Hinxton - UK. Abstract P124. 2007.
- Shacter E, Williams JÁ, Stadman ER, Levine RL. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *in Free radicals: – a practical approach.* PUNCHARD NA, KELLY FJ. Oxford. 1996. pp. 159-170.
- Smith SD e Taggart T. Genetic Hearing Loss Associated with Integumentary Disorders. In: Toriello, H.V., Reardon W., Gorlin R.J., editors. Hereditary Hearing Loss and Its Syndromes. 2^a ed. New York: Oxford University Press, Inc. p 37-82. 2004.
- Sprenger R, Schlagenhauser R, Kerb R, Bruhn C, Brockmöller J, Roots I, Brinkmann U. Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. **Pharmacogenetics.** **10**: 557-65. 2000.
- Starikovskaya EB, Sukernik RI, Derbeneva OA, Volodko NV, Ruiz-Pesini E, Torroni A, Brown MD, Lott MT, Hosseini SH, Huoponen K, Wallace DC. Mitochondrial DNA diversity in indigenous populations of the southern extent of Siberia, and the origins of Native American haplogroups. **Ann Hum Genet.** **69(Pt 1)**:67-89. 2005.
- Stephan Frings - Uni Heidelberg - <http://www.sinnesphysiologie.de/gruvo03/gehoer/cochlea.htm>. 2007
- Sue CM, Tanji K, Hadjigeorgiou G, Andreu AL, Nishino I, Krishna S, Bruno C, Hirano M, Shanske S, Bonilla E, Fischel-Ghodsian N, DiMauro S, Friedman R. Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Ser(UCN)) gene. **Neurology.** **52**:1905-8.1999.
- Sugahara K, Inouye S, Izu H, Katoh Y, Katsuki K, Takemoto T, Shimogori H, Yamashita H, Nakai A. Heat shock transcription factor HSF1 is required for survival of sensory hair cells against acoustic overexposure. **Hear Res.** **182**:88-96. 2003.
- Sundstrom R A, Van Laer L, Van Camp G, Smith R J H. Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Loss. **Am J Med Genet (Semin. Med. Genet.)** **89**: 123-129. 1999.
- Talbott E, Helmkamp J, Matthews K, Kuller L, Cottingham E, Redmond G. Occupational noise exposure, noise-induced hearing loss, and the epidemiology of high blood pressure. **Am J Epidemiol.** **121**:501-14. 1985.

- Tanaka K, Takemoto T, Sugahara K, Okuda T, Mikuriya T, Takeno K, Hashimoto M, Shimogori H, Yamashita H. Post-exposure administration of edaravone attenuates noise-induced hearing loss. **Eur J Pharmacol.** 522:116-21. 2005.
- Tanaka M, Cabrera VM, González AM, Larruga JM, Takeyasu T, Fuku N, Guo LJ, Hirose R, Fujita Y, Kurata M, Shinoda K, Umetsu K, Yamada Y, Oshida Y, Sato Y, Hattori N, Mizuno Y, Arai Y, Hirose N, Ohta S, Ogawa O, Tanaka Y, Kawamori R, Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Shimokata H, Suzuki R, Shimodaira H. Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan. **Genome Res.** 14(10A):1832-50. 2004.
- Tatke M. Mitochondrial myopathies-clinicopathological features and diagnostic modalities. **Indian J Pathol Microbiol.** 50: 467-77. 2007.
- Teixeira CF, Augusto LG, Morata TC. Saúde auditiva de trabalhadores expostos a ruído e inseticidas. **Rev Saude Publica.** 37:417-23. 2003.
- Tekin M, Duman T, Bogoclu G, Incesulu A, Comak E, Fitoz S, Yilmaz E, Ilhan I, Akar N. Frequency of mtDNA A1555G and A7445G mutations among children with prelingual deafness in Turkey. **Eur J Pediatr.** 162:154-8. 2003.
- Thangaraj K, Chaubey G, Kivisild T, Reddy AG, Singh VK, Rasalkar AA, Singh L. Reconstructing the origin of Andaman Islanders. **Science.** 308(5724):996. 2005.
- Thyagarajan D, Bressman S, Bruno C, Przedborski S, Shanske S, Lynch T, Fahn S, DiMauro S. A novel mitochondrial 12SrRNA point mutation in parkinsonism, deafness, and neuropathy. **Ann Neurol.** 48(5):730-6. 2000.
- Tiranti V, Chariot P, Carella F, Toscano A, Soliveri P, Girlanda P, Carrara F, Fratta GM, Reid FM, Mariotti C, et al. Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNASer(UCN) gene. **Hum Mol Genet.** 4(8):1421-7. 1995.
- Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML, Wallace DC. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. **Genetics.** 144: 1835-50. 1996.
- Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Chen YS, Lavergne L, Wallace DC. mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. **Am J Hum Genet.** 55: 760-76. 1994.
- Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. **Biomed & Pharmac** 57:145–155. 2003.
- Upile T, Sipaul F, Jerjes W, Singh S, Nouraei SA, El Maaytah M, Andrews P, Graham J, Hopper C, Wright A. The acute effects of alcohol on auditory thresholds. **BMC Ear Nose Throat Disord.** 7: 4. 2007.
- Van Camp G & Smith RJ. Maternally inherited hearing impairment. **Clin Genet.** 57(6):409-14. 2000.
- Van Camp G & Smith RJH. (12/2007) Hereditary Hearing Loss Homepage. World Wide Web URL: <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>
- Van Camp G, Willems PJ, Smith RJH. Nonsyndromic Hearing Impairment: Unparalleled Heterogeneity. **Am J Hum Genet.** 60: 758-764. 1997.

- Van Camp G. Genetics of complex forms of hearing impairment. 6th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference. Hinxton, UK. 2007
- Van Campen LE, Murphy WJ, Franks JR, Mathias PI, Toraason MA. Oxidative DNA damage is associated with intense noise exposure in the rat. **Hear Res.** **164(1-2)**: 29-38. 2002.
- Van Eyken E, Van Laer L, Fransen E, Topsakal V, Hendrickx JJ, Demeester K, Van de Heyning P, Mäki-Torkko E, Hannula S, Sorri M, Jensen M, Parving A, Bille M, Baur M, Pfister M, Bonaconsa A, Mazzoli M, Orzan E, Espeso A, Stephens D, Verbruggen K, Huyghe J, Dhooge I, Huygen P, Kremer H, Cremers C, Kunst S, Manninen M, Pyykkö I, Rajkowska E, Pawelczyk M, Sliwiska-Kowalska M, Steffens M, Wienker T, Van Camp G. The contribution of GJB2 (Connexin 26) 35delG to age-related hearing impairment and noise-induced hearing loss. *Otol Neurotol.* **28**: 970-5. 2007.
- Van Laer L, Carlsson PI, Ottschytch N, Bondeson ML, Konings A, Vandeveld A, Dieltjens N, Fransen E, Snyders D, Borg E, Raes A, Van Camp G. The contribution of genes involved in potassium-recycling in the inner ear to noise-induced hearing loss. **Hum Mutat.** **27(8)**:786-95. 2006
- Wallace DC. A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. **Novartis Found Symp.** **235**:247-63; discussion 263-6. 2001.
- Wallace DC. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.** **70**: 363-74. 2005.
- Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science.** **283**: 1482-8. 1999.
- Wang QJ, Lu CY, Li N, Rao SQ, Shi YB, Han DY, Li X, Cao JY, Yu LM, Li QZ, Guan MX, Yang WY, Shen Y. Y-linked inheritance of non-syndromic hearing impairment in a large Chinese family. **J Med Genet.** **41**: e80. 2004.
- Wecker JR, Ison JR. Acute exposure to methyl or ethyl alcohol alters auditory function in the rat. **Toxicol Appl Pharmacol.** **74**: 258-66. 1984.
- Welch KO, Marin RS, Pandya A, Arnos KS. Compound heterozygosity for dominant and recessive GJB2 mutations: effect on phenotype and review of the literature. **Am J Med Genet A.** **143**:1567-73. 2007.
- Whitlon DS. Cochlear development: hair cells don their wigs and get wired. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.** **12**: 449-54. 2004.
- Wilcox S A, Osborn A H, Allen-Powell D R, Maw M A, Dahl H-H M, Gadner R J M. Connexin 26 deafness in several interconnected families. **J Med Genet.** **36**:383-385. 1999.
- Wild DC, Brewster MJ, Banerjee AR. Noise-induced hearing loss is exacerbated by long-term smoking. **Clin Otolaryngol** **30**: 517–520. 2005.
- Willson GN, Chung DY, Gannon RP, Roberts M, Mason K. Is a healthier person less susceptible to noise-induced hearing loss? **J Occup Med.** **21**:627-30. 1979
- Wu TN, Chou FS, Chang PY. A study of noise-induced hearing loss and blood pressure in steel mill workers. **Int Arch Occup Environ Health.** **59**:529-36. 1987.
- Xing G, Chen Z, Wei Q, Tian H, Li X, Zhou A, Bu X, Cao X. Maternally inherited non-syndromic hearing loss associated with mitochondrial 12S rRNA A827G mutation in a Chinese family. **Biochem Biophys Res Commun.** **344**: 1253-7. 2006b.

- Xing G, Chen Z, Wei Q, Tian H, Li X, Zhou A, Bu X, Cao X. Mitochondrial 12S rRNA A827G mutation is involved in the genetic susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. **Biochem Biophys Res Commun.** **346**:1131-5. 2006.
- Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem.* 273: 3517-27. 1998.
- Yamasoba T, Nuttall AL, Harris C, Raphael Y, Miller JM. Role of glutathione in protection against noise-induced hearing loss. **Brain Res.** **784(1-2)**: 82-90.1998.
- Yamasoba T, Schacht J, Shoji F, Miller JM. Attenuation of cochlear damage from noise trauma by an iron chelator, a free radical scavenger and glial cell line-derived neurotrophic factor in vivo. **Brain Res.** **815(2)**: 317-25. 1999.
- Yang M, Tan H, Yang Q, Wang F, Yao H, Wei Q, Tanguay RM, Wu T. Association of hsp70 polymorphisms with risk of noise-induced hearing loss in Chinese automobile workers. **Cell Stress Chaperones.** **11**:233-9. 2006.
- Yang M, Zheng J, Yang Q, Yao H, Chen Y, Tan H, Jiang C, Wang F, He M, Chen S, Wei Q, Tanguay RM, Wu T. Frequency-specific association of antibodies against heat shock proteins 60 and 70 with noise-induced hearing loss in Chinese workers. **Cell Stress Chaperones.** **9**:207-13. 2004.
- Yao YG, Salas A, Bravi CM, Bandelt HJ. A reappraisal of complete mtDNA variation in East Asian families with hearing impairment. **Hum Genet.** **119**: 505-15. 2006.
- Yoshida N, Kristiansen A, Liberman MC. Heat stress and protection from permanent acoustic injury in mice. **J Neurosci.** **19**:10116-24. 1999.
- Young WY, Zhao L, Qian Y, Li R, Chen J, Yuan H, Dai P, Zhai S, Han D, Guan MX. Variants in mitochondrial tRNAGlu, tRNAArg, and tRNAThr may influence the phenotypic manifestation of deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation in three Han Chinese families with hearing loss. **Am J Med Genet A.** **140**:2188-97. 2006.
- Yuan H, Chen J, Liu X, Cheng J, Wang X, Yang L, Yang S, Cao J, Kang D, Dai P, Zhai S, Han D, Young WY, Guan MX. Coexistence of mitochondrial 12S rRNA C1494T and CO1/tRNA(Ser(UCN)) G7444A mutations in two Han Chinese pedigrees with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. **Biochem Biophys Res Commun.** **362**: 94-100. 2007.
- Yuan J, Yang M, Yao H, Zheng J, Yang Q, Chen S, Wei Q, Tanguay RM, Wu T. Plasma antibodies to heat shock protein 60 and heat shock protein 70 are associated with increased risk of electrocardiograph abnormalities in automobile workers exposed to noise. **Cell Stress Chaperones.** **10**:126-35. 2005.
- Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, Milá M, Monica MD, Lutfi J, Shohat M, Mansfield E, Delgrosso K, Rappaport E, Surrey S, Fortina P. 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. 1997
- Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng JH, Han D, Bai Y, Young WY, Guan MX. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. **Am J Hum Genet.** **74(1)**:139-52. 2004.

- Zhao H, Young WY, Yan Q, Li R, Cao J, Wang Q, Li X, Peters JL, Han D, Guan MX. Functional characterization of the mitochondrial 12S rRNA C1494T mutation associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. **Nucleic Acids Res.** **33(3)**:1132-9. 2005.
- Zhao HB, Kikuchi T, Ngezahayo A, White TW. Gap Junctions and Cochlear Homeostasis. **J Membr Biol.** **209(2-3)**: 177–186. 2006.
- Zhu Y, Qian Y, Tang X, Wang J, Yang L, Liao Z, Li R, Ji J, Li Z, Chen J, Choo DI, Lu J, Guan MX. Aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss is associated with the G7444A mutation in the mitochondrial COI/tRNASer(UCN) genes in two Chinese families. **Biochem Biophys Res Commun.** **342**: 843-50. 2006.

VIII - ANEXO I

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

DADOS PESSOAIS:

DATA:-----

CASO N°:-----

NOME:-----

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

NATURAL: -----

ESCOLARIDADE:-----

B() P () N ()

PAI:-----

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

Ascendência: -----

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

MÃE:-----

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

Ascendência: -----

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

ENDEREÇO:-----

TELEFONE:-----

ORIGEM DO PACIENTE:-----

MOTIVO DA CONSULTA:-----

HISTÓRICO FAMILIAL:

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

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

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

CONSULENTE JÁ TEVE ABORTOS: ()NÃO ()SIM

HEREDOGRAMA:

CARACTERIZAÇÃO DO TIPO DE SURDEZ:

- ☐ BILATERAL ☐ UNILATERAL ☐ ?
☐ ESTACIONÁRIA ☐ PROGRESSIVA ☐ ?
☐ LEVE (27-40 DB) ☐ MODERADA (40-65 DB) ☐ GRAVE (65-95 DB)
☐ PROFUNDA (> 95 DB)

	250Hz	500Hz	1KHz	2KHz	3KHz	4KHz	6KHz	8KHz
OD								
OE								
OD								
OE								

- ☐ CONDUTIVA ☐ NEUROSSENSORIAL ☐ MISTA ☐ ?

ETIOLOGIA: ☐ CONGÊNITA ☐ PÓS-NATAL IDADE DE INÍCIO:-----

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

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

- ☐ ZUMBIDO ☐ TONTURA

GESTAÇÃO:

☐ SEM INTERCORRÊNCIAS

☐ COM INTERCORRÊNCIAS

OBSERVAÇÕES:-----

PERÍODO PERINATAL:

☐ SEM INTERCORRÊNCIAS

☐ COM INTERCORRÊNCIAS

PARTO: ☐ NORMAL

☐ CESÁREA

MOTIVO:-----

☐ FORCEPS

CRONOLOGIA: ☐ TERMO

☐ PRÉ-TERMO

☐ PÓS-TERMO

OBSERVAÇÕES:-----

☐ ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS ☐ USO DE OUTRAS DROGAS
OTOTÓXICAS
☐ INFECÇÕES DE OUVIDO ☐ DIABETES MELITO
☐ MENINGITE ☐ SARAMPO ☐ CAXUMBA
☐ MENINGOENCEFALITES ☐ INFECÇÃO DAS VIAS AÉREAS SUPERIORES

Fuma? -----

☐ EXPOSIÇÃO CONSTANTE A RUÍDOS

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

EXAMES REALIZADOS:-----

HIPÓTESE DIAGNÓSTICA:

☐ HEREDITÁRIA ☐ ADQUIRIDA ☐ ?

☐ ISOLADA ☐ SINDRÔMICA ☐ ?

PAIS PRETENDEM TER MAIS FILHOS: ☐ NÃO ☐ SIM

FIZERAM ☐ LAQUEADURA ☐ VASECTOMIA

DIAGNÓSTICO:-----

CONDUTA:-----

ANAMNESE OCUPACIONAL

Exposição anterior a ruído

Ramo	Função	Tempo

Obs.: _____

Empresa onde trabalha: _____

Ramo de Atividade: _____

Setor: _____

Função: _____

Horas diárias de trabalho: _____

Tempo de trabalho na empresa: _____

Horas Extras: _____

Exposição a ruído ocupacional:

Tempo na empresa atual anos _____ meses _____

Tempo total: anos _____ meses _____

Descrição das atividades e do ambiente de trabalho: _____

Impressão sobre o ruído

Baixo () médio () alto ()

Uso de Protetor Auricular

Sim () não ()

Tipo:

Concha ()

Plug ()

Outros ()

Tempo: _____ meses

Obs.: _____

Exposição a ruído extra-laboral

Sim () não ()

Tempo: _____ meses

Obs: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: *ASPECTOS GENÉTICOS E FUNCIONAIS DAS MUTAÇÕES MITOCONDRIAIS QUE CAUSAM SURDEZ*

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Pretendemos testar o material genético das pessoas com diferentes tipos de perdas auditivas para identificar alterações em genes responsáveis por surdez. O objetivo dessa pesquisa é verificar se essas pessoas têm uma predisposição genética à perda de audição. A importância dos resultados dos exames é a orientação que os indivíduos receberão sobre a possibilidade de ocorrerem outros casos de problemas de audição na família.

Além disso, nos indivíduos em que identificarmos alterações genéticas, pretendemos coletar uma amostra adicional de sangue para estudarmos o funcionamento das suas células em cultura.

Eu, _____ nome _____
_____, _____, _____ residente e domiciliado
na _____, _____, portador da Cédula de
identidade _____, e inscrito no CPF/MF _____,
nascido(a) em ____ / ____ / _____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea
vontade em participar como voluntário(a) do estudo “**ASPECTOS GENÉTICOS E FUNCIONAIS
DAS MUTAÇÕES MITOCONDRIAIS QUE CAUSAM SURDEZ**”. Declaro que obtive todas as
informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por
mim apresentadas. Concordo, ainda, em permitir acesso a exames complementares e outras
informações médicas que me forem solicitadas no decorrer desse estudo.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas da **“DEFICIÊNCIA AUDITIVA”**;
- II) Será feita a coleta de 10 ml. de sangue;
- III) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará no meu tratamento; não vai me curar; não vai me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta.
- IV) Esse projeto não tem como objetivo oferecer tratamento terapêutico;
- V) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VI) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não irá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VIII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa
- IX) O material colhido será armazenado pelo tempo necessário para a identificação e caracterização do gene e de sua mutação responsável pela condição.

() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

() Concordo com nova coleta de 10 ml do meu sangue para a realização dos outros estudos no caso de ser selecionado(a).

São Paulo, de de 200__

() Paciente / () Responsável

.....

Responsável pelo Projeto: _____

Ronaldo S. Abreu Silva

CRBio 43.102/01-D