Uirá Souto Melo

Estudo epidemiológico e genético da surdez em dois municípios do estado da Paraíba, Brasil.

Epidemiologic and genetic study of deafness in two counties in the state of Paraíba, Brazil.

São Paulo

2013

Uirá Souto Melo

Estudo epidemiológico e genético da surdez em dois municípios do estado da Paraíba, Brasil.

Epidemiologic and genetic study of deafness in two counties in the state of Paraíba, Brazil.

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

Orientador(a): Regina Célia Mingroni Netto

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Souto Melo, Uirá

Estudo epidemiológico e genético da surdez
em dois municípios do estado da Paraíba, Brasil.

96 páginas

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

1. Palavra-Chave Principal – Surdez 2.
Palavra-Chave Secundária – *GJB2* 3. Palavra-
Chave Secundária – Epidemiologia
Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Regina Célia Mingroni Netto
Orientador(a)

Agradecimentos

À orientadora Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto, por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório e por todas as discussões valiosas sobre ciência que tivemos.

À colaboradora Profa. Dra. Silvana Santos, minha grande “comadre” científica. A ela dedico com enorme carinho esse trabalho.

Aos meus pais, Fabíola e Josemir, pelo apoio psicológico, emocional e financeiro. Aos meus irmãos Cauê, Tainá e Anaíra pelo prazer da convivência.

Ao Prof. Paulo Otto pelas discussões científicas incríveis e pelo carinho que me tratou durante todo esse tempo. Grande mestre, minha inspiração.

Aos demais professores do IB, em especial as Profa. Dra. Célia Koifmann, Profa. Dra. Angela Morgante, Profa. Dra. Lygia Pereira, Profa. Dra. Maria Rita Passos Bueno, que sempre me acolheram bem e sempre dispostos a discutir ciência.

Aos professores que tive a oportunidade de ser aluno em suas disciplinas: Prof. Dr. Eduardo Gorab, Prof. Dr. Paulo Otto, Prof. Dr. Sérgio Matioli, Prof. Dr. Paulo Sano.

Aos queridos Prof. Dr. Walter Neves e Prof. Dr. Rui Murrieta pelo carinho e amizade que construímos. Agradeço também pelas conversas, risadas, aconselhamentos e ao respeito que construímos uns pelos outros.

Ao secretário de saúde do município de Queimadas, Damião Falange, e ao secretário de saúde do município de Gado Bravo, Adriano Guerra, pela colaboração e apoio para que a pesquisa tivesse sido executada nos dois municípios. Também a todos os 115 Agentes Comunitários de Saúde que participaram da pesquisa e acompanharam-nos de casa em casa dos pacientes.

À Maria Teresa Balester de Mello Auricchio por todo apoio e treinamento na bancada, bem como pela amizade construída por esses anos.

À Dra. Ana Carla Batissoco por todas as ajudas científicas e pela amizade sincera e respeitosa.

À Maraísa Sebastião, pela pessoa incrível que ela é e pela amizade que construímos durante esse período. De certeza, uma das pessoas que tenho maior carinho no Instituto de Biociências.

À Meire Aguenta do Centro de Estudos do Genoma Humano por todo apoio em relação as análises de microssatélites e sequenciamento.

Aos integrantes do Laboratório de Genética Humana: Leandro Alves, Renata Nonose, Dra. Lílian Kimura, Dayane Cruz, Vitor Dantas, Renan Lemes, Juliana Carnavalli e Magnólia

Bocangel. Aos integrantes do Laboratório coordenado pela Profa. Dra. Angela Morga, Adriano Baldoni, José Santos e Ana Carolina. Os técnicos Paulo Rogério, Maria Raimu (Mara) e Maria de Fátima do mesmo laboratório pelo apoio e pela amizade e companhia diária.

Aos Profs. Drs. Marine Raquel Diniz da Rosa, Wagner Teobaldo Lopes de Andrade e Hannalice Gottschalck Cavalcanti, do departamento de Fonoaudiologia da Universidade Federal da Paraíba, pela realização dos exames audiométricos nos pacientes do município de Queimadas. À Cintia Potter, fonoaudióloga da secretaria de saúde do município de Gado Bravo pela realização de exames audiométricos à população desse município sem nenhum custo financeiro para a pesquisa ou para os pacientes.

Ao oftalmologista Prof. Dr. Sabino Guimarães por ter realizado o exame de fundoscopia sem nenhum custo financeiro ao projeto e aos pacientes do município de Gado Bravo.

À equipe do Núcleo de Estudos Genéticos e Educação – NEGE, da Universidade Estadual da Paraíba, coordenado pela Profa. Dra. Silvana Santos. À Thalita Figueiredo, Felipe Barbosa, Ednno Santos, Josicleide Calixto, bem como todos os integrantes que de alguma forma contribuíram para coleta de dados dessa pesquisa.

À Profa. Roberta Marques da Universidade Estadual da Paraíba pela ajuda na coleta de dados e apoio científico para redação da dissertação.

Aos integrantes do laboratório da Profa. Dra. Maria Rita Passos Bueno pela amizade e conversas filosófico-científicas.

Aos eternos amigos de graduação que estão espalhados por todo Brasil nas mais diversas pós: Thiago Severo, Allysson Allan, Ribamar Lima, Aécio Barbosa, Mariana Fragoso, Ana Amélia Calazans, Daniela Viana, Franklin Silva; pela amizade sincera e pela nossa luta diária na pós.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

À CAPES pela ajuda de custo para trabalho de campo.

1. RESUMO	10
1.1. ABSTRACT	11
2. INTRODUÇÃO	12
2.1. Surdez sindrômica	13
2.1.1. Síndrome de Waardenburg	13
2.1.2. Síndrome de Usher	15
2.1.3. Síndrome de Pendred	15
2.2. Surdez não-sindrômica	16
2.2.1. Surdez de herança autossômica recessiva	17
2.2.1.1. O locus DFNB1	18
2.2.1.1.1. O gene <i>GJB2</i>	18
2.2.1.1.2. O gene <i>GJB6</i>	19
2.2.1.2. O locus DFNB4	21
2.2.2. Surdez de herança autossômica dominante	22
2.2.3. Surdez de herança mitocondrial	23
2.3. Epidemiologia genética da surdez	24
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo geral	28
3.2. Objetivos específicos	28
4. METODOLOGIA	29
4.1. Casuística	29
4.2. Aspectos éticos	30
4.3. Avaliação audiológica e da visão	31
4.4. Genealogias	32
4.5. Análises moleculares	32
4.5.1. Extração de DNA e iniciadores (<i>primers</i>)	32
4.5.2. Análise da mutação c.35delG no gene <i>GJB2</i>	32
4.5.3. Análise da mutação c.167delT no gene <i>GJB2</i>	33
4.5.4. Análise das deleções del(<i>GJB6</i> –D13S1830) e del(<i>GJB6</i> –D13S1854)	34
4.5.5. Análise da mutação m.A1555G no gene <i>MTRNR1</i>	34
4.5.6. Análise de microssatélites	35

4.5.7. Varredura genômica por meio de <i>microarrays</i> de SNPs	36
4.5.8. Cálculos de <i>LOD Scores</i>	37
4.5.9. Sequenciamento do DNA	38
4.5.10. Técnica de MLPA	41
5. RESULTADOS	43
5.1. Informações populacionais sobre os municípios estudados	43
5.2. Caracterização da casuística	43
5.3. Resultado do estudo molecular	44
5.3.1. Resultado dos microssatélites e sequenciamento do gene <i>SLC26A4</i>	47
5.4. Estudo da surdez sindrômica	48
5.5. Resultado da varredura genômica por <i>array</i> de SNP e microssatélites próximos às regiões candidatas, em uma família com síndrome de Usher	49
5.6. Resultado do sequenciamento do gene <i>CLRN1</i>	51
5.7. Etiologia provável da surdez	52
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÃO	63
8. REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	75

2.1. Descrição dos tipos de síndrome de Usher, genes e proteínas já identificados até o momento	16
4.1. Genes, mutações, <i>primers</i> para amplificação e referências bibliográficas	32
4.2. Microssatélites próximos ao gene da pendrina, <i>primers</i> para amplificação e posição no genoma	35
4.3. Éxons do gene da Pendrina, <i>primers</i> para amplificação e referência bibliográficas dos <i>primers</i>	39
4.4. <i>Primers</i> utilizados para o sequenciamento dos exons do gene <i>CLRN1</i>	40
5.1. Dados geodemográficos, socioeconômicos e indivíduos amostrados dos dois municípios da pesquisa	43
5.2. Resumo dos resultados dos exames audiológicos	44
5.3. Frequência de mutações detectadas nos genes <i>GJB2</i> , <i>GJB6</i> e <i>MTRNR1</i> no total dos indivíduos dos dois municípios da pesquisa.	44
5.4. Frequência de mutações detectadas nos genes <i>GJB2</i> , <i>GJB6</i> e <i>MTRNR1</i> entre os probandos dos dois municípios da pesquisa	44
5.5. Frequência de mutações detectadas nos genes <i>GJB2</i> , <i>GJB6</i> e <i>MTRNR1</i> nas famílias dos municípios da pesquisa com surdez não-sindrômica	46
5.6. Frequência dos genótipos encontrados nos indivíduos dos dois municípios da pesquisa	46
5.7. Frequência dos genótipos encontrados entre os probandos dos dois municípios da pesquisa	46
5.8. Resumo das regiões mapeadas na FamGB02 por meio de varredura genômica com <i>array</i> de SNP	50
5.9. Frequência dos casos genéticos e seu provável mecanismo de herança	53
6.1. Estudos brasileiros sobre a frequência de mutações no locus <i>DNFB1</i> entre probandos com surdez não-sindrômica	58

2.1. Participação dos genes já conhecidos na etiologia dos diferentes tipos de síndrome de Waardenburg	14
2.2. Ilustração esquemática das cinco deleções região 13q11, onde se localiza o gene <i>GJB6</i> (as deleções estão desenhadas em vermelho). As deleções são: del(<i>GJB6</i> -D1S1830) de 309 kb, del(<i>GJB6</i> -D13S1854) de 233 kb, a grande deleção de mais de 920kb, a deleção de 131 kb e a deleção de 280kb	20
2.3. Representação topológica e alinhamento das sequências da Conexina 26 e Conexina 30.	21
2.4. Representação esquemática dos locais de expressão do <i>GJB2/GJB6</i> no órgão de corti	22
4.1. Mapa do estado da Paraíba	29
5.1. Resultado do cálculo de <i>LOD scores</i> de múltiplos pontos paramétrico em amostras de quatro pacientes afetados com síndrome de Usher	49
5.2. Haplótipos dos quatro afetados (GB06, GB07, GB76 e GB05) por síndrome de Usher e de sua mãe (GBCon07). O gene da clarina localiza-se próximo ao marcador molecular destacado em verde	50
5.3. Haplótipos dos quatro afetados (GB06, GB07, GB76 e GB05) por síndrome de Usher e de sua mãe (GBCon07). O gene da miosina 7A localiza-se próximo ao marcador molecular destacado em verde	51
5.4. Frequência da provável etiologia dos casos de surdez em Gado Bravo e Queimadas calculada pelo número de pacientes (a) e pelo número de probandos (b)	52
5.5. Frequência dos casos genéticos e seu possível mecanismo de herança. AR DFNB1 (Autossômico Recessivo com mutação detectada no locus DFNB1); AR Usher (Autossômico Recessivo em pacientes diagnosticados com Síndrome de Usher); AR Outros (Autossômico Recessivo com base na genealogia); AD (Autossômico Dominante); AD/Mito (Autossômico Dominante ou Mitochondrial); Lig ao X (Ligado ao X)	54

1. RESUMO

Os estados do Nordeste brasileiro concentram elevadas taxas de pessoas com deficiências, mas pouco se estudou a respeito de suas causas. O objetivo desse estudo foi determinar a prevalência da deficiência auditiva e estimar a contribuição dos fatores genéticos na sua etiologia nas populações de dois municípios do Nordeste brasileiro. Após indicação pelos agentes comunitários de saúde para avaliação clínico-genética, foram avaliados 182 indivíduos com perda auditiva manifestada antes dos 60 anos dos municípios de Gado Bravo (76 pacientes) e Queimadas (106 pacientes), com população de 8.376 e 41.049 habitantes, respectivamente. Em Queimadas, 13 pacientes eram homozigotos com a mutação c.35delG no gene *GJB2* (13/106, 12,2%; 6/81, 7,4% das famílias). Já em Gado Bravo, somente um paciente era homozigoto com esta mutação (1/76, 1,3%; 1/55, 1,8% das famílias). A mutação m.A1555G no gene mitocondrial *MTRNR1* e a mutação c.167delT no gene *GJB2* não foram detectadas em ambos os municípios. Quanto às deleções do *GJB6*, apenas a del(*GJB6*-D13S1854) foi encontrada em quatro casos em Gado Bravo (4/76, 5,3%; 2/55, 3,6% das famílias). Após o sequenciamento completo do gene *GJB2*, foi detectada a mutação p.W24X (c.G71A) em heterozigose em três casos isolados do município de Gado Bravo (3/76, 3,9%). Em resumo, mutações patogênicas no locus *DNFB1* foram encontradas em 16% (34/212) dos alelos testados no município de Queimadas e em 9,9% (15/152) dos alelos testados no município de Gado Bravo. No total da casuística, ocorreram 11 pacientes com uma única mutação recessiva detectada (monoalélica) no locus *DFNB1*. As amostras desses 11 pacientes foram submetidas à análise de MLPA na tentativa de identificar uma segunda mutação, do tipo variação do número de cópias, mas nenhuma mutação foi encontrada. O gene *SLC26A4* foi sequenciado em amostras de famílias com padrão de herança autossômico recessivo sem mutação detectada no locus *DFNB1*, que apresentaram ligação compatível por meio de microssatélites na região próxima a esse gene. Não foi detectada nenhuma mutação patogênica na região de código desse gene. Após o estudo de ligação por meio de *array* de SNPs e microssatélites em uma família com quatro afetados pela síndrome de Usher do município de Gado Bravo, o gene *CLRN1* apareceu como provável candidato e as amostras desses pacientes foram selecionadas para sequenciamento. Foi detectada a mutação p.Y63X em homozigose nos quatro pacientes. As amostras dos outros pacientes com essa síndrome também foram sequenciadas. Essa mutação foi encontrada em homozigose em 21 dos 23 casos de síndrome de Usher em Gado Bravo. A porcentagem de casos de surdez com provável etiologia genética em Gado Bravo e Queimadas foi estimada em 55% e 45%, respectivamente.

1.1. ABSTRACT

The states of the Brazilian Northeast concentrate high rates of people with disabilities, but little has been investigated about their causes. The aim of this study was to determine the prevalence of hearing impairment and estimate the contribution of genetic factors in its etiology in populations from two counties in the Northeast of Brazil. After indication from community health agents, 182 individuals were evaluated, presenting hearing loss before the age of 60 in the counties of Gado Bravo (76 patients) and Queimadas (106 patients), with populations of 8,376 and 41,049 inhabitants, respectively. In Queimadas, 13 homozygotes with the c.35delG mutation in the *GJB2* gene were found (13/106, 12.2%, 6/81, 7.4% of probands). As for Gado Bravo (N = 76), only one patient was homozygous with this mutation (1/76, 1.3%, 1/55, 1.8% of probands). The m.A1555G mutation in the mitochondrial gene *MTRNR1*, and the c.167delT mutation in the *GJB2* gene were not detected in both counties. As for *GJB6* deletions, only the del(*GJB6*-D13S1854) was found in four cases from Gado Bravo (4/76, 5.3%, 2/55, 3.6% of probands). After the complete sequencing of the *GJB2* gene, the p.W24X (c.G71A) mutation was detected in three isolated heterozygous cases of the Gado Bravo county (3/76, 3.9%). In two of these cases, the mutation was present along with a second recessive mutation in the *DNFB1* locus. In short, pathogenic mutations in the *DNFB1* locus were found in 16% (34/212) of the alleles tested in the county of Queimadas and 9.9% (15/152) of the alleles tested in the county of Gado Bravo. No pathogenic mutation was detected in the coding region of this gene. From all cases, there were 11 patients with a single recessive mutation detected (monoallelic) in *DNFB1* locus. Samples of these 11 patients were analyzed for MLPA in attempt to identify a second mutation, with copy number variation, but no mutation was found. The *SLC26A4* gene was sequenced in families samples with autosomal recessive hearing loss, with no mutation detected in the *DNFB1* locus, presenting compatible linkage utilizing microsatellites near this gene region. After linkage study using SNPs arrays and microsatellites in a family with four affected by the Usher syndrome in Gado Bravo, the *CLRN1* gene appeared as a candidate and samples of these patients were selected for sequencing. The p.Y63X mutation was detected in the homozygosis in the four individuals. Samples from other patients with this syndrome were also sequenced and this mutation was found in homozygosis 21 out of 23 cases of Usher syndrome in Gado Bravo. The percentage of cases with a probable genetic cause for hearing loss in Gado Bravo and Queimadas was estimated at 55% and 45%, respectively.

2. INTRODUÇÃO

Deficiência ou Perda Auditiva são termos utilizados para se referir a qualquer déficit ou comprometimento auditivo que acarrete limiares acima dos considerados normais. Já o termo “Surdez” implica em um déficit geralmente grave ou profundo (Smith e col., 2010). Neste trabalho, porém, os três termos serão utilizados intercambiavelmente, de modo semelhante a muitas publicações sobre surdez hereditária, visto que essa distinção nem sempre é feita na literatura sobre genética da surdez.

A deficiência auditiva atinge cerca de 278 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2010). A incidência de surdez nas populações está diretamente relacionada com a sua estrutura socioeconômica, variando as estimativas entre um a sete em cada mil nascidos vivos (Russo, 2000). Em países desenvolvidos, por exemplo, a incidência da perda auditiva é estimada, em média, em um ou dois a cada mil nascidos vivos (Morzaria e col., 2004). Em países emergentes, a prevalência de deficiência auditiva pode ser cerca de quatro vezes maior do que em países desenvolvidos, muito provavelmente devido aos fatores ambientais recorrentes, como as infecções (Braga e col., 1999; Russo, 2000). Foi estimado que, no Brasil, os fatores genéticos contribuem com cerca de 16% dos casos de deficiência auditiva, mas elas podem responder por até 60% das ocorrências em países desenvolvidos (Braga e col., 1999). No entanto, em virtude de modificações nas condições de saúde e transição epidemiológica, estima-se que possa ter havido uma redução da incidência da surdez no Brasil para valores ao redor de 2,5 a cada 1000 nascidos vivos em certas regiões (Chapchap e col., 2000; Bevilacqua e col., 2010).

As perdas auditivas podem ser classificadas segundo a manifestação clínica, a lateralidade, a idade de manifestação, a origem do defeito, as frequências atingidas, a gravidade da perda e a evolução. Uma classificação do grau de perda frequentemente usada é a sugerida por Davis e Silverman (1970) em que o grau da perda pode ser classificado em leve (entre 21 a 40dB), moderado (de 41 a 70dB), grave (de 71 a 90dB) e profundo (acima de 91dB). Considerando sua evolução, ela pode ser estacionária ou progressiva. Quanto à origem do defeito, a surdez pode ser classificada como condutiva, sensorineural ou mista. Surdez condutiva ocorre quando o defeito está na orelha externa e/ou média, afetando a condução do som até a orelha interna. Quando o defeito ocorre a partir da orelha interna até o encéfalo, é classificado genericamente como sensorineural. Há casos em que há uma combinação dos dois tipos de defeito, sendo a perda classificada como mista.

A surdez tem diferentes etiologias, podendo ser causada por fatores genéticos, ambientais ou ambos. Alguns dos fatores ambientais principais são os pré-natais, como as

infecções toxoplasmose, rubéola, citomegalovirose e herpes. Os fatores perinatais são frequentemente prematuridade, anoxia e hiperbilirrubinemia e os fatores pós-natais como o sarampo, meningite bacteriana e a caxumba também têm contribuição (Revisão em Smith e col., 2012). Drogas ototóxicas também podem causar perdas ambientais. Em países desenvolvidos, o principal fator ambiental que causa surdez é o citomegalovírus (Kenneson e Cannon, 2007). Em países subdesenvolvidos, os fatores de risco de maior frequência ainda são a rubéola durante a gestação e a hiperbilirrubinemia (Morzaria e col., 2004; Botelho e col., 2010).

A surdez genética é classificada também quanto à manifestação clínica, podendo ser não-sindrômica, quando a perda auditiva é o único defeito/distúrbio presente no indivíduo, ou sindrômica, quando ocorre a associação de perda auditiva com diferentes tipos de defeitos/distúrbios.

Existe um número grande de genes diferentes associados com o desenvolvimento da audição e, por isto, a genética da surdez é extremamente complexa. A complexidade em parte é devida à heterogeneidade de lócus, pois vários genes mutados podem causar surdez; ocorre também heterogeneidade alélica, pois mutações diferentes no mesmo gene causam surdez. Além disso, ocorre heterogeneidade de mecanismos de herança, pois diferentes mutações em um mesmo gene podem resultar em surdez de herança autossômica dominante ou recessiva. Ainda, alguns genes quando mutados podem causar surdez sindrômica ou não-sindrômica, como por exemplo, o gene *SLC26A4*, que dependendo do tipo da mutação, pode causar apenas surdez não-sindrômica ou também a síndrome de Pendred (Campbell e col., 2001; Revisão em Smith e col., 2012).

2.1. Surdez sindrômica

Mais de 400 síndromes já descritas apresentam como um dos sinais clínicos a perda auditiva (Gorlin e col., 1995). Apesar dessa heterogeneidade, a surdez sindrômica representa apenas 30% dos casos de surdez genética (Van Camp e col., 1997). Algumas das síndromes mais frequentes são as síndromes de Waardenburg, síndrome de Usher e síndrome de Pendred.

2.1.1. Síndrome de Waardenburg (OMIM #193500)

São descritos na literatura quatro tipos de síndrome de Waardenburg, sendo os mais frequentes os tipos I e II (SW1 e SW2) (OMIM, 2013). Essa síndrome afeta 1 a 2 em cada

100.000 pessoas, tem padrão de herança autossômico dominante e penetrância quase completa (Fraser, 1976; Revisão em Read e Newton, 1997). Os indivíduos com síndrome de Waardenburg apresentam dismorfismos faciais, defeitos de pigmentação no cabelo, pele e íris, e podem ter perda auditiva congênita de grau grave a profundo, associada ao quadro clínico. Dentre os dismorfismos faciais, os indivíduos podem apresentar telecanto (apenas no tipo I), podem apresentar heterocromia parcial ou total de íris, e também hipocromia de íris, de cor azul brilhante. Podem também apresentar pontos de hipopigmentação na pele e manchas brancas peculiares no cabelo (Shiono e col., 1969). Os indivíduos com síndrome de Waardenburg 2 apresentam os mesmos sinais clínicos do SW1, porém sem a presença do telecanto. Os indivíduos com síndrome de Waardenburg 3 apresentam telecanto e presença de defeitos nos membros superiores, também chamada de síndrome de Klein-Waardenburg (Gorlin e col., 1976). Os indivíduos com síndrome de Waardenburg 4, também conhecida como síndrome de Waardenburg-Shah, além das características clínicas de hipopigmentação de pele, íris e cabelo, possuem doença de Hirschsprung (Revisão em Read e Newton, 1997).

Os indivíduos com SW1 (com telecanto) geralmente são portadores de mutações no gene *PAX3*, localizado na região cromossômica 2q35. Os indivíduos com SW2 geralmente apresentam mutações no gene *MITF*, localizado entre as regiões cromossômicas 3p12.3 e 3p14.1. Até o momento, já foram descritas muitas mutações diferentes nos dois genes (Figura 2.1).

Figura 2.1. Participação dos genes já conhecidos na etiologia dos diferentes tipos de síndrome de Waardenburg. *Nos *boxes* correspondentes ao gene *SOX10*, também está incluído o gene *PCWH*. (Modificada de Pingault e col., 2010).

Outros genes estão relacionados à origem dos outros tipos de síndrome de Waardenburg, como, por exemplo, o gene *EDNRB*, nos casos de SW4 (Verheij e col., 2002).

2.1.2. Síndrome de Usher (OMIM #276900)

A síndrome de Usher é uma doença de herança autossômica recessiva, cujo diagnóstico é definido pela ocorrência concomitante de retinose pigmentar e perda auditiva sensorioneural. Essa síndrome é responsável por cerca de 50% dos casos de surdez associada à perda visual (Vernon, 1969). Indivíduos com essa síndrome apresentam cegueira noturna e perda de visão periférica na segunda década de vida, geralmente (Revisão em Smith e col., 2012). Estudos realizados nos Estados Unidos estimaram a prevalência de que um a cada seis mil indivíduos é afetado pela síndrome de Usher (Kimberling e col., 2010).

Essa síndrome é classificada em três subtipos (USH1, USH2 e USH3), sendo o tipo USH1 o mais frequente e geneticamente o mais heterogêneo. Os indivíduos classificados como USH1 apresentam perda auditiva congênita profunda, sensorioneural, defeitos/distúrbios vestibulares e surgimento da retinose pigmentar no início da adolescência (OMIM, 2013). O tipo USH2 é caracterizado clinicamente por perda auditiva congênita de leve a moderada, ausência de distúrbios vestibulares e surgimento da retinose pigmentar a partir da segunda década de vida. O tipo USH3 apresenta perda auditiva progressiva, deterioração progressiva das funções vestibulares e retinose pigmentar progressiva. Ambas as características podem ocorrer mais tardiamente em comparação aos tipos anteriores (Smith e col., 2012). Até o momento, já foram mapeados sete loci para USH1, três para USH2 e um locus para USH3; nove genes dos três subtipos já foram identificados (Jaworek e col., 2012). Todas as mutações detectadas até o momento no gene *MYO7A*, o mais importante dos genes, causam síndrome de Usher do tipo USH1 (Wei e col., 2012). O resumo das regiões mapeadas já descritas e dos genes identificados está apresentado na Tabela 2.1.

2.1.3. Síndrome de Pendred (OMIM #274600)

A síndrome de Pendred é um distúrbio de herança autossômica recessiva que apresenta como quadro clínico a perda auditiva de grau grave a profundo, geralmente congênita e não progressiva, associada a disfunções vestibulares, malformações nos giros internos da cóclea (displasia de Mondini), presença de aqueduto vestibular alargado (do inglês EVA, *Enlarged Vestibular Aqueduct*) e ocorrência de hipotireoidismo ou bócio no final da infância ou início da idade adulta. Na década de 60, a frequência de nascimentos de indivíduos com síndrome de Pendred foi estimada em 7,5% entre os casos de surdez congênita (Fraser, 1965).

Cerca de metade dos casos de síndrome de Pendred estão certamente relacionados a mutações no gene *SLC26A4* (Revisão em Smith e col., 2012), enquanto o segundo gene mais frequentemente relacionado é o *FOXI1*, responsável por ~1% dos casos (Yang e col., 2007).

Até o momento, mais de 170 mutações já foram descritas no gene *SLC26A4*, das quais mais de 90 causam Síndrome de Pendred (Guo e col., 2010; Pendred/BOR homepage, 2013). As demais podem causar perda auditiva de herança autossômica recessiva não-sindrômica (DFNB4) ou perda auditiva associada ao aqueduto vestibular alargado (EVA).

Tabela 2.1. Descrição dos tipos de síndrome de Usher, genes e proteínas já identificados até o momento. As informações da tabela foram obtidos nos portais: OMIM (2013), Ensemble (2013) e UCSC (2013).

Tipo	Localização	Posição	Extensão do locus	Gene	Proteína
USH1B	11q13.5	76,839,309-76,926,285	86,977 pb	<i>MYO7A</i>	Miosina VII A
USH1C	11p15.1	17,515,441-17,565,962	50,522 pb	<i>USH1C</i>	Harmonina
USH1D	10q22.1	73,156,690-73,575,703	419,014 pb	<i>CDH23</i>	Caderina 23
USH1E	21q21	16,400,000-31,500,000	15,100,001 pb	-	-
USH1F	10q21.1	55,562,530-56,561,050	998,521 pb	<i>PCDH15</i>	Protocaderina 15
USH1G	17q25.1	72,912,175-72,919,350	7,176 pb	<i>USH1G</i>	SANS
USH1H	15q22-q23	59,100,000-72,700,000	13,600,001 pb	-	-
USH1J	15q25.1	78,396,990-78,423,877	26,888 pb	<i>CIB2</i>	CIB2
USH1K	10p11.21-q21.1	34,400,000-61,200,000	26,800,001 pb	-	-
USH2A	1q41	215,796,235-216,596,737	800,503 pb	<i>USH2A</i>	Usherina
USH2B	3p23-24.2	-	-	-	-
USH2C	5q14.3	89,854,616-90,460,032	605,417 pb	<i>VLGR-1</i>	GPR98
USH2D	9q32	117,164,359-117,267,735	103,377 pb	<i>WHRN</i>	Whirlina
USH3A	3q25.1	150,643,949-150,690,785	46,837 pb	<i>CLRN1</i>	Clarina
USH3B	5q31.3	140,053,489-140,071,311	17,823 pb	<i>HARS</i>	Histidil RNA Sintetase

2.2. Surdez não-sindrômica

Cerca de 70% dos casos de surdez hereditária são não-sindrômicos (Keats e Berlin, 1999; Lefebvre e Van de Water, 2000). Desses casos, cerca de 75%~85% apresentam herança

autossômica recessiva (Rabionet e col., 2000; *Hereditary Hearing Loss Homepage*, 2013). Até o momento, já foram mapeados 95 loci autossômicos responsáveis por surdez recessiva e 42 genes já foram identificados (*Hereditary Hearing Loss Homepage*, 2013).

Já as deficiências auditivas não-sindrômicas de herança autossômica dominante representam 15% a 24% dos casos hereditários. Cinquenta e quatro loci de surdez dominante já foram mapeados e 27 genes foram identificados (*Hereditary Hearing Loss Homepage*, 2013); as de herança ligada ao cromossomo X correspondem somente 2% a 3% dos casos e as de herança mitocondrial atingem entre 1% a 2% dos indivíduos com surdez (Petit, 1996; Van Camp e col., 1997; Berry e col., 2000; Lefebvre e Van de Water, 2000; Van Laer e col., 1999; McGuirt e Smith, 1999; Abreu-Silva e col., 2006).

A genética da surdez não-sindrômica é complicada devido à enorme heterogeneidade alélica e de loci. Adicionalmente, diferentes mutações no mesmo gene (por exemplo o gene *GJB2*) podem causar surdez de herança autossômica dominante ou recessiva (*Connexin Deafness Homepage*, 2013).

São chamadas de loci as regiões cromossômicas que contêm um ou mais genes associados à surdez e que são mapeadas geralmente por estudos de ligação. Esses loci recebem a abreviação DFN, do inglês *DeaFNess*. Os DFN são classificados de acordo com o padrão de herança, sendo DFNA os loci associados à surdez autossômica dominante, DFNB os loci associados à surdez autossômica recessiva, e DFNX os associados à surdez ligada ao X. A numeração do loci é dada cronologicamente, ou seja, a partir da data do seu mapeamento. Por exemplo, o loci DFNB1 foi o primeiro loci mapeado associado à surdez recessiva (Guilford e col., 1994). Além disso, esse loci também é o mais importante, visto que mutações nos genes desse loci (*GJB2* e *GJB6*) explicam cerca de metade dos casos de surdez de herança autossômica recessiva (Rabionet e col., 2000).

2.2.1. Surdez de herança autossômica recessiva

A surdez de herança autossômica recessiva representa cerca de 80% dos casos de surdez não-sindrômica (Zelante e col., 1997). Configura-se em geral por a perda ser pré-lingual, sensorineural, atingir todas as frequências e ser estacionária. Os casos não-sindrômicos e de herança autossômica recessiva são os mais frequentes casos genéticos em estudos realizados em diferentes populações (Schrijver, 2004). Há alguns tipos de mutações em alta frequência em várias populações que causam surdez recessiva, o que torna o estudo molecular nesses casos exequível no panorama atual. Os métodos de diagnóstico molecular

recomendados nesses casos estão bem descritos e há razoável consenso em entre as estratégias utilizadas nos vários estudos (Batissoco e col., 2009; Brown e Rehm, 2012).

2.2.1.1. O locus DFNB1

Mapeado na região 13q11-q12, o locus DFNB1 é o mais frequentemente associado com perda auditiva de herança recessiva. Nele estão contidos os genes *GJB2* e *GJB6*, que codificam as proteínas Conexina 26 e Conexina 30, respectivamente (Kiang e col., 1997; Grifa e col., 1999). Mutações no gene *GJB2* representam cerca de 50% dos casos de surdez de herança recessiva (Estivill e col., 1998).

2.2.1.1.1. O gene *GJB2*

Em estudos relacionados à genética da surdez, é muito importante rastrear mutações no gene *GJB2* no locus DFNB1. O gene *GJB2* tem um único exon codificador e mais de 100 mutações distintas já foram descritas nessa região (Estivill e Gasparini, 2011). Esse gene codifica a proteína Conexina 26, componente das junções comunicantes (*gap junctions*), importantes em vários processos de transdução auditiva (transmissão do estímulo sonoro em elétrico) e troca de metabólitos entre as células de suporte (Mese e col., 2004). Mutações no gene *GJB2* alteram a função da Conexina 26, ocasionando deficiência na reciclagem de potássio na cóclea, o que se supõe acarretar a morte celular e consequentemente a perda auditiva (Rabionet e col., 2000). No entanto, outras funções da Conexina 26 no desenvolvimento da cóclea estão em estudo (Sun e col., 2009; Wang e col., 2009). A mutação mais frequente em várias populações do mundo, e também em amostras brasileiras, é a c.35delG (Oliveira e col., 2007; Batissoco e col., 2009; Manzoli e col., 2013).

O gene *GJB2* apresenta seis nucleotídeos guanosinas numerados de 30-35 na região codificadora no exon 2. A mutação descrita como c.35delG é uma deleção em uma das guanosinas dessa região e a mudança de matriz de leitura gera um códon de parada prematuro do tipo opala (UGA) poucas bases após a deleção, que resulta, em teoria, na tradução de uma proteína truncada de apenas 12 aminoácidos.

Até o momento, foram descritas 92 mutações de transmissão autossômica recessiva no gene *GJB2*, das quais 26 são mutações de matriz de leitura e 16 mutações de códon de parada prematuro. As demais são substituições de nucleotídeos. Poucas mutações de transmissão dominante foram identificadas até o momento (nove) (*Connexin Deafness Homepage*, 2013). Apesar do grande número de mutações detectadas na região codificadora do gene, somente

algumas delas apresentam elevada frequência e a sua frequência está diretamente relacionada a ancestralidade das diferentes populações. As mutações mais frequentes são a c.35delG, c.167delT, c.235delC, p.W24X (ou c.G71A) e p.R143W (ou c.T427C).

Para explicar a alta frequência de alelos patogênicos desse gene relacionados à surdez recessiva, foi proposta uma hipótese de possível vantagem do heterozigoto. Em um estudo sobre perda auditiva, foi observado que a epiderme de indivíduos homozigotos e heterozigotos com a mutação p.R143W (c.T427C) era significativamente mais espessa do que dos indivíduos da mesma família que não tinham essa mutação. Além disso, foi observado também que a concentração de sódio e cloro presentes no suor dos indivíduos com a mutação em homozigose eram maiores do que nos outros grupos. Foi especulado, então, que essa mutação induziria a criação de um meio desfavorável à colonização de micro-organismos, patógenos da epiderme, oferecendo uma maior proteção aos indivíduos com essa mutação (Man e col., 2007). Em um outro estudo, foi sugerido que indivíduos homozigotos para mutações que causam surdez no gene *GJB2* apresentavam resistência maior a infecção pela bactéria *Shigella flexneri* (Nhieu e col., 2003). Um terceiro estudo relacionou a morte celular com mutações nos genes *GJB2* e *GJB6*. Nesse estudo, foi verificado, *in vitro*, uma diminuição na morte de queratinócitos e de fibroblastos humanos que possuíam mutação recessiva em heterozigose nesses genes em comparação às células selvagens. Os autores dessa pesquisa sugeriram que os heterozigotos com mutações recessivas nesses genes poderiam ter uma vantagem seletiva em relação aos indivíduos sem mutações, relacionada à maior sobrevivência celular (Common e col., 2004).

2.2.1.1.2. O gene *GJB6*

Outro gene frequentemente investigado em estudos sobre surdez hereditária é o *GJB6*, presente no mesmo locus, DFNB1, e que codifica a Conexina 30, com função similar à Conexina 26 nas junções comunicantes. Os genes *GJB2* e *GJB6* estão na mesma região cromossômica 13q11-q12, situados um ao lado do outro. Vários pacientes apresentavam mutações recessivas em heterozigose no *GJB2*, sem que uma segunda mutação que explicasse o fenótipo fosse detectada. Hoje se sabe que grandes deleções no gene *GJB6* ocorrem, geralmente, combinadas a mutações recessivas no gene *GJB2* em indivíduos surdos. Foi verificado que essas deleções removem todo ou parte do gene *GJB6* ou regiões vizinhas, e acarretam surdez quando presente em homozigose ou em heterozigose composta com uma mutação recessiva no gene *GJB2* (del Castillo e col., 2002; del Castillo e col., 2005; del Castillo e col., 2009). Há vários estudos que corroboraram a hipótese da existência de uma

região regulatória que controla a expressão dos genes *GJB2* e *GJB6*, que é removida pelas deleções do *GJB6* (Wilch e col., 2010; Rodriguez-Paris e col., 2011).

O gene *GJB6* exibe poucas mutações de ponto que acarretam o fenótipo de surdez não-sindrômica. Até o momento, só foram descritas três mutações (c.C14T, c.63delG e c.A607G) que causam surdez não-sindrômica (*Connexin Homepage*, 2013; Battelino e col., 2012). A grande contribuição do *GJB6* na surdez genética se dá principalmente pelas grandes deleções encontradas na sua região codificadora ou regiões vizinhas a ela. Até o momento foram descritas cinco dessas deleções no gene *GJB6* ou nas regiões próximas a ele, sendo que apenas três dessas deletam o gene *GJB6* ou parte da sua região codificadora (Figura 2.2). No entanto, apenas duas delas, del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854), de 309 kb e 232 kb respectivamente, foram encontradas em maior frequência em populações europeias ou de descendentes de europeus (Feldmann e col., 2009).

Figura 2.2. Ilustração esquemática das cinco deleções região 13q11, onde se localiza o gene *GJB6* (as deleções estão desenhadas em vermelho). As deleções são: del(*GJB6*-D13S1830) de 309 kb, del(*GJB6*-D13S1854) de 233 kb, a grande deleção de mais de 920kb, a deleção de 131 kb e a deleção de 280kb (del Castillo e col., 2002; del Castillo e col., 2005; del Castillo e col., 2009; Feldmann e col., 2009; Wilch e col., 2006); Fonte da figura: Batissoco (2011).

As conexinas são proteínas integrantes da membrana plasmática que se hexamerizam para formar canais denominados de *conexons*. Cada conexon de uma célula se alinha no espaço extracelular ao da célula adjacente, formando um canal de junção comunicante. As conexinas 26 e 30 possuem quatro dominínios transmembrânicos (TM1, TM2, TM3 e TM4), duas alças extracelulares (EC1 e EC2) e uma alça citosólica (CL), além dos terminais amino (NT) e carboxila (CT) (Figura 2.3). As conexinas 26 e 30 possuem o maior grau de similaridade entre si, quando comparadas às outras, sendo esse valor calculado em 77% dos aminoácidos (Pallares-Ruiz e col., 2002).

Figura 2.3. Representação topológica e alinhamento das sequências da Connexina 26 e Connexina 30. Representação das cores: azul, positivo; vermelho, negativo; branco, hidrofóbico; verde, hidrofílico (Zonta e col., 2012).

Os genes *GJB2/GJB6* são expressos de forma tecido-específica, sendo os transcritos detectados principalmente na glândula mamária, orelha interna (cóclea e órgãos vestibulares), cérebro, folículo capilar e epiderme (Lautermann e col., 1999; Revisão em del Castillo e del Castillo, 2011). Na orelha interna, as Connexinas 26 e 30 são expressas principalmente nas células epiteliais e nos fibroblastos do órgão de Corti (Figura 2.4). A principal função na cóclea é a regulação da concentração de K^+ na endolinfa.

2.2.1.2. O locus DFNB4

Mapeado na região 7q22.3, o locus DFNB4 contém o gene *PDS*, também chamado de *SLC26A4*, que codifica a proteína pendrina. O gene possui 21 éxons, sendo o primeiro não codificador de aminoácidos. Até o momento, foram descritas mais de 150 mutações na região codificadora do gene, além de 16 mutações intrônicas que levam a defeitos de *splicing* com perda de função da proteína (Pendred/BOR homepage, 2013).

O carreador de soluto SLC26A4 é uma proteína transmembrânica que pertence à família de proteínas permutadoras, com a previsão de ser composta por 12 domínios transmembrânicos, que tem como função realizar trocas de cloreto, iodeto, bicarbonato e formato (Everett e col., 1997; Cai e Lytton, 2004). A proteína pendrina possui peso molecular

auditiva, ainda não é viável economicamente realizar uma triagem molecular de rotina em casos de herança dominante, no panorama nacional. A perda de audição caracteriza-se geralmente como pós-lingual, progressiva e dependente da idade.

Os loci mapeados para surdez de herança autossômica dominante recebem o nome de DFNA. Até o momento, 54 loci foram mapeados e 27 genes foram identificados (*Hereditary Hearing Loss Homepage*, 2013).

2.2.3. Surdez de herança mitocondrial

A surdez hereditária de herança mitocondrial geralmente resulta de mutações em genes relacionados à síntese proteica mitocondrial. Geralmente a manifestação clínica é similar a das formas com herança autossômica dominante, na qual a perda auditiva acomete tardiamente os indivíduos, mas pode haver maior variação na idade de manifestação do quadro. Cerca de 1~2% dos casos genéticos de perda auditiva são relacionados a mutações em alguns genes mitocondriais. A primeira mutação descrita e a mais frequente é a m.A1555G, que ocorre no gene *MTRNR1* (Prezante e col., 1993), que transcreve uma molécula de RNA ribossômico mitocondrial, a subunidade 12S do RNAr.

A mutação m.A1555G é a mais frequente dentre as mutações mitocondriais que causam surdez. Entre os caucasianos, essa mutação foi encontrada na frequência de 0,5~2% dos casos (Abreu-Silva e col., 2006; Kokotas e col., 2007). A mutação m.A1555G apresenta uma particularidade relacionada à sensibilidade aos antibióticos aminoglicosídeos. Quando é administrado esse tipo de medicamento em pacientes com essa mutação, a perda auditiva se instala precocemente. Essa e outras mutações no gene mitocondrial *MTRNR1* aumentam a susceptibilidade à perda de audição em decorrência dos aminoglicosídeos (Guan e col., 2000). Essa perda ocorre muito provavelmente devido à mudança da estrutura secundária da subunidade 12S do RNAr acarretada por mutações nesse gene. Tal mudança gera uma conformação de RNAr diferente da selvagem, que mais se assemelha ao 16S RNAr bacteriano, que é o alvo da ação dos antibióticos aminoglicosídeos (Guan e col., 2000).

Outros genes relacionados a surdez mitocondrial já foram descritos, como por exemplo o *MTTSL* e *MTTL1*, porém mutações nesses genes explicam apenas uma pequena fração dos casos de perda auditiva (Van den Ouweland e col., 1992; Reid e col., 1994; Uehara e col., 2010).

2.3. Epidemiologia genética da surdez

Os estudos sobre surdez de caráter genético-epidemiológico são de extrema importância do ponto de vista da saúde pública. Várias populações em todo mundo já foram estudadas em relação aos aspectos genéticos e epidemiológicos da surdez e também têm se tornado frequentes os estudos de várias amostras em um mesmo país (Norouzi e col., 2011). No Brasil, poucos estudos foram realizados e a grande maioria se concentra na região Sudeste do país (Cordeiro-Silva e col., 2011).

Os estudos voltados à epidemiologia genética apresentam resultados difíceis de comparar em virtude das peculiaridades de critério de seleção de pacientes em cada pesquisa. Em teoria, os estudos devem se referir claramente ao grupo de estudo, se são apenas pacientes com perda auditiva pré-lingual não-sindrômica, se são crianças não-sindrômicas com surdez pré-lingual e pós-lingual ou se são apenas casos de surdez de herança autossômica recessiva não-sindrômica. Deve-se também deixar em evidência se a seleção dos casos para estudo está relacionada à gravidade da perda auditiva, se há parentesco entre casos ou se houve seleção de casos familiares ou isolados. É mandatório separar os resultados da amostra constituída por casos familiares ou da constituída por casos isolados, pois resultados de triagem de mutações em estudos familiares sempre apresentam frequências superiores às encontradas em estudos realizados com casos isolados (Revisão em del Castillo e del Castillo, 2011).

O estudo da epidemiologia genética da surdez ainda é muito complicado devido a enorme heterogeneidade de genes e alelos em diferentes populações, principalmente quando se trata de estudos relacionados à surdez de herança autossômica recessiva não-sindrômica (del Castillo e del Castillo, 2011). Em geral, esses estudos epidemiológicos rastreiam principalmente as mutações no locus DFNB1, por ser esse o mais frequentemente relacionado a surdez em várias populações. Dentro dos critérios pré-estabelecidos, é aconselhável que não se contabilizem os indivíduos heterozigotos sem uma segunda mutação recessiva encontrada no locus DFNB1 como casos certamente genéticos. Em relação ao tipo das mutações detectadas, o assunto é complexo pois até hoje a patogenicidade de algumas mutações ainda não é certa, o que influencia a interpretação dos resultados. Outros fatores como a ancestralidade da composição da população do estudo e tamanho populacional também devem ser tratados com atenção (del Castillo e del Castillo, 2011).

Mutações no locus DFNB1 são certamente as mais frequentemente relacionadas à perda auditiva (Zelante e col, 1997; Denoyelle e col., 1997; OMIM, 2013; *Connexin Homepage*, 2013) e estão distribuídas em vários países no mundo (del Castillo e del Castillo, 2011; Petersen e Willems, 2006). As mutações de maior frequência em várias populações são

as que afetam o gene *GJB2* (Petersen e Willems, 2006). No Brasil, a frequência de mutações no locus DFNB1 entre pacientes surdos varia de 1% a 18,2% (Piatto e col., 2004; Pfeilsticker e col., 2006; Oliveira e col., 2007; Batissoco e col., 2009; Cordeiro-Silva e col., 2011; Castro e col., 2013; Esteves e col., 2013; Manzoli e col., 2013).

A mutação c.35delG é a mais frequente associada à perda auditiva em quase todo o mundo, sendo cerca de 50% dos casos de perda auditiva de herança autossômica recessiva atribuídos a essa mutação (Estivill e col., 1998). Supõe-se que essa mutação se originou entre 10~14 mil anos atrás, na região do mediterrâneo, muito provavelmente na região que hoje se encontra o país do Irã (Norouzi e col., 2011). Acredita-se que por volta de 10 mil anos atrás, essa mutação teria chegado à Europa pela região onde hoje estão a Grécia e a Itália e teria se difundido para toda Europa ocidental e oriental (Kokotas e col., 2010).

A frequência da mutação c.35delG em homozigose em pacientes surdos varia de 10% a 63% em estudos de várias populações (Gasparini e col., 2000; Gualandi e col., 2002; Feldmann e col., 2004; Samanich, e col., 2007) e, em estudos brasileiros, a frequência variou de 1,3% a 15,2% em amostras de probandos com surdez não-sindrômica (Piatto e col., 2004; Pfeilsticker e col., 2006; Oliveira e col., 2007; Batissoco e col., 2009; Cordeiro-Silva e col., 2011; Castro e col., 2013; Esteves e col., 2013; Manzoli e col., 2013). Esses estudos foram realizados com pacientes surdos atendidos em clínicas ou unidades de aconselhamento genético voltados ao atendimento da surdez, em exceção de um estudo, que foi realizado em parceria com os Agentes Comunitários de Saúde, que indicaram os casos de perda auditiva presentes no município (Manzoli e col., 2013).

Outras mutações encontradas no gene *GJB2* e com alta frequência em determinados grupos populacionais também são alvos de estudos de epidemiologia genética da surdez.

A mutação c.167delT é a mais frequente em judeus *ashkenazi* (Zelante e col., 1997). Ela ocorre em heterozigose em até 4% dos indivíduos ouvintes desse grupo. Em outras populações, essa mutação é muito rara, ou frequentemente ausente (Morell e col., 1998).

A mutação c.235delC é uma mutação que se apresenta em alta frequência em populações asiáticas. A frequência de heterozigotos, entre ouvintes, em japoneses, chineses e coreanos é estimada em 1% (Yan e col., 2003). Essa mutação possui baixa frequência ou está ausente em outras populações.

A mutação p.W24X (ou c.G71A) é a mais frequente em populações indianas e no grupo dos Romani, que são indianos que vivem em grupos na Europa e que mantêm a tradição de casamentos consanguíneos entre os membros. A frequência de heterozigotos entre ouvintes varia de 0 a 26% nesse grupo populacional (Minárik e col., 2003).

A mutação p.R143W (ou c.T427C) foi encontrada pela primeira vez em algumas famílias com repetição de casos de surdez em Gana, no Oeste africano (Brobbly e col., 1998). Essa mutação também é a mais frequente em outros países africanos e em afro-descendentes. No entanto, em alguns países africanos ela não foi detectada (Gasmelseed e col., 2004).

A frequência dos heterozigotos com a mutação c.35delG entre ouvintes foi estimada em várias populações do mundo e esse valor variou de 0 a 3,92% (Mahdieh e Rabbani, 2009). Em um estudo realizado com recém-nascidos não selecionados pela perda auditiva no Brasil, foi estimada a frequência da mutação c.35delG em quatro regiões do país. Os dados foram obtidos por meio de amostragem de algumas cidades (ou as vezes apenas uma) de cada região. As frequências de heterozigotos observadas por região foram: Norte – 2,1%; Nordeste – 0,8%; Sudeste 1,6%; e Sul – 1,2% (Oliveira e col., 2007). Por essa mutação ser mais frequente em populações européias e descendentes de europeus (Rabionet e col., 2000), esperava-se elevada frequência de heterozigotos nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, devido ao grande número de imigrantes europeus nessa região, em comparação com as regiões Norte e Nordeste. No entanto, não se detectaram diferenças significativas, talvez porque a amostra de pacientes das regiões Norte e Nordeste vieram do serviço privado de saúde, cuja ancestralidade pode ser diferente da população em geral (Oliveira e col., 2007). Em um estudo realizado em regiões do Brasil, com amostras de brasileiros descendentes de africanos (da cidade de Salvador, BA), de europeus e asiáticos (não há relato da região de obtenção dessas duas amostras), foram observadas as frequências de heterozigotos com c.35delG em 2%, 1% e 0, respectivamente (Oliveira e col., 2004). Em três estudos realizados entre recém-nascidos não selecionados por problemas de audição, foram verificadas as frequências de 0,97%, 2,24% e 0,94% de heterozigotos com a mutação c.35delG (Sartorato e col., 2000; Piatto e col., 2005; Nivoloni e col., 2010). Estudos de caráter genético e epidemiológico da surdez em amostras de populações do Nordeste do Brasil são necessários devido a escassez de informações sobre a região.

As perdas auditivas causadas por fatores genéticos e ambientais requerem políticas públicas específicas preventivas. Dos estudos que tratam da genética da surdez no Brasil, apenas um estudo tentou classificar a perda auditiva dos pacientes quanto a possível etiologia, atribuindo cerca de 35% dos casos a causas provavelmente genéticas (Batissoco e col., 2009). Em virtude da elevada frequência de casos de surdez na nossa população e da recente disponibilidade de testes moleculares para detecção das diversas formas hereditárias, a identificação de famílias com alto risco de repetição da condição pode ser estratégia importante de prevenção da ocorrência da deficiência auditiva.

Qualquer estratégia de prevenção requer conhecimentos epidemiológicos e compreensão da contribuição dos diferentes tipos de fatores etiológicos. Portanto, o objetivo geral desse projeto é determinar a frequência da deficiência auditiva, estimar a contribuição dos fatores genéticos na sua etiologia em duas populações do Nordeste brasileiro e analisar aspectos da efetividade da aplicação de uma estratégia genético-populacional de prevenção de surdez.

Idealmente, a identificação de famílias com alto risco de repetição da surdez seguida de aconselhamento genético eficaz pode resultar em estratégias de planejamento familiar capazes de reduzir a recorrência de deficiência auditiva.

A estimativa da real contribuição dos fatores genéticos na etiologia da deficiência auditiva, em estudo de base populacional, pode vir a contribuir para avaliação do impacto da introdução de testes genéticos em populações maiores. Essas estimativas não podem ser realizadas em amostras colhidas de serviços de aconselhamento genético por causa do viés do encaminhamento preferencial de casos familiares ou idiopáticos para estudo genético nesses serviços. Vale ressaltar que foram poucos estudos de base populacional realizado no território nacional que tenham procurado estimar a importância dos casos genéticos na deficiência auditiva da população.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

O objetivo dessa pesquisa foi determinar a prevalência da deficiência auditiva e estimar a contribuição dos fatores genéticos na sua etiologia em duas populações do Nordeste brasileiro.

3.2. Objetivos específicos

Para atingir o objetivo principal, foram executadas as seguintes etapas:

- a) Levantamento de todos os indivíduos que apresentavam perda auditiva, indicados pelos Agentes Comunitários de Saúde (ACSs), nos municípios de Queimadas e Gado Bravo (PB);
- b) Determinação da frequência, na população amostrada, da mutação c.35delG no gene da Conexina 26 (*GJB2*);
- c) Determinação da frequência de outras mutações frequentes que causam surdez nos genes *GJB2* e *GJB6* e da mutação mitocondrial m.A1555G, nas mesmas populações;
- d) Realização de estudos de ligação com microssatélites ligados ao gene *SLC26A4*, da pendrina, nas famílias com provável surdez de herança recessiva em que não foram identificadas as mutações descritas acima. Essa análise foi seguida de sequenciamento do gene *SLC26A4* nos casos com segregação compatível.
- e) Obtenção da estimativa da fração dos casos com etiologia provavelmente genética nessas populações, com base no histórico genético e clínico dos afetados e nos resultados dos estudos moleculares.

4. METODOLOGIA

4.1. Casuística

Foi realizado um estudo transversal com base no método do informante, por meio dos Agentes Comunitários de Saúde (ACSs), nos municípios de Queimadas e Gado Bravo, localizados na Região Metropolitana de Campina Grande, no estado da Paraíba, que possuem 41.054 e 8.376 habitantes, respectivamente (IBGE, 2010). O critério de seleção dos municípios foi por conveniência. São municípios próximos de Campina Grande, de fácil acesso, e cujas secretarias de saúde já tinham parcerias estabelecidas com pesquisadores da Universidade Estadual da Paraíba (Figura 4.1). Além disso, no município de Queimadas havia relato de uma família com tradição de casamentos consanguíneos e com vários indivíduos apresentando perda auditiva. Quanto a Gado Bravo, havia relatos de que nesse município havia grande número de surdos. A pesquisa foi realizada inicialmente em parceria com a Secretaria de Saúde dos municípios de Queimadas e Gado Bravo e os profissionais do Programa Saúde da Família (PSF). Os ACS indicaram as famílias em que ocorriam indivíduos com deficiência auditiva.

Figura 4.1. Mapa do estado da Paraíba. Os municípios que participaram do estudo estão em vermelho.

Todos os indivíduos indicados pelos ACS e que afirmaram ter perda auditiva foram incluídos no estudo. Todos foram convidados a ser submetidos à avaliação audiométrica para confirmação do diagnóstico. Foram excluídos os indivíduos que relataram ter apresentado primeiros sintomas de deficiência auditiva a partir de 60 anos. Além disso, um paciente do

município de Queimadas foi excluído da amostra pois o exame audiológico apresentou normoacusia bilateral.

A casuística foi constituída de 182 pacientes com perda auditiva, sendo 106 pertencentes a 81 famílias residentes no município de Queimadas e 76 pertencentes a 55 famílias residentes em Gado Bravo. A população do Nordeste, incluindo a do estado da Paraíba, é triétnica, visto que a ancestralidade dos indivíduos é geneticamente composta por contribuições de europeus (portugueses em maioria), africanos e indígenas.

Todos os afetados foram convidados a participar da pesquisa que compreendeu: (a) uma entrevista com base em roteiro estruturado (ficha de anamnese de surdez, que incluiu o levantamento e o desenho da genealogia; Anexo I); (b) coleta de material biológico (sangue periférico) para estudo genético-molecular; e (c) avaliação audiológica. Essas etapas foram realizadas em dependências das secretarias de saúde dos municípios, no formato de mutirão, com datas pré-agendadas com a população atendida.

Todas as etapas da pesquisa em campo foram acompanhadas, organizadas e coordenadas pela Profa. Dra. Silvana Santos do Núcleo de Estudo em Genética e Educação – NEGE, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB. A coleta do material de pesquisa foi realizada entre março de 2011 até fevereiro de 2012.

Em Queimadas foram coletadas amostras de sangue dos 106 indivíduos. Em Gado Bravo, foram colhidas 76 amostras. Foram colhidos cerca de 10 ml de sangue periférico de cada participante, para extração de DNA.

4.2. Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual da Paraíba (**Parecer 0357.0.133.133-11**). O projeto também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Seres Humanos (**Protocolo nº 126/2011**) – **FR. 458729** do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Todos os procedimentos foram realizados após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II).

Todos os pacientes atendidos receberam um relatório com resultados dos exames realizados e orientação em relação aos riscos de recorrência da deficiência auditiva na sua família. O aconselhamento genético e as ações de educação genética comunitária foram oferecidos pela Dra. Regina Célia Mingroni Netto da Universidade de São Paulo e pela Profa. Dra. Silvana Santos, da Universidade Estadual da Paraíba.

4.3. Avaliação audiológica e da visão

Para a realização dos exames audiológicos, foi estabelecida parceria com os Profs. Drs. Marine Raquel Diniz da Rosa, Wagner Teobaldo Lopes de Andrade e Hannalice Gottschalck Cavalcanti, do Departamento de Fonoaudiologia da Universidade Federal da Paraíba, que realizaram os exames nos pacientes do município de Queimadas. Os exames audiológicos dos pacientes de Gado Bravo foram realizados pela fonoaudióloga Cintia Potter, da Secretaria de Saúde do mesmo município.

Inicialmente, os sujeitos foram submetidos à avaliação otoscópica (inspeção visual do meato acústico externo) para detecção de possíveis obstruções que interferissem no resultado do exame. Esta inspeção, no entanto, não se configurou como critério de exclusão para a realização da avaliação auditiva.

O exame foi realizado por meio de audiômetros (marca *Interacoustics*), com o uso de fones supra-aurais (TDH39). Nesse exame, determinou-se a intensidade mínima (limiar auditivo) em que o paciente conseguia identificar, por via aérea, a presença de tons puros nas frequências de 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 6000 e 8000Hz, sendo considerado como padrão de normalidade o limiar auditivo igual ou inferior a 25dB. Se verificados limiares superiores a 25dB, o sujeito foi submetido à pesquisa dos limiares por via óssea, por meio de vibrador ósseo (B71) nas frequências de 500, 1000, 2000, 3000 e 4000Hz, para o topodiagnóstico da lesão. Foi utilizada a técnica descendente de testagem (intensidade sonora inicial mais alta e, à medida que o sujeito refere escutar, a intensidade é diminuída). Para tal, o sujeito foi instruído a responder através do ato mecânico de levantar a mão, todas as vezes que ouvisse o estímulo sonoro, mesmo que em intensidade baixa.

Todos os pacientes do município de Gado Bravo que relataram ter perdas visuais graves (N=33) foram convidados a fazer o teste de fundoscopia. A ação foi realizada no dia 04/08/2012 no município de Gado Bravo. Os exames foram realizados em 21 pacientes.

O exame de fundo de olho (fundoscopia) foi realizado por meio de oftalmoscopia direta, pelo Prof. Dr. Sabino Guimarães, oftalmologista da Universidade Federal de Campina Grande, em pacientes de Gado Bravo. Esse exame foi realizado por causa da frequência elevada de síndrome de Usher no município. Nos casos de suspeita clínica dessa síndrome, a confirmação da ocorrência de retinose pigmentar é fundamental.

O exame de fundoscopia foi realizado com a finalidade de verificar a presença de sinais sugestivos de retinose pigmentar, como papila atrófica ou pálida, atenuação dos vasos, atrofia de coroide e acúmulo de pigmentos.

4.4. Genealogias

Com base nas entrevistas realizadas, utilizando o roteiro semi-estruturado (Anexo II), foram desenhadas as genealogias da família dos pacientes com perda auditiva. Os heredogramas foram posteriormente redesenhados utilizando o programa Cyrillic 2.10.

4.5. Análises moleculares

4.5.1. Extração de DNA e iniciadores (*primers*)

O DNA de amostras de sangue de cerca de 5 ml foi extraído utilizando-se o aparelho *Autopure LS* da Gentra Systems, disponível no Centro de Estudos do Genoma Humano. A concentração de DNA de cada amostra foi posteriormente medida com o auxílio de um espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, da Thermo Scientific) e uma alíquota foi diluída em água *milli-Q* autoclavada com a finalidade de obterem-se amostras de DNA com concentração entre 100 e 200ng/ μ L.

A Tabela 4.1 mostra as sequências dos *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos contendo as mutações estudadas.

Tabela 4.1. Genes, mutações, *primers* para amplificação e referências bibliográficas.

Gene	Mutação	Primers 5'-3'	Referência
<i>GJB2</i>	c.35delG	F - GCT GGT GGA GTG TTT GTT CAC ACC CGC R - TCT TTT CCA GAG CAA ACG GC	del Castillo e col., CP*
	c.167delT	F - GTG TTG TGT GCA TTC GTC TTT TC R - ACC TTC TGG GTT TTG ATC TCC TC	Zelante e col. (1997)
<i>GJB6</i>	del(<i>GJB6</i> -D13S1830)	F - AGG GCA TGA TTG GGG TGA TTT R - CAT GCG TAG CCT TAA CCA TTT T	del Castillo e col. (2003)
	del(<i>GJB6</i> -D13S1854)	F - TCA TAG TGA AGA ACT CGA TGC TGT TT R - CAG CGG CTA CCC TAG TTG TGG T	del Castillo e col. (2005)
	Fragmento controle de amplificação	F - CGT CTT TGG GGG TGT TGC TT R - CAT GAA GAG GGC GTA CAA GTT AGA A	del Castillo e col., CP*
<i>MTRNR1</i>	m.A1555G	F - GCT CAG CCT ATA TAC CGC CAT CTT CAG CAA R - CCA GTA CAC TTA CCA TGT TAC GAC TGG	Estivill e col. (1998)

*CP = Comunicação Pessoal

4.5.2. Análise da mutação c. 35delG no gene *GJB2*

A mutação foi detectada após reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de digestão do DNA com enzima de restrição *BstNI* (Wilcox e col., 2000). A reação de PCR foi feita sob as seguintes condições: volume final de 25 μ L, cerca de 100 ng de DNA, 0,2 μ M de

cada *primer* (Tabela 4.1), 200 μ M de cada dNTP, 10% do volume final de tampão confeccionado no Laboratório de Genética Humana, 1U de Taq DNA Polimerase. Para a amplificação foi utilizada uma ciclagem *touch down*, na qual é feita uma desnaturação inicial a 95° C por 5min, seguida por desnaturação a 94°C por 45s, hibridação por 45s a 69°C, extensão a 72°C por 1min, repetição em 10x com -1°C por ciclo, a partir da segunda etapa, desnaturação a 95° por 45s, hibridação a 57° por 45s, extensão a 72° por 1min; depois seguem mais 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, hibridação a 57°C por 40s e extensão a 72°C por 1min e extensão final a 72° por 10min.

A digestão do produto da PCR foi realizada com 10 unidades da enzima e o produto foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e visualizado após coloração por impregnação com nitrato de prata (Santos e col., 1993). A digestão com essa enzima origina dois fragmentos de restrição (69pb e 87pb) na amostra dos indivíduos heterozigotos com essa mutação, um fragmento de 87pb na amostra dos indivíduos homozigotos com mutação e apenas uma banda de 69pb em amostras de indivíduos sem a mutação.

4.5.3. Análise da mutação c. 167delT no gene *GJB2*

A mutação foi detectada após reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de digestão do DNA com enzima de restrição *PstI* (Zelante e col., 1997). A reação de PCR foi feita sob as seguintes condições: volume final de 25 μ L, cerca de 100ng de DNA, 0,2 μ M de cada *primer* (Tabela 4.1), 200 μ M de cada dNTP, 10% do volume final de tampão confeccionado no Laboratório de Genética Humana, 1U de Taq DNA Polimerase. Para a amplificação foi utilizada uma ciclagem *touch down*, na qual é feita uma desnaturação inicial a 94° C por 4min, seguida por 14 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, hibridação por 40s que se inicia a 69°C no 1° ciclo e termina a 62°C no 14° ciclo, e extensão a 72°C por 1min; depois seguem mais 24 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, hibridação a 62°C por 40s e extensão a 72°C por 1min.

A digestão do produto da PCR foi realizada com 10 unidades da enzima e o produto foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e visualizado após coloração por impregnação com nitrato de prata (Santos e col., 1993). A digestão com essa enzima origina quatro fragmentos de restrição (150pb, 138pb, 69pb e 68pb) na amostra dos indivíduos sem a mutação; origina cinco fragmentos (219pb, 150pb, 138pb, 69pb e 68pb) em amostras de heterozigotos com essa mutação e três fragmentos (219pb, 138pb e 68pb) nos homozigotos com mutação.

4.5.4. Análise das deleções del(*GJB6-D13S1830*) e del(*GJB6-D13S1854*)

As mutações foram detectadas após reação em cadeia da polimerase (PCR) específica para essas deleções (del Castillo e col., 2005). A reação de PCR foi feita sob as seguintes condições: volume final de 25µL, cerca de 100ng de DNA, 0,2µM de cada *primer* (Tabela 4.1), 200 µM de cada dNTP, 10% do volume final de tampão confeccionado no Laboratório de Genética Humana, 1U de Taq DNA Polimerase. Para a amplificação foi utilizada uma ciclagem *touch down*, na qual é feita uma desnaturação inicial a 95°C por 5min, seguida por desnaturação a 94°C por 45s, hibridação por 45s a 69°C, extensão a 72°C por 1min, repetição em 10x com -1°C por ciclo, a partir da segunda etapa, desnaturação a 95° por 45s, hibridação a 57° por 45s, extensão a 72° por 1min; depois seguem mais 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, hibridação a 57°C por 40s e extensão a 72°C por 1min e extensão final a 72° por 10 min. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose a 2% após coloração com SyBr Safe (*Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Todos os indivíduos amplificam uma banda controle de 333pb. Os indivíduos com a del(*GJB6-D13S1830*), além da banda controle, amplificam uma banda de 460pb. Os indivíduos com a deleção del(*GJB6-D13S1854*) amplificam, além da controle, uma banda de 564pb.

4.5.5. Análise da mutação m.A1555G no gene *MTRNR1*

A mutação foi detectada após reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de digestão do DNA com enzima de restrição *Hae* III (Estivill e col., 1998). A reação de PCR foi feita sob as seguintes condições: volume final de 25µL, cerca de 100ng de DNA, 0,2µM de cada *primer* (Tabela 4.1), 200µM de cada dNTP, 10% do volume final de tampão confeccionado no Laboratório de Genética Humana, 1U de Taq DNA Polimerase. Para a amplificação foi utilizada uma ciclagem *touch down*, na qual é feita uma desnaturação inicial a 94°C por 4min, seguida por 14 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, hibridação por 40s que se inicia a 69°C no 1° ciclo e termina a 62°C no 14° ciclo, e extensão a 72°C por 1min; depois seguem mais 24 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, hibridação a 62°C por 40s e extensão a 72°C por 1min.

A digestão do produto da PCR foi realizada com 10 unidades da enzima e o produto foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e visualizado após coloração por impregnação com nitrato de prata (Santos e col., 1993). A digestão com essa enzima origina dois fragmentos de restrição (216pb e 123pb) na amostra dos indivíduos sem a mutação m.A1555G e três fragmentos (173pb, 123pb e 43pb) em amostras de portadores da mutação.

4.5.6. Análise de microssatélites

As famílias com repetição de casos de perda auditiva na irmandade (com pais ouvintes) ou com afetados nascidos de casamento consanguíneo (de provável herança autossômica recessiva), após a exclusão das mutações descritas anteriormente, foram selecionadas para estudo de ligação por meio de microssatélites mapeados próximos ao gene da pendrina. Na Tabela 4.2 estão contidas as informações quanto aos marcadores moleculares e os *primers* para sua amplificação. O marcador molecular D7S2459 é intragênico, localizado no íntron 11 do gene *SLC26A4*.

Para os estudos de ligação, a estratégia foi amplificar os fragmentos polimórficos dos cinco marcadores de microssatélites (Tabela 4.2), ligados ao gene *SLC26A4*, previamente descritos nos bancos de dados (<http://genome.ucsc.edu/> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), com exceção do marcador D7S799. No caso desse marcador, foi utilizado o *primer forward* descrito no banco de dados e o *primer reverse* foi redesenhado utilizando a ferramenta de bioinformática *PRIMER 3* (<http://primer3.sourceforge.net/>).

Tabela 4.2. Microssatélites próximos ao gene da pendrina, *primers* para amplificação e posição no genoma.

Marcadores	<i>Primers</i>	Posição (pb)	Unidade de Repetição
D7S2420	F- CCTGTATGGAGGGCAAACCTA R- AAATAATGACTGAGGCTCAAAACA	106889928- 106890211	Dinucleotídeo
D7S496	F- AACAAACAGTCAACCCACAAT R- GCTATAACCTCATAATAAACCAAAA	107154713+ 107154849	Dinucleotídeo
D7S2459	F- AAGAAGTGCATTGAGACTCC R- CCGCCTTAGTAAACCC	107331501+ 107331642	Dinucleotídeo
D7S2456	F- CTGGAAATTGACCTGAAACCTT R- ACAGGGGTCTCTCACACATATTA	107683218- 107683460	Dinucleotídeo
D7S799	F- CTTTTTAATTGTGATGAGCC R- TAATTGTAGGGTTACATGCAGTTAT	108608397- 108608795	Dinucleotídeo

Quatro afetados com síndrome de Usher de uma mesma irmandade tiveram suas amostras submetidas ao estudo de ligação por meio de microssatélites próximos à região de dois genes candidatos, o gene *CLRN1* e o gene *MYO7A*. Esses genes estão localizados em regiões que mostraram valores elevados de *LOD Scores* após análise do resultado da varredura genômica por *array* de SNPs. Para estudo de ligação dessas regiões, foram selecionados 22 marcadores moleculares (microssatélites) próximos aos gene da clarina e ao

gene da miosina 7A, utilizando-se o *kit* “ABI PRISM® Linkage Mapping Set v. 2.5-MD10” da Applied Biosystems (*Foster City, CA, USA*). O *primer forward* correspondente a cada marcador molecular é marcado com fluorescência. Os marcadores moleculares utilizados próximos ao gene *CLRN1*, localizados no cromossomo 3, foram: D3S1566, D3S3681, D3S1271, D3S1278, D3S1267, D3S1292, D3S1569, D3S1279, D3S1614, D3S1262 e D3S1580. Os marcadores moleculares utilizados próximos ao gene *MYO7A* foram: D11S904, D11S935, D11S905, D11S4191, D11S987, D11S1314, D11S937, D11S4175, D11S898, D11S908 e D11S925.

Para um volume final de 10µL contendo 30ng de DNA total, foram utilizados 0,5µM de cada *primer*; 1,5U de Taq polimerase (*Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*), 240µM de cada dNTP e 10% do volume final de tampão confeccionado no Laboratório de Genética Humana [25 mM MgCl₂; 300 mM TRIS pH = 8,5 e 100mM KCl, 100mM Hepes (N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico), 100mM (NH₄)₂SO₄]. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 12 min, 11 ciclos de desnaturação a 94°C por 15s, hibridação a 55°C por 15s, extensão a 72°C por 30s, 21 ciclos de desnaturação a 89°C por 15s, hibridação a 54°C por 15s, extensão a 72°C por 30s e extensão final a 72°C por 10 min. 1µL do produto da reação de microsatélite foi diluído em 19µL de água estéril e 1µL do produto diluído foi misturado a 9µL de formamida Hi-Di (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*) e 0,1µL de GeneScan – 500 LIZ Size Standard (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*).

Os fragmentos polimórficos foram submetidos à eletroforese em capilar por meio do aparelho *ABI 3730 DNA Analyzer* (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*) e analisados por meio do *software Genemapper* (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*).

4.5.7. Varredura genômica por meio de *microarrays* de SNPs

A varredura genômica foi realizada por meio de hibridação das amostras de DNA dos pacientes de uma família com afetados pela síndrome de Usher com “chips” de 50K, ou seja, 50.000 SNPs (*GeneChip® Human Mapping K Array Hind 240* e *GeneChip® Human Mapping K Array Xba 240*, *Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA*). O DNA original foi diluído a concentração de 50ng/µl. Após esse processo, 5µl desse DNA foi fragmentado por meio do uso de uma enzima de restrição (*HindII*). Em seguida, foi feita uma reação de ligação onde um adaptador sintético foi ligado às pontas não coesivas dos fragmentos digeridos. Utilizando um único par de *primers*, que se liga ao adaptador sintético, amplificaram-se os fragmentos digeridos e após a PCR, o produto foi purificado. Após a quantificação do DNA purificado

(concentração superior a 1300ng/μl), realizou-se então uma segunda etapa de fragmentação (por meio de uma DNase I) do produto de PCR, para a obtenção de fragmentos de DNA com tamanho entre 205 a 1000 pb. Por último, as extremidades desses fragmentos de DNA foram marcadas com fluoróforos. Desse modo, quando é feita a leitura do “chip” são verificados os padrões diferentes de fluorescência que resultam da hibridação dos fragmentos marcados ao “chip”, dependendo do alelo que o indivíduo apresenta em cada SNP. Seguiu-se exatamente o protocolo do fabricante para a realização desses experimentos (*Uniscience website; GeneChip Mapping 10K 2.0 Assay Manual*).

A interpretação dos resultados foi feita em um leitor *Genechip 3000 Scanner* (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA) e os resultados foram interpretados por *softwares* adequados (*GeneChip Operating Software*).

4.5.8. Cálculos de *LOD scores*

O resultado da determinação dos genótipos em relação aos SNPs da varredura genômica foi analisado para obtenção de *LOD scores* de múltiplos pontos.

O programa Alohomora foi utilizado para converter os dados de genótipos obtidos da plataforma *Affymetrix* (Santa Clara, CA, EUA) em arquivos adequados para análise de ligação. O programa foi escrito na linguagem Perl/Tk e os dados foram executados no sistema operacional *Windows*. O programa *Pedcheck* foi usado para verificação de erros de segregação mendeliana (Ruschendorf e Nurnberg, 2005). O programa Merlin (Abecasis e col., 2002) foi utilizado para a obtenção de *LOD scores* de múltiplos pontos. Os *LOD scores* de múltiplos pontos resultam da análise de segregação de vários marcadores polimórficos de um mesmo segmento cromossômico simultaneamente em relação à doença. As frequências dos alelos dos marcadores foram consideradas iguais a 1/N, sendo o N o número de alelos daquele marcador encontrado na família em questão. Os *LOD scores* foram calculados utilizando-se frequência gênica do alelo mutado de 0,0001; admitimos também que a taxa de recombinação é semelhante em ambos os sexos e que a taxa de mutação do gene é zero, visto que esses parâmetros não alteram os resultados finais.

4.5.9. Sequenciamento do DNA

A confirmação da presença das mutações descritas anteriormente e a busca de outras mutações no gene da Conexina 26, no caso de indivíduos heterozigotos, foi feita por meio de sequenciamento do gene *GJB2*. Também foram sequenciadas em relação a esse gene as

amostras de probandos de famílias com surdez de provável herança recessiva ou dominante. Foram utilizados dois pares de *primers* para o sequenciamento desse gene. Os *primers* utilizados para sequenciamento do primeiro fragmento do *GJB2* foram 5'-3' F- ACC TGT TTT GGT GAG GTT GTG T e R- ACC TTC TGG GTT TTG ATC TCC TC. Para o segundo fragmento desse mesmo gene, foram utilizados os *primers* 5'-3' F- GGA AGT TCA TCA AGG GGG AGA e R- TGA GCA CGG GTT GCC CTC ATC.

Foram submetidas ao sequenciamento do gene *SLC26A4* amostras de pacientes em que o padrão de segregação dos microssatélites na família era compatível com ligação à pendrina. Os *primers* para amplificação dos 20 exons codificadores do gene da pendrina encontram-se listados na Tabela 4.3.

Foram submetidas ao sequenciamento do gene *CLRN1* amostras de indivíduos com síndrome de Usher. Alguns *primers* foram desenhados a partir do *software* Primer3, enquanto outros foram obtidos pelos já descritos na literatura (Adato e col., 2002; Garcia-Garcia e col., 2012). Os *primers* estão descritos na Tabela 4.4.

O sequenciamento dos genes *GJB2*, *SLC26A4* e *CLRN1* iniciou-se pela PCR, na qual *primers* específicos a exons de cada gene foram adicionados e utilizados na sua amplificação.

Para amplificação dos exons 2, 3, 6, 7 e 8, 9, 10, 11 e 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 20 do gene *SLC26A4*, do exon 2 do *GJB2* e dos éxons 0, 1, 3a, 3b e 3c da *CLRN1* foi utilizada uma sequência de ciclos *touch down*, na qual é feita uma desnaturação inicial a 95° C por 4min, seguida por 11 ciclos de desnaturação a 95° C por 45s, hibridação por 45s que se inicia a 67° C no 1° ciclo e termina a 57° C no 11° ciclo, e extensão a 72° C por 1min; depois seguem mais 31 ciclos de desnaturação a 95° C por 45s, hibridação a 57° C por 45s e extensão a 72° C por 1min e por fim, uma extensão final de 72°C por 10 min. Para um volume final de 25µL, contendo 50ng a 100ng de DNA total, foram utilizados 0,48µM de cada “*primer*”; 1 U de Taq polimerase (*Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*); 2,5 mM MgCl₂; 30 mM TRIS pH = 8,5 e 10 mM KCl, 10mM Hepes (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico), 10mM (NH₄)₂SO₄; 0,2 mM de cada dNTP (*Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*).

Tabela 4.3. Éxons do gene da Pendrina, *primers* para amplificação e referência bibliográfica dos *primers*.

Gene	Éxon	Primers 5'-3'	Referência
SLC26A4	2	F -GGCTGCAGCTAACAGGTGATC R -GACTTTCGGTCTCCGGTCCTC	Lofrano-Porto e col., 2008
	3	F - ACAGTTCTTGGCAAAAGCATGG R - GTGACAGATGGTTGCTTACCCTTC	Everett e col., 1997
	4	F - GGAACCATTGTAAGTTGAGGA R - TCATGTTTAAAGTGTTTTGGC	Lofrano-Porto e col., 2008 Scott e col., 2000
	5	F - CTCAGCTTCTTTTCGTGAACAAAC R - ACAAAGTAATTTTCCTGGAACCCAAA	Lofrano-Porto e col., 2008
	6	F -GTGCTATAGGCAGGCTACTAGTGTT R -ATTCTCTGAGTCTGGGCCAGG	Lofrano-Porto e col., 2008
	7 e 8	F - TGGGAAGATTTCATATGAGAATTGATTG R - TGTGATCTGGAAGAAACAACCA	Lofrano-Porto e col., 2008
	9	F - CATGTGAAATGGCATGGATGG R - GGTTGGATTCTTTACCAGACC	Lofrano-Porto e col., 2008
	10	F - CGCAGAGTAGGCATGGGAGTTT R - GCACCGAGCTTAGCAGGACAA	Lofrano-Porto e col., 2008
	11 e 12	F - ATCCAGTGAGCTGGAAGACA R - GTGCTTTGGGAAGTCCAGAG	Programa Primer3
	13	F - AGGTAGTTATCACATGATGGTACCTG R - ATGTCCTCTACTGCTGTGCTC	Lofrano-Porto e col., 2008
	14	F - AAACACCAGAATGATGGGCTC R - GATCCAGTGCACCTTCTGAC	Lofrano-Porto e col., 2008
	15	F - CTGCTACCCAGCTCCTCTGA R - CTTCCCTTTGTGTAGGGCAA	Programa Primer3
	16	F -ACCCTTTGAGAAATAGCCTTTCCAG R -TTATAGGCAAGCGGGAGTGG	Lofrano-Porto e col., 2008
	17	F -GGAACAGTGTGTAGGTCTTTTGG R -TGTGGGTTGTCCAGTATTGC	Programa Primer3
	18	F -TGAATGCTACTGAATTATGGGC R -CCGTAAGCCCTTTCTCCTATCT	Programa Primer3 Scott e col., 2000
	19	F -TTTCTTAGCTGGGCATGGTAGG R -AAATGGCAAACATTACACAAGTC	Lofrano-Porto e col., 2008
	20	F -AGAAGCACCAGGAAAGCTTCA R -GAAGTGTGAGGGAACATAATTCCC	Lofrano-Porto e col., 2008
	21	F -ACACCTAAGATGAGTAGCAGTAAGCA R -CATTGACTATTTCTTCAGACTCAAA	Programa Primer3

Para a amplificação dos exons 4, 5, 18 e 19 do gene *SLC26A4* foi utilizada uma sequência de ciclos *touch down*, na qual é feita uma desnaturação inicial a 94° C por 4min, seguida por 15 ciclos de desnaturação a 94° C por 30s, hibridação por 40s que se inicia a 67° C no 1° ciclo e termina a 60° C no 15° ciclo, e extensão a 72° C por 1min. Depois seguem mais 25 ciclos de desnaturação a 94° C por 30s, hibridação a 60° C por 40s e extensão a 72° C por 1min. Para um volume final de 25µL, contendo 50ng a 100ng de DNA total, foram utilizados 0,48µM de cada *primer*; 1 U de Taq polimerase (Invitrogen); 2,5 mM MgCl₂; 30

mM TRIS pH = 8,5 e 10 mM KCl, 10mM Hepes (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico), 10mM (NH₄)₂SO₄; 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen).

Tabela 4.4. *Primers* utilizados para o sequenciamento dos exons do gene *CLRN1*.

Gene	Éxons	Primers 5'-3'	Referência
<i>CLRN1</i>	0	F – TCCCATTTGCTCACAAAGGTCTTGTTTTG R – ATTCTCTGCAACACTGGGAA	Garcia-Garcia e col., 2012
	1	F – TCACTATCTGAACTATCTTGTGT R – AAGCCCTGAACTTTATAGG	Adato e col., 2002
	2	F – CTTGCAGACTACTGCTAATGAAAC R – TTGAGCAAGTGTGGTATTTC	Programa Primer3
	3-a	F – CTTCCCTGTCCCTTACAATCAG R – CCACATCTAAAAGTGACCAAAGC	Programa Primer3
	3-b	F – GTAGCTGCAGATCTAATGTAC R – GTCAAGCAATTTCACCAG	Garcia-Garcia e col., 2012
	3-c	F – AAGTATACTCTTAGGCCAGGC R – CCTTTGTGGCTAGACTGAATT	Garcia-Garcia e col., 2012

Para a amplificação do exon 21 do gene *SLC26A4* foi utilizada uma sequência de ciclos na qual foi feita uma desnaturação inicial a 95°C por 5min, seguida por 31 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, hibridação a 57,3°C por 40s, e extensão a 72°C por 1min e por fim, uma extensão final a 72°C por 10min. Para um volume final de 25µL, contendo 50ng a 100ng de DNA total, foram utilizados 0,48µM de cada “*primer*”; 1U de Taq polimerase (Invitrogen); 2,5mM MgCl₂; 30mM TRIS pH = 8,5 e 10mM KCl, 10mM Hepes (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico), 10mM (NH₄)₂SO₄; 0,2mM de cada dNTP (Invitrogen) e DMSO a 10%.

Para amplificação do éxon 2 do gene *CLRN1* foi utilizada uma sequência de ciclos *touch down*, na qual é feita uma desnaturação inicial a 95° C por 4min, seguida por 11 ciclos de desnaturação a 95°C por 45s, hibridação por 45s que se inicia a 67°C no 1° ciclo e termina a 57°C no 11° ciclo, e extensão a 72°C por 1min; depois seguem mais 31 ciclos de desnaturação a 95°C por 45s, hibridação a 57°C por 45s e extensão a 72°C por 1min e por fim, uma extensão final de 72°C por 10 min. Para um volume final de 25µL, contendo 50ng a 100ng de DNA total, foram utilizados 0,48µM de cada “*primer*”; 1U de Taq polimerase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); 2,5 mM MgCl₂; 30 mM TRIS pH = 8,5 e 10mM KCl, 10mM Hepes (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico), 10mM (NH₄)₂SO₄; 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para amplificação dos éxons 1 e 2 do mesmo gene, foi utilizado uma sequência de ciclos *touch down*, na qual é feita uma desnaturação inicial a 94°C por 4min, seguida por 35 ciclos de

desnaturação a 94°C por 30s, hibridação por 1min que se inicia a 54,8°C no 1º ciclo e termina a 72°C no último ciclo, e extensão a 72°C por 1min e por fim, uma extensão final de 72°C por 10min. Para um volume final de 25µL, contendo 50ng a 100ng de DNA total, foram utilizados 0,48µM de cada “*primer*”; 1U de Taq polimerase (*Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*); 2,5 mM MgCl₂; 30mM TRIS pH = 8,5 e 10mM KCl, 10mM Hepes (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico), 10mM (NH₄)₂SO₄; 0,2 mM de cada dNTP (*Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*).

O produto da PCR (4 µL) foi purificado com 2,5U da enzima *Exonuclease I* (*USB-Affymetrix*) e 0,5U da enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase* (*USB-Affymetrix*), incubado a 37°C por 1h e posteriormente submetido a uma temperatura de 80°C por 15min para a inativação das enzimas.

Para um volume final de reação de sequenciamento de 10µL foram utilizados 1µL de *BigDye Terminator v1.1, v3.1 5X Sequencing Buffer* (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*), 1µL de *BigDye Terminator v3.1 Cycle* (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*), 0,7µM do primer, 3µL do produto da PCR já purificado e 4,3µL de água estéril.

Após a reação de sequenciamento, os produtos foram submetidos a segunda purificação, dessa vez com *AutoSeq96 Dye Terminator Clean-up* (*GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido, Inglaterra*), segundo instruções do fabricante.

O produto da reação foi analisado pelo equipamento *ABI 3730 DNA Analyzer* da *Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA)* do Centro de Estudos do Genoma Humano (IBUSP) e os resultados analisados por meio de dois *softwares*, *Chromas Lite* e *MEGA5* (<http://chromas-lite.softpedia.com/>; <http://www.megasoftware.net/>).

4.5.10. Técnica de MLPA

A técnica de MLPA foi aplicada nas amostras dos pacientes que apresentaram apenas uma única mutação recessiva em heterozigose após triagem inicial de mutação nos genes *GJB2/GJB6* e do sequenciamento do gene *GJB2*. Também foi aplicada em amostra de paciente com surdez com padrão de herança ligado ao X. Para esse estudo, foi utilizado o *kit* comercial SALSA P163-D1 *GJB-WFS1* (MRC Holland, 2012) contendo sondas que hibridam em 18 genes específicos relacionados com surdez, incluindo *GJB2*, *GJB6* e um gene de surdez de herança ligada ao X (*POU3F4*). Os produtos de amplificação foram obtidos de acordo com as instruções do fabricante e submetidos à eletroforese em capilar por meio do aparelho *ABI 3730 DNA Analyzer* (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*). Os resultados foram analisados no *software Gene Marker* (<http://www.softgenetics.com/GeneMarker.html>).

Na análise dos resultados, as alturas dos picos de fluorescência de cada sonda, referentes a cada indivíduo, foram normalizadas de modo a indicar um valor que permitisse estimar o número de cópias do gene desse indivíduo. Os dados foram normalizados da seguinte forma:

- 1- Normalização intra-amostra: a altura do pico referente ao produto da amplificação de uma sonda de um indivíduo foi dividida pela média das alturas dos picos de todas as sondas do mesmo indivíduo testado.
- 2- Normalização final: o valor obtido na normalização intra-amostra foi dividido pela média das alturas dos picos referentes à mesma sonda de todas as amostras controle. O valor obtido nessa divisão foi utilizado para estimar o número de cópias.

Valores abaixo de 0,7 foram considerados como indicativos de deleção, e valores acima de 1,3 como indicativos de duplicação do gene. Espera-se que indivíduos com número normal de cópias para um determinado gene apresentem valor próximo de 1,0.

Foram utilizados cinco pacientes normais como controle para o teste em cada bateria de reações de MLPA. As amostras controle utilizadas pertencem ao banco de controles do Laboratório de Genética Humana do Instituto de Biociências da USP. Foram utilizados três controles do sexo masculino e dois do sexo feminino.

5. RESULTADOS

5.1. Informações populacionais sobre os municípios estudados

Os dados apresentados na Tabela 5.1 foram obtidos a partir dos portais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (IBGE, 2010; PNUD, 2000). Também foram apresentados os dados sobre número de habitantes da zona urbana e rural (transformados em %) dos dois municípios.

Tabela 5.1. Dados geodemográficos, socioeconômicos e indivíduos amostrados dos dois municípios da pesquisa.

Dados Demográficos/Municípios	Gado Bravo	Queimadas
População (habitantes)	8.376	41.049
Densidade Demográfica (hab/km ²)	43,53	102,17
Residentes da Zona Urbana (%)	10,8	54,2
Pacientes da Zona Urbana (%)	11,9	36,8
Residentes da Zona Rural (%)	89,2	45,8
Pacientes da Zona Rural (%)	88,1	63,2
IDH	0,527	0,613
PIB Per Capita (Reais)	3.881,80	4.832,45
Número total de surdos residentes no município	85 (1,01%)	150 (0,37%)
Número de amostras coletadas	76 (89,4%)	106 (70,7%)
Pacientes surdos amostrados em relação à população do município	0,91%	0,26%

5.2. Caracterização da casuística

O resumo do resultado das avaliações audiométricas da casuística, tanto das avaliações realizadas pela equipe quanto das avaliações já disponíveis previamente, está apresentado na Tabela 5.2.

Foi estimada a frequência de consanguinidade entre os pais de indivíduos surdos. No município de Gado Bravo há relato de consanguinidade (1º, 2º ou 3º grau) entre os pais de propósitos em 12 das 55 famílias (21,8%) e no município de Queimadas, em 23 das 81 famílias (28,4%).

Tabela 5.2. Resumo dos resultados dos exames audiológicos.

Municípios		Gado Bravo (N=76)	Queimadas (N=106)
Pacientes com avaliação audiológica		45 (59,2%)	88 (83,1%)
Lateralidade	Unilateral	0	3 (3,4%)
	Bilateral	45 (100%)	85 (96,6%)
Idade de manifestação	Pré-lingual	22 (48,9%)	50 (56,8%)
	Pós-lingual	20 (44,4%)	35 (39,8%)
	Sem informação	3 (6,7%)	3 (3,4%)
Grau da perda	Leve-Moderada	9 (20%)	22 (25%)
	Grave-Profunda	36 (80%)	66 (75%)

5.3. Resultados do estudo molecular

Os resultados de todos os testes moleculares relacionados aos genes *GJB2/GJB6* e a mutação mitocondrial m.A1555G encontram-se nos Anexos 1 (Queimadas e Gado Bravo). As frequências das mutações encontradas no total da casuística dos dois municípios são mostradas na Tabela 5.3. As frequências de probandos com as mutações listadas na Tabela 5.3 são mostradas na Tabela 5.4.

Tabela 5.3. Frequência de mutações detectadas nos genes *GJB2*, *GJB6* e *MTRNR1* no total dos indivíduos dos dois municípios da pesquisa.

Genes	Mutações	Municípios		Gado Bravo		Queimadas	
				Homozigose	Heterozigose	Homozigose	Heterozigose
<i>GJB2</i>	c.35delG			1/76 (1,3%)	6/76 (7,9%)	13/106 (12,2%)	8/106 (7,5%)
	c.167delT			0/76	0/76	0/106	0/106
	p.W24X (c.G71A)			0/76	3/76 (3,9%)	0/106	0/106
<i>GJB6</i>	del(<i>GJB6</i> -D13S1830)			0/76	0/76	0/106	0/106
	del(<i>GJB6</i> -D13S1854)			0/76	4/76 (5,3%)	0/106	0/106
<i>MTRNR1</i>	m.A1555G			0/76	0/76	0/106	0/106

Tabela 5.4. Frequência de mutações detectadas nos genes *GJB2*, *GJB6* e *MTRNR1* entre os probandos dos dois municípios da pesquisa.

Genes	Mutações	Municípios		Gado Bravo		Queimadas	
				Homozigose	Heterozigose	Homozigose	Heterozigose
<i>GJB2</i>	c.35delG			1/55 (1,8%)	3/55 (5,5%)	7/81 (8,6%)	7/81 (8,6%)
	c.167delT			0/55	0/55	0/81 (0%)	0/81
	p.W24X (c.G71A)			0/55	3/55 (5,5%)	0/81 (0%)	0/81
<i>GJB6</i>	del(<i>GJB6</i> -D13S1830)			0/55	0/55	0/81 (0%)	0/81
	del(<i>GJB6</i> -D13S1854)			0/55	2/55 (3,6%)	0/81 (0%)	0/81
<i>MTRNR1</i>	m.A1555G			0/55	0/55	0/81 (0%)	0/81

Entre os 106 pacientes do município de Queimadas, detectamos 13 pacientes homozigotos em relação a mutação c.35delG no gene *GJB2* (13/106, 12,2%; 7/81 ou 8,6%

das famílias) e oito pacientes com a mesma mutação em heterozigose (8/106, 7,5%; 7/81 ou 8,6% das famílias). Não foi encontrado indivíduo com a mutação m.A1555G no gene mitocondrial *MTRNR1*. Porém, uma variante não patogênica identificada como c.T1291C foi encontrada em três pacientes de famílias diferentes (3/106, 2,8%) (Abreu-Silva e col., 2006a; Abreu-Silva e col., 2006b). Não foi encontrado paciente com deleções do gene *GJB6* ou com a mutação c.167delT do *GJB2* (Tabela 5.3).

Dos 76 pacientes de Gado Bravo que foram submetidos ao estudo molecular, detectamos um paciente homozigoto em relação à mutação c.35delG (1/76, 1,3%; 1/55 ou 1,8% das famílias) e seis pacientes heterozigotos com a mesma mutação (6/76, 7,9%; 3/55 ou 5,5% das famílias). Também não foi encontrado indivíduo com a mutação patogênica m.A1555G no gene mitocondrial *MTRNR1*. Quanto às deleções do *GJB6*, apenas a del(*GJB6*-D13S1854) foi encontrada em quatro casos (4/76, 5,3%; 2/55 ou 3,6% das famílias). A deleção del(*GJB6*-D13S1830) do gene *GJB6* e a mutação c.167delT do *GJB2* não foram encontradas nessa casuística. O sequenciamento completo do gene *GJB2* em amostras de pacientes desse município permitiu identificar a mutação patogênica, descrita como p.W24X (c.G71A), em três casos isolados do município de Gado Bravo (3/76, 3,9%; 3/55 ou 5,5% das famílias). Nenhuma outra mutação patogênica foi detectada por meio do sequenciamento do gene *GJB2* em ambos os municípios (Tabela 5.3).

Mutações no locus DNFB1 foram encontradas em 15% (32/212) dos alelos no município de Queimadas e em 9,9% (15/152) dos alelos no município de Gado Bravo. No gene *GJB2*, apenas a mutação c.35delG foi detectada na amostra de Queimadas (100% das mutações). Mutações no gene *GJB2* foram responsáveis por 73,3% (11/15) do total de mutações detectadas em Gado Bravo. Dessas mutações, a c.35delG foi responsável por 53,3% (8/15) dos casos, a mutação p.W24X estava presente em 20% (3/15); a deleção del(*GJB6*-D13S1854) do gene *GJB6* estava presente em 26,7% (4/15) das mutações detectadas nesse município.

Na Tabela 5.5 estão descritas as frequências das mutações nos genes *GJB2*, *GJB6* e *MTRNR1*, mas apenas incluindo os probandos com surdez não-sindrômica.

O resultado da frequência dos genótipos identificados no total de indivíduos está apresentado na Tabela 5.6. O mesmo resultado, porém calculado em relação ao número de probandos, está apresentado na Tabela 5.7.

Tabela 5.5. Frequência de mutações detectadas nos genes *GJB2*, *GJB6* e *MTRNR1* nas famílias dos municípios da pesquisa com surdez não-sindrômica.

Genes	Mutações	Municípios		Queimadas	
		Gado Bravo		Homozigose	Heterozigose
<i>GJB2</i>	c.35delG	1/44 (2,3%)	3/44 (6,8%)	7/76 (9,2%)	7/76 (9,2%)
	c.167delT	0/44	0/44	0/76	0/76
<i>GJB6</i>	p.W24X (c.G71A)	0/44	3/44 (6,8%)	0/76	0/76
	del(<i>GJB6</i> -D13S1830)	0/44	0/44	0/76	0/76
<i>MTRNR1</i>	del(<i>GJB6</i> -D13S1854)	0/44	2/44 (4,5%)	0/76	0/76
	m.A1555G	0/44	0/44	0/76	0/76

Tabela 5.6. Frequência dos genótipos encontrados nos indivíduos dos dois municípios da pesquisa.

Genótipos identificados	Nº de pacientes com o genótipo na casuística total		Nº de pacientes com o genótipo dentre o total de genótipos com mutação patogênica	
	Queimadas	Gado Bravo	Queimadas	Gado Bravo
c.35delG/c.35delG	13/106 (12,2%)	1/76 (1,3%)	13/21 (61,9%)	1/9 (11,1%)
c.35delG/N	8/106 (7,5%)	1/76 (1,3%)	8/21 (38,1%)	1/9 (11,1%)
c.35delG/del(<i>GJB6</i> -D13S1854)	0/106	3/76 (3,9%)	0/21	3/9 (33,3%)
c.35delG/p.W24X (c.G71A)	0/106	2/76 (2,6%)	0/21	2/9 (22,2%)
del(<i>GJB6</i> -D13S1854)/N	0/106	1/76 (1,3%)	0/21	1/9 (11,1%)
p.W24X (c.G71A)/N	0/106	1/76 (1,3%)	0/21	1/9 (11,1%)

Tabela 5.7. Frequência dos genótipos encontrados entre os probandos dos dois municípios da pesquisa.

Genótipos identificados	Nº de pacientes com o genótipo na casuística total		Nº de pacientes com o genótipo dentre o total de genótipos com mutação patogênica	
	Queimadas	Gado Bravo	Queimadas	Gado Bravo
c.35delG/c.35delG	7/81 (8,6%)	1/55 (1,8%)	13/14 (61,9%)	1/7 (14,3%)
c.35delG/N	7/81 (8,6%)	1/55 (1,8%)	8/14 (38,1%)	1/7 (14,3%)
c.35delG/del(<i>GJB6</i> -D13S1854)	0/81	1/55 (1,8%)	0/14	3/7 (42,9%)
c.35delG/p.W24X (c.G71A)	0/81	2/55 (3,6%)	0/14	2/7 (28,6%)
del(<i>GJB6</i> -D13S1854)/N	0/81	1/55 (1,8%)	0/14	1/7 (14,3%)
p.W24X (c.G71A)/N	0/81	1/55 (1,8%)	0/14	1/7 (14,3%)

Após o sequenciamento do gene *GJB2* da amostra de pacientes dos dois municípios, foram detectadas quatro mutações descritas na literatura como não patogênicas (-34T>C, -15C>T, -6C>T e 79G>A) (*Connexin Homepage*, 2013).

No total da casuística, restaram 11 pacientes com uma única mutação recessiva detectada no locus DFNB1, sendo três do município de Gado Bravo e oito do município de Queimadas (Tabela 5.6). Dentre esses 11 casos, a mutação c.35delG em heterozigose estava presente em nove casos (9/11, 81,8%), p.W24X (c.G71A) em heterozigose estava presente em um caso (1/11, 9,1%) e a del(*GJB6*-D13S1854) do gene *GJB6* em heterozigose estava presente em um caso (1/11, 9,1%). As amostras desses 11 pacientes foram submetidas à análise de MLPA na tentativa de identificar uma segunda mutação, que poderia ser uma deleção ou duplicação. Além disso, mais dois pacientes foram selecionados para estudo por meio dessa técnica porque pertenciam a família de surdez com provável herança ligada ao X. O kit de MLPA P163-D1 *GJB-WFS1* detecta variação do número de cópias em genes relacionados a surdez de herança autossômica, mas também apresenta sondas que hibridam em gene de surdez localizado no cromossomo X (*POU3F4*). Nenhum dos 13 pacientes exibiu variação de número de cópias dos genes após a realização da técnica de MLPA.

5.3.1. Resultado dos microssatélites e sequenciamento do gene *SLC26A4*

Famílias de pacientes com surdez de provável herança autossômica recessiva e que tiveram resultados negativos no estudo de mutações nos genes *GJB2*, *GJB6* e *MTRNR1* foram submetidas ao estudo de ligação com microssatélites mapeados como próximos ao gene da pendrina, *SLC26A4*. Quarenta e nove pacientes de 24 famílias foram selecionados e submetidos a esses testes. Dentre essas 24 famílias, em nove os propósitos eram casos isolados, filhos de casais ouvintes e consanguíneos. Nas demais 15 famílias, havia mais de um indivíduo com surdez na irmandade, nascidos de pais normais. O resultado da análise dos microssatélites nessas famílias está apresentado no Anexo 4.

Em duas das famílias, **Fam6** (de Gado Bravo) e **Fam13** (de Queimadas), com dois afetados em cada, e em um caso de paciente filho de consanguíneos (**Fam22**, do município de Queimadas), o resultado da segregação dos microssatélites foi considerado compatível com a hipótese de ligação ao gene da pendrina. Portanto, esse gene foi sequenciado nesses pacientes (N=5) e nenhum apresentou mutação patogênica na região de código do gene. Além disso, foram encontrados dois polimorfismos de base única no íntron 2 (rs2248464, IVS2 129 A>T; rs2248465, IVS2 123 C>T), classificados como não patogênicos, em três dos cinco pacientes.

Um dos três pacientes era homozigoto em relação aos dois polimorfismos. Os outros dois pacientes eram heterozigotos em relação aos dois polimorfismos.

5.4. Estudo da surdez sindrômica

Dos 182 pacientes da casuística, 29 pacientes (16%) apresentaram outros sinais clínicos associados à perda auditiva e, portanto, foram classificados clinicamente como sindrômicos. Desses pacientes, 24 eram residentes no município de Gado Bravo e cinco no município de Queimadas.

Dos pacientes sindrômicos do município de Gado Bravo, um (1/24, 4,2%) era portador da Síndrome de Waardenburg I. Esse paciente apresentava surdez bilateral profunda, telecantho, sinofre, hipocromia de íris de cor azul brilhante e também uma mancha branca frontal peculiar no cabelo. A amostra desse paciente foi submetida a sequenciamento do gene *PAX3* e uma mutação patogênica ainda não descrita (c.C790T; p.Q263X), que gera um códon de parada, foi detectada no éxon 5. Essa análise foi feita pela aluna de mestrado do programa de Genética e Biologia Evolutiva, Magnólia Bocangel.

Dos 30 pacientes convocados para o exame de fundoscopia, dezessete tiveram o exame realizado no âmbito da pesquisa. Desses 17 pacientes, foi confirmada a presença de retinose pigmentar em 14 casos. Os seis pacientes que não compareceram ao exame de fundoscopia apresentavam dificuldade visual e tinham ao menos um indivíduo na irmandade com laudo confirmando a retinose pigmentar. Por isso, esses pacientes também foram considerados, para efeito da pesquisa, como afetados pela síndrome de Usher. No total, 23 pacientes foram diagnosticados como afetados pela síndrome de Usher (23/24, 95,8%).

Em Queimadas, cinco pacientes foram classificados como sindrômicos: três deles tinham retardo mental (3/5, 60%), um deles era portador de polineuropatia (1/5, 20%) e o último possuía diagnóstico prévio de retinose pigmentar, tendo sido, portanto, diagnosticado com síndrome de Usher (1/5, 20%).

5.5. Resultado da varredura genômica por *array* de SNP e análise de microssatélites próximos às regiões candidatas em uma família com síndrome de Usher.

As amostras de quatro afetados de uma única irmandade do município de Gado Bravo com síndrome de Usher (**FamGB02**), foram submetidas à varredura genômica por meio de genotipagem em *array* de SNP de 50k. O resultado da análise de *LOD scores* está esquematicamente demonstrado na Figura 5.1.

Figura 5.1. Resultado do cálculo de *LOD scores* de múltiplos pontos paramétrico em amostras de quatro pacientes afetados com síndrome de Usher.

Em resumo, 11 regiões apresentaram valores de *LOD Scores* próximos a 1,8, o máximo calculado como possível nessa família. As regiões mapeadas se localizam nos cromossomos 1, 3, 6, 8, 11, 13, 14, 16 e 18. O resumo das regiões mapeadas, sua localização e os resultados de *LOD Scores* encontram-se na Tabela 5.8. A distância em cM foi convertida em pb, utilizando-se como referência o genoma GRCh37/hg19.

Com base na sobreposição das regiões mapeadas com genes já identificados relacionados a essa síndrome, os candidatos mais prováveis a explicar o quadro são os genes *CLRN1* e *MYO7A*. Com base nessa hipótese, foram genotipados microssatélites mapeados próximos a esses genes para estudo de segregação. Os resultados estão apresentados nas Figuras 5.2 e 5.3.

Tabela 5.8. Resumo das regiões mapeadas na **FamGB02** por meio de varredura genômica com **array** de SNP.

Cromossomo	Localização da região mapeada	Posição cM	Posição provável do Mapa Físico	Regiões previamente mapeadas para síndrome de Usher	Gene	Proteína
1	1p31.1	101.615-107.456	71039081-77041382	1q41	<i>USH2A</i>	Usherina
3	3q23-q25.3	148.301-167.877	138769164-156790185	3p23-p24.2	-	-
				3q25.1	<i>CLRN1</i>	Clarina
6	6p21.3	50.041-50.712	32192068-32900601	Não há	-	-
	6q16-q21	102.172-117.496	96287270-112343865	Não há	-	-
	6q24-q25.3	150.641-170.953	147426785-159988748	Não há	-	-
8	8q21.1-q21.3	92.639-101.457	74487313-89851181	Não há	-	-
11	11q13.1-q13.3	71.513-74.349	63835611-68894753	11q13.5	<i>MYO7A</i>	Miosina VIIA
				11p15.1	<i>USH1C</i>	Harmonina
13	13q12.11-q12.12	2.962-8.799	21190234-23447347	Não há	-	-
	13q33.1-q33.2	99.757-101.899	103830408-104934930	Não há	-	-
14	14q24.3-q31.3	70.906-80.348	76098396-85182686	Não há	-	-
16	16q12.1-q23.2	63.753-106.342	51857745-81266767	Não há	-	-
18	18q12.3	57.171-61.244	37722220-43131934	Não há	-	-

Figura 5.2. Haplótipos dos quatro afetados (GB06, GB07, GB76 e GB05) por síndrome de Usher e de sua mãe (GBCon07) em microssatélites do cromossomo 3. O gene da clarina localiza-se entre os marcadores D3S1569 e D3S1279, destacado em verde.

Figura 5.3. Haplótipos dos quatro afetados (GB06, GB07, GB76 e GB05) por síndrome de Usher e de sua mãe (GBCon07) em microssatélites do cromossomo 11. O gene *MYO7A* localiza-se entre os marcadores D11S937 e D11S4175, destacado em verde.

Os resultados do estudo de ligação permitiram a exclusão do gene da *MYO7A* como candidato e mostraram segregação compatível com região que contém o gene *CLRN1*. Mutações nesse gene causam síndrome de Usher do tipo USH3.

5.6. Resultado do sequenciamento do gene *CLRN1*

As amostras dos pacientes da família com síndrome de Usher que mostraram possível ligação à região do gene *CLRN*, foram submetidas ao sequenciamento. Foi detectada a mutação c.C189A (p.Y63X) no exon 0 desses pacientes, em homozigose. Essa mutação gera um códon de parada prematuro e já foi descrita em um estudo realizado em população espanhola (Adato e col., 2002). As amostras dos outros 19 pacientes com essa síndrome nesse município e o único caso do município de Queimadas foram submetidas ao sequenciamento desse exon. No total, 21 pacientes afetados por síndrome de Usher do município de Gado Bravo apresentaram a mutação p.Y63X em homozigose e dois casos não tiveram essa mutação detectada. O paciente do município de Queimadas não apresentou essa mutação.

5.7. Etiologia provável da surdez

No município de Gado Bravo, 67% dos pacientes foram classificados como apresentando surdez de provável etiologia genética, 4% como provavelmente ambiental e 29% ficaram sem conclusão quanto à causa do quadro (idiopáticos). Em Queimadas essas frequências foram de 58%, 11% e 31%, respectivamente (Figura 5.4). Os mesmos resultados, porém expressos em relação ao número de probandos, foram 55% de casos provavelmente genéticos, 5% provavelmente ambientais e 40% idiopáticos, em Gado Bravo. Em Queimadas, esses valores foram respectivamente de 45%, 15% e 40%.

Figura 5.4. Frequência da provável etiologia dos casos de surdez em Gado Bravo e Queimadas calculada pelo número de pacientes (a) e pelo número de probandos (b).

No município de Queimadas, 12 casos de surdez foram classificados como de provável etiologia ambiental. Desses casos, em quatro havia relatos de rubéola na gravidez (4/12, 33,3%), três casos foram atribuídos a meningite bacteriana (3/12, 25%), três casos à prematuridade (3/12, 25%), e dois casos de relato do uso de antibióticos para tratamento de pneumonia/infecções (2/12, 16,6%). No município de Gado Bravo, apenas três pacientes foram classificados com surdez de provável etiologia ambiental. Desses casos, dois foram

atribuídos a rubéola na gravidez (2/3, 66,6%) e o outro caso foi relacionado à meningite bacteriana (1/3, 33,3%).

Quanto ao provável mecanismo de herança, os indivíduos dos casos considerados genéticos foram classificados nos seguintes subgrupos: 1) herança autossômica recessiva (AR) (com duas mutações no locus DFNB1 detectadas); 2) herança autossômica recessiva (AR) por causa da síndrome de Usher; 3) herança autossômica recessiva (AR) inferida pela genealogia; 4) herança autossômica dominante (AD); 5) herança autossômica dominante ou mitocondrial (AD/mito) e 6) herança ligada ao cromossomo X.

Em Gado Bravo a frequência dos casos foi de 12% AR com duas mutações detectadas no locus DFNB1, 45% dos pacientes diagnosticados com síndrome de Usher, 29% com mecanismo autossômico recessivo inferido pela genealogia, 2% de casos de herança autossômica dominante, 12% de provável herança autossômica dominante ou mitocondrial e nenhum caso de herança ligada ao X. Quanto ao número de probandos, a frequência para os mesmos grupos em Gado Bravo foi 13%, 30%, 44%, 3% e 10%, respectivamente (Figura 5.5, Tabela 5.9).

Em Queimadas, a frequência dos pacientes foi de 21% com AR com mutação detectada no locus DFNB1, 1% dos casos com síndrome de Usher, 39% com AR inferido pela genealogia, 32% dos casos com provável herança autossômica dominante, 5% com herança autossômica dominante ou mitocondrial e 2% dos casos com herança ligada ao X. A frequência dos probandos nos mesmos grupos foi 13%, 3%, 43%, 30%, 8% e 3%, respectivamente (Figura 5.5).

Tabela 5.9. Frequência dos casos genéticos e seu provável mecanismo de herança.

	Municípios	Gado Bravo (N=51)	Queimadas (N=62)
Pacientes	AR DFNB1	6 (11,8%)	13 (21%)
	AR Usher	23 (45,1%)	1 (1,6%)
	AR Outros	15 (29,4%)	24 (38,7%)
	AD	1 (2%)	20 (32,3%)
	AD/Mito	6 (11,8%)	3 (4,8%)
	Ligado ao X	0	1 (1,6%)
	Municípios	Gado Bravo (N=30)	Queimadas (N=37)
Probandos	AR DFNB1	4 (13,3%)	5 (13,5%)
	AR Usher	9 (30%)	1 (2,7%)
	AR Outros	13 (43,3%)	16 (43,2%)
	AD	1 (3,3%)	11 (29,7%)
	AD/Mito	3 (10%)	3 (8,1%)
	Ligado ao X	0	1 (2,7%)

Legenda: AR DFNB1 – Autossômico Recessivo com duas mutações no locus DFNB1;

AR Usher – Autossômico Recessivo, síndrome de Usher;

AD – Autossômico Dominante;

AR Outros – Autossômico Recessivo, baseado na genealogia;

AD/Mito – Autossômico Dominante ou Mitocondrial;

Figura 5.5. Frequência dos casos genéticos e seu provável mecanismo de herança. AR DFNB1 (Autossômico Recessivo com duas mutações detectadas no locus DFNB1); AR Usher (Autossômico Recessivo em pacientes diagnosticados com Síndrome de Usher); AR Outros (Autossômico Recessivo com base na genealogia); AD (Autossômico Dominante); AD/Mito (Autossômico Dominante ou Mitochondrial); Ligao X (Ligado ao X).

Dentre os casos de surdez não-sindrômica de provável etiologia genética, vinte e um pacientes (21/28, 75%), e 16 famílias (16/20, 80%) de Gado Bravo apresentaram surdez de herança autossômica recessiva. No município de Queimadas, 36 pacientes (36/61, 59%) e 20 famílias (20/36, 55,5%) também apresentaram o mesmo mecanismo de herança. Em relação aos casos de surdez não-sindrômica de provável herança dominante ou mitocondrial, sete pacientes (7/28, 25%) e quatro famílias (4/20, 20%) ocorreram no município de Gado Bravo, enquanto que 23 pacientes (23/61, 37,7%) e 14 famílias (14/36, 38,9%) ocorreram no município de Queimadas.

6. DISCUSSÃO

O censo demográfico do IBGE (2010) indicou que cerca de 650 mil pessoas apresentam grande dificuldade auditiva ou não conseguem ouvir no Nordeste do Brasil, e cerca de 48 mil encontram-se no estado da Paraíba. Nos municípios de Gado Bravo e Queimadas, o IBGE contabilizou 232 (2,8%) e 427 (1,1%) pessoas com deficiência auditiva, respectivamente. Esse número é maior do que foi identificado nesta pesquisa (85 ou 1,01% e 150 ou 0,37%, respectivamente). Esse fato deve ser devido à inclusão de pessoas que relataram ter perda auditiva depois dos 60 anos na amostragem e pelos dados do censo não serem confirmados por meio de diagnóstico clínico, visto que o próprio indivíduo entrevistado relata que possui o defeito. Caso fossem excluídos os indivíduos com mais de 50 anos com deficiência auditiva dos dados do censo, a porcentagem de indivíduos com deficiência auditiva seria reduzida para 1,95% e 0,59%, respectivamente. Apesar da diferença em termos absolutos, o número de casos registrados pelo IBGE foi aproximadamente duas vezes maior em ambos os municípios em relação à amostra colhida nesta pesquisa, por indicação dos Agentes Comunitários de Saúde.

O Brasil, assim como outros países emergentes, apresenta uma incidência de surdez da ordem de 1 a 4 em cada 1000 nascidos vivos (Braga e col., 1999; Chapchap e col., 2000; Bevilacqua e col., 2010). Estimou-se em 1999 que cerca de 84% desses casos são atribuídos aos fatores ambientais, enquanto os 16% restantes são atribuídos aos fatores genéticos (Braga e col., 1999). Nos dois municípios amostrados nesta pesquisa, a porcentagem de indivíduos com perda auditiva de provável etiologia genética foi maior do que essa: 55% dos probandos residentes em Gado Bravo e 45% dos que vivem em Queimadas. Essa porcentagem de probandos com surdez de provável etiologia genética surpreendentemente se assemelha às obtidas em países desenvolvidos (Morton, 1991; Petit, 1996; Smith e col., 2005; Revisão em Smith e col., 2012). No estudo realizado em amostra brasileira principalmente do Sudeste por Batissoco e col. (2009), foi estimado que cerca de 35% dos indivíduos possuíam perda auditiva de provável etiologia genética. Porém, essa amostra foi colhida em serviço de aconselhamento genético, que costuma incluir com maior probabilidade os casos genéticos.

Se a contribuição dos fatores genéticos para determinação da surdez, da ordem de 50%, observada nos dois municípios amostrados (Queimadas e Gado Bravo), fosse tomada como referência para estimar quantas pessoas seriam surdas na Paraíba e no Nordeste, esses números seriam 24 mil e 325 mil, respectivamente. Visto que a escolha dos municípios para o estudo foi por conveniência, e já havia relatos de famílias com repetição de surdez nos dois municípios, a porcentagem de casos genéticos pode ser maior do que a média dos demais

municípios. Por outro lado, pode ter havido superestimativa dos casos genéticos devida à análise de genealogias, visto que repetição de surdez na irmandade ou filhos de casais consanguíneos, foram contabilizados como casos provavelmente genéticos. Não foi considerada a hipótese de dois casos ambientais ocorrendo na mesma família. Essas estimativas mostram claramente a importância do estabelecimento de programas de genética comunitária que permitam o diagnóstico dos casos genéticos e aconselhamento genético para as famílias, acompanhados de ações de saúde que amenizem as dificuldades dos afetados.

Um dado interessante nos nossos resultados diz respeito à proporção de pessoas com surdez em Gado Bravo, pois lá foram encontrados relativamente três vezes mais afetados do que em Queimadas (0,91% e 0,27%, respectivamente). Caso fossem excluídos os casos de síndrome de Usher nos dois municípios (23 pacientes em Gado Bravo e um paciente em Queimadas), a frequência de surdez em Gado Bravo ainda seria duas vezes maior que em Queimadas (0,63% e 0,25%, respectivamente). Dessa forma, não podemos atribuir a maior frequência de casos de surdez em Gado Bravo em comparação a Queimadas à síndrome de Usher somente.

Na tentativa de explicar essa diferença na frequência dos casos de surdez, foram analisados alguns fatores como a consanguinidade parental, residência em área urbana ou rural, índice de desenvolvimento humano (IDH) e renda per capita. Os dados de consanguinidade parental dos probandos nos dois municípios foi calculado, tendo a amostra de Gado Bravo (21,8%) apresentado uma porcentagem menor do que a de Queimadas (28,4%). A consanguinidade dos pais, portanto, não explica o maior número de casos de surdez nesse município. Outra hipótese levantada diz respeito às condições de vida da população. Os dados de IDH e renda PIB per capita dos dois municípios também foram comparados a fim de encontrar alguma associação que explicasse o aumento da surdez em Gado Bravo (PNUD, 2000). Os dois municípios estão agrupados na faixa de IDH média (entre 500 a 799) e possuem aproximadamente a mesma renda PIB per capita. Essas informações também não permitiram explicar a maior prevalência de afetados em Gado Bravo.

Dos casos de surdez de provável etiologia ambiental, a causa mais frequente em ambos municípios foi a suposta infecção por rubéola durante a gestação, o que corrobora dois estudos realizados no Brasil (um na região Sudeste e outro no Nordeste). Esse fato está de acordo com o comentado em uma revisão sobre o tema, realizada em países subdesenvolvidos (Revisão em Morzaria e col., 2004; Nóbrega e col., 2005; Silva e col., 2006). Embora alguns estudos relatem a hiperbilirrubinemia como o principal fator de risco ambiental associado à surdez, não houve referência dessa ocorrência nas duas populações estudadas (Salvage e col.,

2013). Talvez isso ocorra devido a dificuldade de acesso a informações sobre esse diagnóstico nos pacientes e limitações dos serviços de saúde.

No presente estudo, a frequência das mutações detectadas, a frequência dos casos síndrômicos e não-síndrômicos, e a frequência dos mecanismos de herança foram calculadas em função do número de pacientes e em função do número de famílias (ou probandos), visto que é necessário corrigir as estimativas levando-se em conta indivíduos não aparentados. Os casos de surdez de herança autossômica recessiva não-síndrômica são os mais frequentes e foi estimado que contribuem com cerca de 80% dos casos genéticos em vários estudos (Zelante e col., 1997; Revisão em Smith e col., 2012). Nas duas populações do nosso estudo, os valores foram de 80% no município de Gado Bravo e de 57,1% no município de Queimadas, corroborando a literatura. Em Queimadas, houve um grande número de casos de surdez de herança autossômica dominante (14 famílias; 14/35, 40%), diferente do encontrado usualmente na literatura (14~24%) (Revisão em Smith e col., 2012).

A frequência da mutação c.35delG em homozigose entre os surdos não-síndrômicos variou de 10% a 63% em estudos de várias populações europeias, do mediterrâneo e de descendentes de europeus (Gasparini e col., 2000; Gualandi e col., 2002; Feldmann e col., 2004; Samanich, e col., 2007; Batissoco e col., 2009). Em estudos realizados no Brasil, a frequência da mutação c.35delG em homozigose entre os surdos não-síndrômicos variou de 1,3% a 15,2% (Tabela 6.1). Em nosso estudo, a frequência dessa mutação observada no município de Queimadas (9,2%) foi similar à descrita na literatura e similar também à encontrada em outro estudo realizado em uma população do Nordeste brasileiro (Manzoli e col., 2013). Em Gado Bravo, esse valor foi surpreendentemente abaixo do esperado (2,3%), porém, em outros três estudos brasileiros, foram verificadas frequências semelhantes: 1,3%, 2,7% e 3,9% (Tabela 6.1). A frequência de homozigotos com mutação c.35delG no município de Queimadas foi maior do que Gado Bravo. Supomos que isso ocorreu devido a presença de vários núcleos familiares que mantêm a tradição de casamentos consanguíneos. Esses núcleos tem ancestral em comum e dos 13 pacientes homozigotos com essa mutação nesse município (seis probandos), 11 pacientes eram pertencentes a essa mesma família. Em resumo, supomos que um efeito de fundador acompanhado de tradição de sucessivos casamentos consanguíneos explique a alta frequência de homozigotos com essa mutação no município de Queimadas.

Os dois municípios do estudo apresentaram frequências similares quanto aos casos com mutações no locus DFNB1 (duas mutações), 11,4% em Gado Bravo e 9,2% em Queimadas. Esse resultado também foi similar a frequência dos outros estudos realizados em populações brasileiras, que variou de 1% a 18,2% (Tabela 6.1).

Tabela 6.1. Estudos brasileiros sobre a frequência de mutações no locus DNFB1 entre probandos com surdez não-sindrômica. *Algumas mutações testadas; **Alguns pacientes selecionados para estudo por meio de sequenciamento do gene *GJB2*; ***Teste realizado apenas nos pacientes heterozigotos com mutação c.35delG.

Genótipo (DNFB1)	Campinas/ SP	São José do Rio Preto/SP	Brasil/ Várias regiões	São Paulo/ SP	Vitória/ES	Belém/PA	Marília/SP	Monte Santo/BA	Gado Bravo/ PB	Queimadas/ PB
c.35delG/c.35delG	2/75 (2,7%)	5/33 (15,2%)	41/645 (6,4%)	22/300 (7,3%)	3/77 (3,9%)	1/77 (1,3%)	N	8/61 (13,1%)	1/44 (2,3%)	7/76 (9,2%)
c.35delG/Nl	2/75 (2,7%)	3/33 (9,1%)	36/645 (5,6%)	5/300 (1,7%)	4/77 (5,2%)	6/77 (7,8%)	7/101 (6,9%)	1/61 (1,6%)	3/44 (6,8%)	7/76 (9,2%)
c.35delG/Mutação Patogênica no <i>GJB2</i>	N	N	4/645 (0,6%)**	7/300 (2,3%)	N*	N	NA	N	2/44 (4,5%)	N
Outras mutações em homozigose no gene <i>GJB2</i>	1/75 (1,3%)	N	4/645 (0,6%)**	1/300 (0,3%)	N*	N	NA	N	N	N
c.35delG/ del(<i>GJB6-D13S1830</i>)	NA	1/33 (3%)	4/645 (0,6%)	3/300 (1%)	1/77 (1,3%)	N	1/101 (1%)*	N	N	N
del(<i>GJB6-D13S1830</i>)/ del(<i>GJB6-D13S1830</i>)	NA	N	2/645 (0,3%)	N	N	N	N	N	N	N
c.35delG/ del(<i>GJB6-D13S1854</i>)	NA	NA	3/645 (0,5%)	N	1/77 (1,3%)	NA	N	N	2/44 (4,5%)	N
del(<i>GJB6-D13S1854</i>)/ del(<i>GJB6-D13S1854</i>)	NA	NA	N	N	N	NA	N	N	N	N
Total de pacientes com duas mutações patogênicas no locus DNFB1	5/75 (6,7%)	6/33 (18,2%)	58/645 (9%)	33/300 (11%)	5/77 (6,5%)	1/77 (1,3%)	1/101 (1%)	8/61 (13,1%)	5/44 (11,4%)	7/76 (9,2%)
Referência	Pfeilsticker e col., 2004	Piatto e col., 2004	Oliveira e col., 2007	Batissoco e col., 2009	Cordeiro- Silva e col., 2011	Castro e col., 2013	Esteves e col., 2013	Manzoli e col., 2013	Presente estudo	Presente estudo

Legenda: NA – Teste molecular Não Analisado; N- Mutação Não detectada.

Dos oito pacientes heterozigotos com a mutação c.35delG em Queimadas, nenhum teve uma segunda mutação recessiva detectada no gene *GJB2* ou próxima ao *GJB6*, que explicasse o fenótipo. Em contraste, apenas um paciente com a mutação c.35delG em heterozigose sem segunda mutação foi encontrado em Gado Bravo.

No presente estudo, a deleção del(*GJB6*-D13S1854) foi detectada em 4,5% dos probandos, associada em heterozigose composta com a mutação c.35delG em um probando e sem uma segunda mutação recessiva detectada no locus DFNB1 em outro probando, no município de Gado Bravo. Essa frequência foi maior do que a observada em outros dois estudos brasileiros que detectaram essa mutação, cujas frequências foram de 1,3% e 0,5% (Tabela 6.1). Essa deleção não foi detectada no município de Queimadas.

A del(*GJB6*-D13S1830) não foi detectada em nenhum dos municípios estudados, assim como outros estudos envolvendo populações do Norte e Nordeste brasileiros (Manzoli e col., 2013; Castro e col., 2013), o que é de certa forma inesperado, porque ela é a segunda mutação associada à perda auditiva mais frequentemente encontrada em populações do Sudeste brasileiro (Piatto e col., 2004; Batissoco e col., 2009; Cordeiro-Silva e col., 2011; Esteves e col., 2013). Essa mutação deve ter frequência baixa nas regiões Norte e Nordeste.

No município de Gado Bravo, após o sequenciamento na região de código do gene *GJB2*, foi detectada a mutação p.W24X em heterozigose em três pacientes (3/38, 7,9%), sendo dois casos em heterozigose composta e um caso sem uma segunda mutação recessiva detectada. Essa mutação tem alta frequência em indivíduos de países asiáticos e do grupo étnico Romani (indianos que vivem na Europa como nômades, “ciganos”) (Bouwer e col., 2007; Lazar e col., 2010). No recenseamento de 2010 realizado no Brasil, cerca de 800.000 pessoas foram classificadas como “ciganos”, sendo a segunda maior população de “ciganos” em todo mundo (IBGE, 2010). Foram mapeados assentamentos ciganos em 291 municípios brasileiros, dos quais quatro estão localizados no estado da Paraíba (IBGE, 2009). A maior comunidade cigana do Brasil encontra-se no município de Sousa, sertão da Paraíba, com cerca de 200 famílias assentadas (Barros, 2010). O município de Sousa dista cerca de 314 km do município de Queimadas e cerca de 354 km do município de Gado Bravo. É possível que alguns desses indivíduos tenham migrado para o lugar onde atualmente está localizado o município de Gado Bravo e fizeram lá moradia. Esse evento explica plausivelmente como a mutação p.W24X foi detectada em indivíduos residentes nesse município.

Não foi detectada na amostra de pacientes de ambos municípios a mutação mitocondrial m.A1555G, que possui alta frequência em populações caucasóides e também já detectada na população brasileira (Abreu-Silva e col., 2006a). Uma variante identificada como c.T1291C no gene mitocondrial *MTRNR1* foi encontrada em três pacientes no

município de Queimadas. Porém, essa variante já havia sido descrita como não patogênica pelo nosso grupo (Abreu-Silva e col., 2006a; 2006b). Outras mutações frequentes em grupos específicos também não foram encontradas, como as mutações c.167delT, c.235delC e p.R143W (ou c.T427C). Essas mutações apresentam alta frequência em populações de judeus *askhenazi*, asiáticos e africanos, respectivamente (Zelante e col., 1997; Brobby e col., 1998; Yan e col., 2003). Esse resultado indica que, em populações do Nordeste, essas mutações podem não ser frequentes, ou estar até mesmo ausentes, muito provavelmente devido à colonização dessa região, com pouca imigração de indivíduos pertencentes a essas populações. A mutação p.R143W (ou c.T427C), que é a mais frequente em africanos, foi detectada em alta frequência no país de Gana, não sendo detectada em outro estudo realizado em outros países africanos (Gasmelseed e col., 2004).

Os pacientes heterozigotos, sem uma segunda mutação recessiva detectada nos genes *GJB2* e *GJB6*, foram selecionados e suas amostras foram submetidas à técnica de MLPA. Nesta etapa, onze pacientes não possuíam uma segunda mutação recessiva que explicariam o seu fenótipo. Nenhuma mutação do tipo deleção ou duplicação foi detectada nesses pacientes. Um estudo foi realizado no Brasil utilizando a técnica de MLPA em amostras de pacientes heterozigotos com a mutação c.35delG. Nesse estudo, foram detectadas mutações que explicaram o fenótipo de 28% dos casos até então sem diagnóstico conclusivo. Dessas mutações, 19,5% foram detectadas por meio de sequenciamento do gene *GJB2*, 4,4% foram associados às deleções do gene *GJB6* (detectadas em nosso estudo por meio de PCR multiplex) e apenas a mutação c.-3170G>A (IVS 1+1 G>A) foi detectada por meio da técnica de MLPA (4,3%) (Da Silva-Costa e col., 2011). Batissoco e col. (2009) submeteu amostras de surdos com apenas uma mutação recessiva no locus DFNB1 ao *kit* comercial SALSA P0 163 *GJB-WFS1* (MRC Holland, 2008) e não encontrou nenhuma duplicação ou deleção que explicasse o fenótipo. No entanto, posteriormente, na tese de doutorado, Batissoco (2011) repetiu a análise com o *kit* comercial SALSA P163-D1 *GJB-WFS1* (MRC Holland, 2012) na amostra dos mesmos indivíduos e foi detectada uma duplicação na região de código do gene *GJB2*. Essa duplicação foi posteriormente confirmada por meio de PCR em tempo real, com extensão mínima estimada de 427pb e extensão máxima de 1,2kb (Batissoco, 2011).

No nosso estudo e em vários outros da literatura em relação a genética da surdez, é notável a ocorrência de casos com mutação monoalélica, sem que a segunda mutação fosse rastreada. Hipóteses foram levantadas na tentativa de explicar o caso: 1) esse casos ocorrem devido a alta frequência da mutação em populações, o que não significa que a surdez tenha sido causada por essa mutação, ou seja, existe um outro fator causal da surdez nesses pacientes; 2) pode haver outras alterações em regiões regulatórias ou em outros genes,

caracterizando uma herança digênica. No nosso estudo, esses casos não foram contabilizados nos casos considerados provavelmente genéticos.

Os pacientes selecionados para sequenciamento do gene da pendrina não apresentaram nenhuma mutação patogênica na região codificadora. Em geral, são selecionados para esse tipo de estudo indivíduos no qual tenha sido diagnosticada a presença do aqueduto vestibular alargado (AVA ou EVA, do inglês *Enlarged Vestibular Aqueduct*) ou displasia de Mondini (Campbell e col., 2001; Tsukamoto e col., 2003; Albert e col., 2006; Guo e col., 2010). Devido à pobreza e limitações dos serviços de saúde às populações estudadas, o acesso ao exame de imagem é restrito e não foi possível estudar essas características. Dessa forma, nessas populações, os estudos moleculares realizados no gene da pendrina em indivíduos sem um diagnóstico clínico confirmando malformações na orelha interna não foram frutíferos, pois nenhum dos pacientes selecionados para o teste apresentou mutação na região de código do gene.

A síndrome de Usher é a síndrome associada com surdez de maior frequência entre casos de herança autossômica recessiva (Smith e col., 2012). Estudos realizados nos Estados Unidos sugerem a frequência de 1 a cada 6.000 indivíduos com essa síndrome, e também essa síndrome é a mais frequente entre surdos nessa população (Kimberling e col., 2010). Nos dois municípios do nosso estudo, essa síndrome também foi a mais frequente entre os casos síndrômicos com provável padrão de herança autossômica recessivo. Em Queimadas, apenas um paciente, filho de pais consanguíneos, foi diagnosticado com essa síndrome pois apresentava retinose pigmentar associada à perda auditiva. Esse único indivíduo em Queimadas representa 20% dos casos síndrômicos desse município. No município de Gado Bravo, um total de 23 pacientes foram diagnosticados com essa doença. Desses casos, apenas cinco pacientes relataram consanguinidade entre os pais. Muito provavelmente o alelo mutado para síndrome de Usher está em alta frequência nessa população, pois pacientes com essa síndrome nesse município explicam 30,3% (23/76) de todos os casos de surdez.

Uma grande família e cinco outras menores abrangem todos os casos de síndrome de Usher desse município. É possível que essas seis famílias sejam descendentes de um único ancestral, porém não foi possível estabelecer claramente as relações de parentesco na construção das genealogias. Após sequenciamento do gene *CLRN1* em amostras de pacientes com síndrome de Usher, foi detectada a mutação c.C189A (p.Y63X) em homozigose em 21 pacientes (21/23, 91,3%). Essa mutação já havia sido descrita em um estudo realizado em população espanhola (Adato e col., 2002; Garcia-Garcia e col., 2012). Dessa forma, a hipótese de ancestralidade comum entre os indivíduos com essa síndrome é plausível e sugere que essa mutação está em alta frequência na população por meio de efeito de fundador.

Medidas de políticas públicas requerem conhecimento das enfermidades e causas e das enfermidades que acometem determinada população. O relato de vários estudos com pessoas com doenças genéticas nos estados nordestinos aponta a necessidade de estabelecimento de serviços de Genética Médica e Comunitária nessa região. Igualmente há indicações e recomendações da Organização Mundial de Saúde na promoção desse tipo de atendimento (WHO, 2010). Nesse estudo foi observado que testes de triagem de rotina para surdez genética precisam de adaptações para a região do Nordeste, visto que a frequência das mutações difere um pouco do que se tem relatado em estudos realizados no Sudeste brasileiro e em populações caucasóides (Batissoco e col., 2009; Brown e Rehm, 2012).

Para se tornar viável a realização de estudos moleculares da surdez na região do Nordeste brasileiro são necessárias técnicas de baixo custo e de alto desempenho no resultado. De acordo com o resultado do nosso estudo, a estratégia mais adequada seria: 1) estudo por meio da técnica de PCR-RFLP para detectar a mutação c.35delG; 2) estudo por meio de PCR-*multiplex* para detectar as deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) em pacientes com a mutação c.35delG em heterozigose; 3) sequenciamento do gene *GJB2* em pacientes homozigotos e heterozigotos com a mutação c.35delG ou deleções detectadas, a fim de buscar outras mutações na região de código desse gene; 4) sequenciamento do gene *GJB2* em probandos com surdez de provável herança autossômica recessiva ou dominante. Seria interessante também, propor um teste de baixo custo específico de detecção da mutação p.Y63X em indivíduos residentes do estado da Paraíba, pelo menos em municípios próximos a Gado Bravo, em casos com suspeita da síndrome de Usher.

7. CONCLUSÕES

A análise molecular revelou que a mutação c.35delG é a mais comumente detectada entre os casos de perda auditiva não-sindrômica de provável etiologia genética nos dois municípios do estudo. A alta frequência de surdos homozigotos com essa mutação em Queimadas é, provavelmente, decorrente de um efeito de fundador associado a seguidos casamentos consanguíneos.

Já as mutações m.A1555G do gene mitocondrial *MTRNR1*, a deleção del(*GJB6*-D13S1830) do gene *GJB6* e a mutação c.167delT do gene *GJB2* não foram detectadas nas duas populações. Sugere-se que essas mutações estão em baixa frequência nos dois municípios ou até mesmo no Nordeste.

Sugerimos que a mutação p.W24X, detectada em três casos do município de Gado Bravo, provavelmente foi introduzida nesse município por efeito de fundador, provavelmente por ciganos de origem indiana.

Na amostra dos pacientes com mutação monoalélicas submetidos à técnica de MLPA, não foi detectada uma segunda mutação, do tipo variação de número de cópias, que explicasse o fenótipo desses casos.

Dos pacientes com surdez de herança autossômica recessiva sem mutações detectadas no locus *DFNB1* e que tiveram suas amostras submetidas a estudo de ligação com microssatélites próximos ao gene da pendrina, apenas cinco apresentaram ligação à região. A amostra desses pacientes foi sequenciada e nenhuma mutação patogênica foi detectada na região de código do gene *SLC26A4*. Portanto, o gene *SLC26A4* não deve ter contribuição significativa na surdez de herança autossômica recessiva nessa região.

Observamos que no município de Gado Bravo há muitos casos de Síndrome de Usher e a maioria dos pacientes possuem a mutação p.Y63X em homozigose, o que indica uma alta frequência dessa mutação, muito provavelmente decorrente de efeito de fundador.

Aproximadamente metade dos probandos de cada município (55% em Gado Bravo e 45% em Queimadas) foram classificados como apresentando surdez de provável etiologia genética.

8. REFERÊNCIAS

- Abreu-Silva R, Lezirovitz K, Braga M, Spinelli M, Pirana S, Della-Rosa V, Otto P, Mingroni-Netto R. (2006a). Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNA Ser(UCN) mitochondria mutations in hearing-impaired Brazilian patients. *Braz J Med Biol Res* 39(2): 219-26.
- Abreu-Silva R, Batissoco A, Lezirovitz K, Romanos J, Rincon D, Auricchio M, Otto P, Mingroni-Netto R. (2006b). Correspondence regarding Ballana et al., “Mitochondrial 12S rRNA gene mutations affect RNA secondary structure and lead to variable penetrance in hearing impairment”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343: 675-676.
- Adato A, Vreugde S, Joensuu T, Avidan N, Hamalainen R, Belenkiy O, Olender T, Bonne-Tamir B e col. (2002). USH3A transcripts encode clarin-1, a four-transmembrane-domain protein with a possible role in sensory synapses. *Eur. J. Hum. Genet.* 10: 339-350.
- Albert S, Blons H, Jonard L, Feldmann D, Chauvin P, Loundon N, Sergent-Allaoui A, Houang M e col. (2006). SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in caucasian populations. *European Journal of Human Genetics.* 14: 773-779.
- Barros C. (2010). Uma vila cigana no sertão paraibano: descendentes de nômades, eles se fixaram no Nordeste e enfrentam pobreza e preconceito. *Problemas Brasileiros.* Ano 47, n. 397: 58-62.
- Batissoco A, Abreu-Silva R, Braga M, Lezirovitz K, Della-Rosa V, Alfredo T e col. (2009). Prevalence of GJB2 (connexin-26) and GJB6 (connexin-30) mutations in a cohort of 300 Brazilian hearing-impaired individuals: implications for diagnosis and genetic counseling. *Ear Hear.* 30(1): 1-7.
- Batissoco A. (2011). A conexina 26 e suas relações com outras proteínas no órgão de corti. Tese de doutorado do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Battelino S, Repic B, Zargi M, Podkraisek K. (2012). Novel connexin 30 and connexin 26 mutational spectrum in patients with progressive sensorineural hearing loss. *J. Laryngol. Otol.* 126(8): 763-769.
- Berry A, Scott H, Kudoh J, Talior I, Korostishevsky M, Wattenhofer M, Guipponi M, Barras C, Rossier C, Shibuya K, Wang J, Kawasaki K, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, antonarakis S, Bonne-Tamir B. (2000). Refined Localization of Autosomal Recessive Nonsyndromic Deafness DFNB10 Locus Using 34 Novel Microsatellite Markers,

- Genomic Structure, and Exclusion of Six Known Genes in the region. *Genomics* 68(1) 22-29.
- Bevilacqua M, Alvarenga K, Costa O, Moret A. (2010). The universal newborn hearing screening in Brazil: from identification to intervention. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 74(5): 510-515.
- Bouwer S, Angelicheva D, Chandler D, Seeman P, Tournev I, Kalaydjieva L. (2007). Carrier rates of the ancestral Indian W24X mutation in GJB2 in the general Gypsy population and individual subisolates. *Genet. Test.* 11(4): 455-458.
- Braga M, Otto P, Spinelli M. (1999). Recurrence Risks in cases of Nonsyndromic Deafness. *Braz J Dys and Speech-ear Dis.* 2:33-40.
- Brobbby G, Muller-Myhsok B, Horstmann R. (1998). Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *N. Engl. J. Med.* 338: 548-550.
- Brown K, Rehm H. (2012). Molecular diagnosis of hearing loss. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 9(16).
- Cai X, Lytton J. (2004). Molecular cloning of a sixth member of the K(+)-independent Na⁺/Ca²⁺ exchanger gene family, NCKx6. *J. Biol. Chem.* 279: 5867-5876.
- Campbell C, Cucci R, Prasad S, Green G, Edeal J, Galer C, Karniski L, Sheffield V, Smith R. (2001). Pendred Syndrome, DFNB4, and PDS/SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations. *Human Mutations* 17(5): 403-411.
- Castro L, Marinho A, Rodrigues E, Marques G, Carvalho T, Silva L, Santos S. (2013). A study of GJB2 and delGJB6-D13S1830 mutations in Brazilian non-syndromic deaf children from the Amazon region. *Braz J. Otorhinolaryngol.* 79(1): 95-99.
- Common J, Di W, Davies D, Kelsell D. (2004). Further evidence for heterozygote advantage of *GJB2* deafness mutations: a link with cell survival. *J. Med. Genet.* 41(7):573-5.
- Cordeiro-Silva M, Barbosa A, Santiago M, Provetti M, Dettogni R, Tovar T, Rabbi-Bortolini E, Louro I. (2011). Mutation analysis of GJB2 and GJB6 genes in shoutheastern Brazilians with hereditary nonsyndromic deafness. *Mol Biol Rep.* 38(2): 1309-1313.
- Da Silva-Costa S, Martins F, Pereira T, Pomílio M, Marques-de-Faria A, Sartorato E. (2011). Searching for digenic inheritance in deaf Brazilian individuals using the multiplex ligation dependent probe amplification technique. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 15(12): 849-853
- Davis H e Silverman RS. (1970). Hearing and deafness. 3^a ed. New York: Holt, Rinehart e Wilson. p.253-79.

- del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, Menendez I, Moreno F. (2002). A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *New Eng J Med*. 346:243-9.
- del Castillo I, Moreno-Pelayo M, del Castillo F e col. (2003). Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing impaired subjects: a multicenter study. *Am J Hum Genet*. 73: 1452-1458.
- del Castillo F, Aguirre L, Rodriguez-Ballesteros M, Villamar M, Moreno-Pelayo M, Moreno F, del Castillo I. (2009). A novel 200-kb deletion not involving the GJB6 (Connexin-30) gene at the DFNB1 locus is found in the compound heterozygous state with a GJB2 (Connexin-26) mutation in subjects with autosomal recessive hearing impairment. 7th Molecular Biology of Hearing and Deafness. Livro de resumos: 85.
- del Castillo F, Rodríguez-Ballesteros M, Alvarez A, Hutchin T, Leonardi E, de Oliveira C, Azaiez H, Brownstein Z, Avenarius M, Marlin S, Pandya A, Shahin H, Siemering K, Weil D, Wuyts W, Aguirre L, Martín Y, Moreno-Pelayo M, Villamar M, Avraham K, Dahl H, Kanaan M, Nance W, Petit C, Smith R, Van Camp G, Sartorato E, Murgia A, Moreno F, del Castillo I. (2005). A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(*GJB6*-D13S1854), found in trans with mutations in the *GJB2* gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet*. 42(7):588-94.
- del Castillo F, del Castillo I. (2011). The DFNB1 subtype of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. *Frontiers in Bioscience* 16: 3252-3274.
- Denoyelle F, Weil D, Maw M, Wilcox S, Lench N, Allen-Powell D, Osborn A, Dahl H e col. (1997). Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum. Mol. Genet*. 6: 2173-2177.
- Ensembl Genome Browser homepage. World Wide Web URL: <http://www.ensembl.org/index.html> (Acesso em 11/01/2013).
- Esteves M, de Lima M, Francisco A, da Silva W, Ferreira C, Dell'aringa A. (2013). Analysis of the presence of the *GJB6* mutations in patients heterozygous for *GJB2* mutation in Brazil. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol*.
- Estivill X, Gasparini P. The connexin-deafness homepage. World Wide Web URL: <http://davinci.crg.es/deafness/> (Acesso em 12/03/2013).
- Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, e col. (1998). Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 351-394.
- Estivill X, Govea N, Barcelo E e col. (1998). Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Amer. J. Hum. Genet*. 62: 27-35.

- Everett L, Glaser B, Beck J, Idol J, Buchs A, Heyman M, Adawi F, Hazani E, Nassir E, Baxevanis A, Sheffield V, Green E. (1997). Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (*PDS*). *Nat Genet.* 17(4):411-422, 1997.
- Feldmann D, Denoyelle F, Chauvin P e col. (2004). Large deletion of the *GJB6* gene in deaf patients heterozygous for the *GJB2* gene mutation: genotypic and phenotypic analysis. *Am. J. Med. Genet.* 127: 263-267.
- Feldmann D, Marechal C, Jonard L, Thierry P, Czajka C, Couderc R, Ferec C, Denoyelle F, Marlin S, Fellmann F. (2009). A new large deletion in the DFNB1 locus causes nonsyndromic hearing loss. *Eur. j. Med. Genet.* 52: 195-200.
- Fraser G. (1965). Association of congenital deafness with goiter (Pendred's syndrome) a study of 207 families. *Ann. Hum. Genet.* 28: 201-249.
- Fraser G. (1976). The causes of profound deafness in childhood. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Garcia-Garcia G, Aparisi M, Rodrigo R, Sequedo M, Espinós C, Rosell J, Olea J, Mendivil M, Ramos-Arroyo M, Ayuso C, Jaijo T, Aller E, Millan J. (2012). Two novel disease-causing mutations in the CLRN1 gene in patients with Usher syndrome type 3. *Mol. Vis.* 18: 3070-3078.
- Gasmelseed N, Schmidt M, Magzoub M, Macharia M, Elmustafa O, Ototo B, Winkler E, Ruge G, Horstmann R, Meyer C. (2004). Lower frequency of deafness-associated GJB2 variants in Kenya and Sudan and novel GJB2 variants. *Hum. Mutat.* 23: 206-207.
- Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G e col. (2000). High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations: genetic analysis consortium of *GJB2* 35delG. *Eur. J. Hum. Genet.* 8: 19-23.
- Gorlin R, Pindborg J, Cohen M. (1976). Syndromes of the Head and Neck. *New York: McGraw-Hill* (pub.) (2nd ed.).
- Gorlin R, Toriello H, Cohen M. (1995). Hereditary hearing loss and its syndromes. New York; Oxford: Oxford University Press.
- Grifa A, Wagner C, D'Ambrosio L, Melchiaonda S, Bernardi F, Lopez-Bigas N e col. (1999). Mutations in *GJB6* cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nature Genet.* 23: 16-18.
- Gualandi F, Ravani A, Berto A e col. (2002). Exploring the clinical and epidemiological complexity of GJB2-linked deafness. *Am. J. Med. Genet.* 112: 38-45.
- Guan M, Fiscehl-Ghodsian N, Attardi G. (2000). A biochemical basis for the inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. *Hum. Mol. Genet.* 9(12): 1787-1793.

- Guilford P, Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahia A, Petit C. (1994). A non-syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat. Genet.* 6: 24-28.
- Guo Y, wang Y, Xu B, Liu X, Zhu Y, Zhao F, Ji Y, Zhou Y, Li J, Li Q, Wang D, Wang Q. (2010). Identification of two novel mutations, c.232T>c and c.2006A>T, in SLC26A4 in a Chinese Family associated with enlarged vestibular aqueduct. *Intern. J. Ped. Otorh.* 74: 831-835.
- IBGE. Censo Populacional 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (29 de novembro de 2010). Acesso em 05 de maio de 2011.
- IBGE. Diretoria de pesquisas, coordenação de população e indicadores sociais. Pesquisa de informações básicas municipais. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Acesso em 18 de março de 2013.
- Jaworek T, Bhatti R, Latief N, Khan S, Riazuddin S, Ahmed Z. (2012). USH1K, a novel locus for type I Usher syndrome, maps to chromosome 10p11.21-q21.1. *J. Hum. Genet.* 57(10): 633-637).
- Keats B, Berlin C.(1999). Genomics and Hearing Impairment. *Genome Research* 9(1):7-16.
- Kenneson A, Cannon M. (2007). Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol.* 17: 253-257.
- Kiang D, Jin N, Tu Z, Lin H. (1997). Upstream genomic sequence of the human connexin 26 gene. *Gene* 199: 165-171.
- Kimberling W, Hildebrand M, Shearer A, Jensen M, Halder J, Trzupek K e col. (2010). Frequency of Usher syndrome in two pediatric populations: Implications for genetic screening of deaf and hard of hearing children. *Genet. Med.* 12: 512-516.
- Kokotas H, Petersen M, Willems P. (2007). Mitochondrial deafness. *Clin. Genet.* 71: 379-391.
- Kokotas H, Grigoriadou M, Villama M, Giannoulia-Karantana A, del Castillo I, Petersen M. (2010). Hypothesizing an ancient Greek origin of the *GJB2* 35delG mutation: can science meet history? *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 14(2): 183-187.
- Lautermann J, Frank H, Jahnke K, Traub O, Winterhager E. (1999). Developmental expression patterns of connexin26 and -30 in the rat cochlea. *Dev. Genet.* 25(4): 306-311.
- Lazar C, Popp R, Trifa A, Mocanu C, Mihut G, Al-Khzouz C, Tomescu E, Figan I, Grigorescu-Sido P. (2010). Prevalence of the c.35delG and p.W24X mutations in the *GJB2* gene in patients with nonsyndromic hearing loss from North-West Romania. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 75(4): 351-355.

- Lefebvre P, Van de Water T. (2000). Connexins, Hearing and Deafness: Clinical Aspects of Mutations in the Connexin 26 gene. *Brain Research Reviews* 32:159-162.
- Lofrano-Porto A, Barra G, Nascimento P, Costa P, Garcia E, Vaz R, Batista A, Freitas A, Cherulli B, Bahmad F, Figueiredo L, Neves F, Casulari L. (2008). Pendred syndrome in a large consanguineous Brazilian family caused by a homozygous mutation in the SLC26A4 gene. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 52(8):1296-303.
- Mahdieh N, Rabbani B. (2009). Statistical study of 35delG mutation of *GJB2* gene: A meta-analysis of carrier frequency. *Int. J. Audiol.* 48(6): 363-370.
- Manzoli G, Abe-Sande K, Bittles A, da Silva D, Fernandes L, Paulon R, de Castro I, Padovani C, Acosta A. (2013). Non-syndromic hearing impairment in a multi-ethnic population of Northeastern Brazil. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* doi: 10.1016/j.ijporl.2013.04.001.
- McGuirt W, Smith R. (1999). Connexin 26 as a Cause of Hereditary Hearing Loss. *Am J Audiology* 8:1059-1066.
- Mese G, Londin E, Mui R, Brink P, White T (2004). Altered gating properties of functional Cx26 mutants associated with recessive non-syndromic hearing loss. *Hum Genet.* 115(3):191-199.
- Minárik G, Ferák V, Feráková E, Ficek A, Poláková H, Kádasi L. (2003). High frequency of *GJB2* mutation W24X among Slovak Romany (Gypsy) patients with non-syndromic hearing loss (NSHL). *Gen. Physiol. Biophys.* 22(4): 549-556.
- Morell R, Kim H, Hood L, Goforth L, Friderici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin C, Oddoux C, Ostrer H, Keats B, Friedman T. (1998). Mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N. Engl. J. Med.* 339: 1500–1505.
- Morton N. (1991). Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 630: 16-31.
- Morzaria S, Westerberg B, Kozak F. (2004). Systematic review of the etiology of bilateral sensorineural hearing loss in children. *Internation Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 68(9):1193-1198.
- Nivoloni K, Da Silva-Costa S, Pomílio M, Pereira T, Lopes K, De Moraes V, Alexandrino F, De Oliveira C, Sartorato E. (2010). Newborn hearing screening and genetic testing in 8974 Brazilian neonates. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 74(8): 926-929.
- Nóbrega M, Weckx L, Juliano Y. (2005). Study of the hearing loss in children and adolescents, comparing the periods of 1990-1994 and 1994-2000. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 69: 829-838.

- Norouzi V, Azizi H, Fattahi Z, Esteghamat F, Bazazzadegan N, Nishimura C, Nikzat N, Jalalvand K, Kahrizi K, Smith R, Najmabadi H. (2011). Did the *GJB2* 35delG mutation originate in Iran? *Am. J. Med. Genet.* 155A(10): 2453-2458.
- Oliveira C, Alexandrino F, Abe-Sandes K, Silva W, Maciel-Guerra A, Magna L, Sartorato E. (2004). Frequency of the 35delG mutation in the *GJB2* gene in samples of European, Asian, and African Brazilians. *Hum. Biol.* 76(6): 313-316.
- Oliveira C, Alexandrino F, Christiani T, Steiner C, Cunha J, Guerra A, Sartorato E. (2007). Molecular genetics study of deafness in Brazil: 8-year experience. *Am J Med Genet A.* 143A(14): 1574-1579.
- Oliveira C, Pimpinati C, Alexandrino F, Magna L, Maciel-Guerra A, Sartorato E. (2007). Allelic frequencies of the 35delG mutation of the *GJB2* gene in different Brazilian regions. *Genet Test.* 11(1): 1-3.
- Pallares-Ruiz N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M, Roux A. (2002). A large deletion including most of *GJB6* in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? *Eur. J. Hum. Genet.* 10(1): 72-76.
- Petersen M, Willems P. (2006). Non-Syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clinical Genetics* 69(5): 371-392.
- Petit C (1996). Genes Responsible for Human Hereditary Deafness: Symphony of a Thousand. *Nat Genet* 14(4):385-391.
- Pfeilsticker L, Stole G, Sartorato E, Delfino D, Guerra A. (2006). A investigação genética na surdez hereditária não-sindrômica. *Ver. Bras. Otorrinolaringol.* 70(2).
- Piatto V, Bertollo E, Sartorato E, Maniglia J. (2004). Prevalence of the *GJB2* mutations and the del(*GJB6-D13S1830*) mutation in Brazilian patients with deafness. *Hear Res.* 196: 87-93.
- Piatto V, Oliveira A, Alexandrino F, Pimpinati C, Sartorato E. (2005). Perspectivas para triagem da deficiência auditiva genética: rastreamento da mutação 35delG em neonatos. *Jornal de Pediatria.* 81(2): 139-142.
- Pingault V, Ente D, Moal F, Goossens M, Malin S, Bondurand N. (2010). Review and Update of Mutations Causing Waardenburg Syndrome. *Human Mutation* 31(4): 391-406.
- Prezant T, Agapian J, Bohlman M, Bu X, Oztas S, Qiu W, Arnos K, Cortopassi G, Jaber L, Rotter J, Shohat M, Fischel-Ghodsian N. (1993). Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet.* 4(3): 289-294.

- Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. PNUD. (2000). Índice de Desenvolvimento Humano - municipal World Wide Web URL: <http://www.pnud.org.br/> (Acesso em 05/05/2011).
- Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. (2000). Molecular Genetics of Hearing Impairment due to Mutations in gap Junction Genes Encoding Beta Connexins. *Hum Mutat* 16(3): 190-202.
- Read A, Newton V. (1997). Waardenburg syndrome. *J. Med. Genet.* 34:656-665.
- Reid F, Vernham G, Jacobs H. (1994). A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Hum. Mutat.* 3: 243-247.
- Rodriguez-Paris J, Tamayo M, Gelvez N, Schrijver I. (2011). Allele-specific impairment of *GJB2* expression by *GJB6* deletion del(*GJB6*-D13S1854). *Plos One* 6(6): e21665.
- Ruschendorf F, Nurnberg P. (2005). ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10k SNP array data. *Bioinformatics* 21(9): 2123-212.
- Russo I. (2000). Overview of audiology in Brazil: state of the art. *Audiology* 39(4):202-6.
- Salvage P, Martines E, Martines F. (2013). Prevalence and risk factors for sensorineural hearing loss: western Sicily overview. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*
- Samanich J, Lowes C, Burk R e col. (2007). Mutations in *GJB2*, *GJB6*, and mitochondrial DNA are rare African American and Caribbean Hispanic individuals with hearing impairment. *Am. J. Med. Genet.* 143: 830–838.
- Santos F, Pena S, Epplen J. (1993). Genetic and population study of a Y-Linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-Isotopic Technique. *Hum. Genet.* 90: 655-656.
- Sartorato E, Gottardi E, de Oliveira C, Magna L, Annichino-Bizzacchi J e col. (2000). Determination of the frequency of the 35delG allele in Brazilian neonates. *Clin. Genet.* 58: 339-340.
- Scott D, Wang R, Kreman T, Andrews M, McDonald J, Bishop J, Smith R, Karniski L, Sheffield V. (2000). Functional differences of the PDS gene product are associated with phenotypic variation in patients with Pendred syndrome and non-syndromic hearing loss (DFNB4). *Hum Mol Genet.* 9: 1709–1715.
- Schrijver I. (2004). Hereditary Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss: Transforming Silence to Sound. *J. Mol. Diagn.* 6(4): 275-284.
- Shiono H, Bandou K, Kadowaki J. (1969). Clinical, dermatoglyphic and chromosomal study of Waardenburg's syndrome. *Tohoku Exp. Med.* 99(1): 45-50.

- Silva L, Queiros F, Lima I. (2006). Etiology of hearing impairment in children and adolescents of a reference center APADA in the city of Salvador, state of Bahia. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 72(1): 33-36.
- Smith R, Bale J, White K. (2005). Sensorineural hearing loss in children. *Lancet* 274: 879-890.
- Smith R, Shearer E, Hildebrand M, Van Camp G. (2012). Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. *GeneReviews*. Seattle: University of Washington, Seattle.
- Smith R, Hildebrand M, Van Camp G. (2010). Deafness and hereditary hearing loss overview. In: Pagon RA (Ed.). *Gene reviews*. Seattle: University of Washington, Seattle, 1993-. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=deafness-overview>>. (Acesso em: 13 jun. 2011).
- Smith R, Van Camp G, Alasti F. (2012). Pendred Syndrome/DFNB4. *GeneReviews*. Seattle: University of Washington, Seattle. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1467/>> (Acesso em: 10 abr. 2013).
- Sun Y, Tang W, Chang Q, Wang Y, Kong W, Lin X. (2009). Connexin 30 null and conditional connexin 26 null mice display distinct pattern and time course of cellular degeneration in the cochlea. *J. Comp. Neurol.* 516(6): 569-579.
- Tsukamoto K, Suzuki H, Harada D, Namba A, Abe S, Usami S. (2003). Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese. *European Journal of Human Genetics* 11: 916-922.
- Uehara D, Rincon D, Abreu-Silva R, Auricchio M, Junior A, Kok F, Mingroni-Netto R. (2010). Role of the mitochondrial mutations, m.827A>G and the novel m.7462C>T, in the origin of Hearing Loss. *Genet. Test. Mol. Biomark.* 14(5): 611-616.
- UCSC Genome Browser homepage. World Wide Web URL: (Acesso em 11/03/2013).
- Van Camp G, Willens P, Smith R. (1997). Nonsyndromic Hearing Impairment: Unparalleled Heterogeneity; *Am J Hum Genet*; 60(4):758-64.
- Van Camp G, Smith R. Hereditary hearing loss homepage. World Wide Web URL: <http://hereditaryhearingloss.org/> (Acesso em 11/03/2013).
- Van den Ouweland J, Lemkes H, Ruitenbeek W, Sandkuijl L, de Vrijlder M, Struyvenberg P, van de Kamp J, Maassen J. (1992). Mutation in mitochondrial tRNA(Leu-UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nature Genet.* 1: 368-371.

- Van Laer L, McGuirt W, Yang T, Smith R, Van Camp G. (1999). Autosomal dominant nonsyndromic hearing impairment. *Am J Med Genet* 89(3):167-74.
- Verheij J, Kunze J, Osinga J, van Essen A, Hofstra R. (2002). ABCD syndrome is caused by a homozygous mutation in the EDNRB gene. *Am. J. Med. Genet.* 108: 223-225.
- Vernon M. (1969). Usher's syndrome-deafness and progressive blindness. Clinical cases, prevention, theory and literature survey. *J. Chronic Dis.* 22: 133-151.
- Wang Y, Chang Q, Tang W, Sun Y, Zhou B, Li H, Lin X. (2009). Targeted connexin26 ablation arrests postnatal development of the organ of Corti. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385(1): 33-37.
- Wei X, Sun Y, Xie J, Shi Q, Qu N, Yang G, Cai J, Yang Y, Liang Y, Wang W, Yi X. (2012). Next-generation sequencing identifies a novel compound heterozygous mutation in MYO7A in a Chinese patient with Usher Syndrome 1B. *Clinica Chimica Acta* 413(23-24): 1866-1871.
- Wilch E, Azaiez H, Fisher R, Elfenbein J, Murgia A, Birkenhager R, Bolz H, Da Silva-Costa S, Del Castillo I, Haaf T, hoefsloot L, Kremer H, Kubisch C, Le Marechal C, Pandya A, Sartorato E, Schneider R, Van Camp G, Wuyts W, Smith R, Friderici K. (2010). A novel DFNB1 deletion allele supports the existence of a distant cis-regulatory region that controls *GJB2* and *GJB6* expression. *Clin.Genet.* 78(3): 267-274.
- Wilch E, Zhu M, Burkhart K, e col. (2006). Expression of *GJB2* and *GJB6* is reduced in a novel DFNB1 allele. *Am. J. Hum. Genet.* 19: 174-179.
- Wilcox S, Saunders K, Osborn A, Arnold A, Wunderlich J, Kelly T, Collins V, Wilcox L, McKinlay R, Kamarinos M, Cone-Wesson B, Williamsom R, Dahl H. (2000). High frequency hearing loss correlated with mutations in the *GJB2* gene. *Hum. Genet.* 106: 399-405.
- WHO - World Health Organization (2000). Deafness and Hearing Impairment. April 2010. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/> (Acesso em: 13 jun. 2011).
- WHO. (2010). World Health Organization. Community Genetics Services: Report of a WHO consultation on Community Genetics in Low-and Middle-income Countries. Geneva, Switzerland.
- Yan D, Park H, Ouyang X, Pandva A, Doi K, Erdenetungalag R, Du L, Matsushiro N, Nance W, Griffith A, Liu X. (2003). Evidence of a founder effect for the 235delC mutation of *GJB2* (connexin 26) in east Asians. *Hum Genet.* 114(1):44-50.
- Yang T, Vidarsson H, Rodfrigo-Blomqvist S, Rosengren S, Enerback S, Smith R. (2007). Transcriptional control of *SLC26A4* is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4). *Am. J. Hum. Genet.* 80(6): 1055-1063.

- Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, e col. (1997). Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in mediterraneans. *Hum. Mol. Genet.* 6: 1605-1609.
- Zonta F, Polles G, Zanotti G, Mammano F. (2012). Permeation pathway of homomeric connexin 26 and connexin 30 channels investigated by molecular dynamics. *J. Biom. Structure & Dynamics* 29 (5): 985-998.

ANEXOS

Anexo I
Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(menores de 18 anos)

ESTUDO: *Estudo epidemiológico e genético da surdez no município de Queimadas, Paraíba.*

Seu (Sua) filho(a) está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração nesse estudo será de muita importância para nós.

Eu , RG , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho(a) nascido(a) em ____ / ____ / ____ , participe do estudo “*Estudo epidemiológico e genético da surdez no município de Queimadas, Paraíba.*” e esclareço que obtive todas as informações necessárias.

Estou ciente de que:

- I) O estudo tem a finalidade de descobrir causas da “*surdez*”, que é um defeito do sistema auditivo.
- II) Será realizada a coleta de até 10 ml de sangue por meio de seringa
- III) A coleta de sangue não causa problemas, exceto dor no momento da introdução da agulha.
- IV) O material colhido será utilizado para obtenção de DNA para estudos de alterações genéticas que causam surdez.
- V) O estudo não influenciará o tratamento de meu (minha) filho(a) e não vai curá-lo(a).
- VI) Tenho a liberdade de desistir da colaboração nesse estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.
- VII) A desistência não causará prejuízo a mim ou a meu (minha) filho(a) e não vai interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VIII) Os resultados obtidos durante esse estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu filho sejam mencionados;
- IX) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final do estudo.
☐ Desejo conhecer os resultados da pesquisa.
☐ Não desejo conhecer os resultados da pesquisa.
- X) Caso tenham sido tiradas fotografias,
☐ concordo que sejam incluídas em publicações científicas
☐ concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde
☐ não concordo que sejam incluídas em qualquer tipo de publicação ou apresentação.
- XI) O material colhido será armazenado sob a guarda do Instituto de Biociências e responsabilidade da Profa. Regina Célia Mingroni Netto, pelo tempo considerado necessário para a identificação e caracterização do gene e de sua mutação ou do mecanismo genético responsável pela surdez em minha família.

São Paulo, de de 20 .

Participante:

Pesquisador: _____

Uirá Souto Melo

Pesquisador e Instituição Responsáveis pelo Armazenamento das Amostras de DNA:

 Dra. Regina Célia Mingroni Netto - CRBio/SP 10.238-01
 Depto de Genética e Biologia Evolutiva
 Instituto de Biociências – USP – fone 11-3091-7478
 e-mail renetto@ib.usp.br

**Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(maiores de 18 anos)**

ESTUDO: *Estudo epidemiológico e genético da surdez no município de Queimadas, Paraíba.*

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 nesse estudo será de muita importância para nós.

Eu (inserir nome, profissão, residente e domiciliado na , portador da Cédula de Identidade, RG , e inscrito no CPF/MF , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar do estudo “***Estudo epidemiológico e genético da surdez no município de Queimadas, Paraíba.***” e esclareço que obtive todas as informações necessárias.

Estou ciente de que:

- XII) O estudo tem a finalidade de descobrir causas da “***surdez***”, que é um defeito do sistema auditivo.
- XIII) Será realizada a coleta de até 10 ml de sangue por meio de seringa
- XIV) Esta coleta ser[á feita apenas para este estudo e em nada influenciará o meu tratamento; não vai me curar; não vai me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue).
- XV) O material colhido será utilizado para obtenção de DNA para estudos de alterações genéticas que causam surdez .
- XVI) Tenho a liberdade de desistir da colaboração nesse estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.
- XVII) A desistência não causará prejuízo a minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico.
- XVIII) Os resultados obtidos durante esse estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- XIX) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final do estudo.
() Desejo conhecer os resultados da pesquisa.
() Não desejo conhecer os resultados da pesquisa.
- XX) Caso tenham sido tiradas fotografias,
() concordo que sejam incluídas em publicações científicas
() concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde
() não concordo que sejam incluídas em qualquer tipo de publicação ou apresentação.
- XXI) O material colhido será armazenado sob a guarda do Instituto de Biociências e responsabilidade da Profa. Regina Célia Mingroni Netto, pelo tempo considerado necessário para a identificação e caracterização do gene e de sua mutação ou do mecanismo genético responsável pela surdez em minha família.

São Paulo, de de 20 .

Participante:

Pesquisador: _____
Uirá Souto Melo

Pesquisador e Instituição Responsáveis pelo Armazenamento das Amostras de DNA:

Dra. Regina Célia Mingroni Netto - CRBio/SP 10.238-01
Depto de Genética e Biologia Evolutiva
Instituto de Biociências – USP – fone 11-3091-7478
e-mail renetto@ib.usp.br

Anexo II: FICHA PARA ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO DOS CASOS DE SURDEZ

DADOS PESSOAIS		
REGISTRO Nº: _____	DATA DA _____	
CONSULTA: _____		
NOME DO PACIENTE: _____		
ENDEREÇO: _____ _____		
TELEFONE: _____		
ENCAMINHADO POR: () 1.DERDIC () 2.HC-IMPLANTE COCLEAR () 3.HC OTORRINO () 4.SURDEZ SÚBITA () 5.I.C. () 6.TANU () 7.OUTROS MÉDICO _____		
DATA NASC.: _____	IDADE: _____	SEXO: () 1=M () 2=F
NATURAL: _____		
OCUPAÇÃO: () 1. Estudante () 2.Outros Qual? _____		
ESCOLARIDADE: () 0.Nenhuma () 1.Fundamental I () 2.Fundamental II () 3.Médio incompleto () 4.Médio completo () 5.Superior incompleto () 6.Superior completo () 7.Pós-graduação		
GRUPO ÉTNICO: () 1.Branco () 2.Pardo () 3.Negro () 4.Oriental		

MÃE: _____		
DATA NASC.: _____	IDADE: _____	
NATURAL: _____		
OCUPAÇÃO: () 1.Estudante () 2.Outros Qual? _____		
ESCOLARIDADE: () 0.Nenhuma () 1.Fundamental I () 2.Fundamental II () 3.Médio incompleto () 4.Médio completo () 5.Superior incompleto () 6.Superior completo () 7.Pós-graduação		
PAI: _____		
DATA NASC.: _____	IDADE: _____	
NATURAL: _____		
OCUPAÇÃO: () 1.Estudante () 2.Outros Qual? _____		
ESCOLARIDADE: () 0.Nenhuma () 1.Fundamental I () 2.Fundamental II () 3.Médio incompleto () 4.Médio completo () 5.Superior incompleto () 6.Superior completo () 7.Pós-graduação		

HISTÓRICO FAMILIAL		
CONSANGUINIDADE PARENTAL: () 1.NÃO	() 2.SIM	
	GRAU: _____	
OUTROS CASOS DE SURDEZ NA FAMÍLIA: () 1.NÃO	() 2.SIM () 3. NÃO	
SABE		

CASOS DE DOENÇAS GENÉTICAS NA FAMÍLIA: () 1.NÃO () 2.SIM

MÃE DO PROPÓSITO TEVE ABORTOS: () 1.NÃO () 2.SIM

(VIDE HEREDOGRAMA PG 5)

CARACTERIZAÇÃO DA SURDEZ

LATERALIDADE: () 1.Unilateral () 2.Bilateral () 3.Não determinada

ÉPOCA EM QUE PERCEBEU O PROBLEMA: () 1.Pré-lingual () 3.Pós-lingual

Idade de início: _____

IDADE EM QUE FOI FEITO O DIAGNÓSTICO: _____

EVOLUÇÃO: () 1.Estacionária () 2.Progressiva () 3.Súbita () 4.Não determinada

TIPO: () 1.Sensorineural () 2.Conduutivo () 3.Misto () 4.Não determinado

GRAU DA PERDA (Davis e Silverman, 1970):

() 1.Leve (21-40dB) () 2.Moderada (41-70dB) () 3.Severa (71-90dB) () 4.Profunda (>91dB)

QUEIXAS DE: ZUMBIDO () 1.NÃO () 2.SIM TONTURA () 1.NÃO () 2.SIM

EXAMES REALIZADOS:

AUDIOMETRIA: () 1.NÃO FEZ () 2.NÃO TROUXE () 2.CÓPIA NA PASTA

BERA/PEATE: () 1.NÃO FEZ () 2.NÃO TROUXE () 2.CÓPIA NA PASTA

EMISSIONES OTO-ACÚSTICAS: () 1.NÃO FEZ () 2.NÃO TROUXE () 2.CÓPIA NA PASTA

EXAMES DE IMAGEM: () 1.NÃO FEZ () 2.NÃO TROUXE () 3.INFORMAÇÃO MÉDICA () 4.CÓPIA NA PASTA

QUAL? _____

MALFORMAÇÃO CÓCLEO-VESTIBULAR () 0.NÃO SEI () 1.NÃO TEM () 2.AQUEDUTO VESTIBULAR ALARGADO () 2.MONDINI () 3.APLASIA DE MICHEL () 4.outra(s) _____

GESTAÇÃO

INTERCORRÊNCIAS: () 1.NÃO () 2.SIM

PRÉ-NATAL: () 1.NÃO () 2.SIM, QUAIS EXAMES? () 1.Rubéola () 2.CMV () 3.Toxoplasmose

() 4.Sífilis () 5.Herpes () 6.HIV () 7. Outros: _____ () 8. Não Sabe

INFECÇÕES MATERNAS: () 1.NÃO () 2.SIM QUAL? _____

USO DE DROGAS e MEDICAMENTOS: () 1.NÃO () 2.SIM Quais? _____

RAIO-X: () 1.NÃO () 2.SIM

OBSERVAÇÕES: _____

PERÍODO PERINATAL

INTERCORRÊNCIAS: () 1.NÃO () 2.SIM

PARTO: () 1.NORMAL () 2.FORCEPS () 3.CESÁRIA Motivo:_____

NASCIMENTO: () 1.TERMO - 37 a 42sem () 2.PRÉ-TERMO - <37sem () 3.PÓS-TERMO - >42sem

Ao nascer: Peso_____ Comprimento_____

Boas condições de vitalidade: () 1.NÃO () 2.SIM

ANOXIA: () 1.NÃO () 2.SIM CIANOSE: () 1.NÃO () 2.SIM

ICTERÍCIA: () 1.NÃO () 2.SIM Banho de luz(Fototerapia): () 1.NÃO () 2.SIM

INCOMPATIBILIDADE DE Rh () 1.NÃO () 2.SIM

FEBRE ALTA: () 1.NÃO () 2.SIM DEFEITOS FÍSICOS: () 1.NÃO () 2.SIM

INCUBADORA: () 1.NÃO () 2.SIM Motivo:_____

UTI neonatal: () 1.NÃO () 2.SIM Motivo:_____

SAÍDA DA MATERNIDADE COM A MÃE: () 1.NÃO Motivo:_____() 2.SIM

OBSERVAÇÕES:_____

EXPOSIÇÃO A FATORES ETIOLÓGICOS AMBIENTAIS

ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS: () 1.NÃO () 2.SIM Quais?_____ () 3.NÃO SABE

OUTRAS DROGAS OTOTÓXICAS: () 1.NÃO () 2.SIM Quais?_____

INFECÇÕES DE ORELHA: () 1.NÃO () 2.SIM DIABETES MELITO: () 1.NÃO () 2.SIM

MENINGITE/MENINGOENCEFALITES: () 1.NÃO () 2.SIM SARAMPO: () 1.NÃO () 2.SIM

CAXUMBA: () 1.NÃO () 2.SIM INFECÇÕES DAS VIAS AÉREAS SUPERIORES: () 1.NÃO () 2.SIM

EXPOSIÇÃO CONSTANTE A RUÍDOS: () 1.NÃO () 2.SIM, por quanto tempo?_____

OUTRAS DOENÇAS: () 1.NÃO () 2.SIM OBS.:_____

INTERNAÇÕES: () 1.NÃO () 2.SIM OBS.:_____

CIRURGIAS: () 1.NÃO () 2.SIM OBS.:_____

DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR

DESENVOLVIMENTO: () 1.NORMAL () 2.ATRASADO

BEBÊ: () 1.FIRME () 2. MOLE

SUSTENTOU O PESCOÇO:_____

SENTOU COM APOIO:_____

SENTOU SEM APOIO:_____

ENGATINHOU:_____

ANDOU: _____

PRIMEIRAS PALAVRAS: _____

HIPÓTESE DIAGNÓSTICA

ETIOLOGIA: () 1.GENÉTICA (HEREDITÁRIA) () 2.AMBIENTAL (ADQUIRIDA) () 3.IDIOPÁTICA

MANIFESTAÇÃO: () NÃO-SINDRÔMICA (isolada) () SINDRÔMICA Qual? _____

() 3.NÃO DETERMINADA

H.D. GENÉTICA: () 1.AR () 2.AD () 3. LIGADO AO X () 4. MITOCONDRIAL

COLETA DE MATERIAL PARA DIAGNÓSTICO/PESQUISA:

Paciente	Registro	Parentesco	Datas das coletas	Sangue/DNA	Saliva/DNA	Cariót.	Sangue/RN A	Saliva/RNA	Outros

INFORMAÇÕES - ACONSELHAMENTO GENÉTICO

PAIS PRETENDEM TER MAIS FILHOS: () 1.NÃO () 2.SIM

MÉTODOS CONTRACEPTIVOS: LAQUEADURA () 1.NÃO () 2.SIM VASECTOMIA () 1.NÃO () 2.SIM

HEREDOGRAMA

Anexo 1: Resultados dos testes moleculares realizados nos indivíduos dos dois municípios.

Registro	Gene/Mutação					Sequência <i>GJB2</i>	Alteração
	<i>GJB2</i>		<i>GJB6</i>		<i>MTRNR1</i> m.A1555G		
	c.35delG	c.167delT	del(<i>GJB6</i> -13S1830)	del(<i>GJB6</i> -13S1854)			
Q001	-/-	-/-	-/-	-/-	-	X	-34T>C/Nl
Q002	+/-	-/-	-/-	-/-	-	X	c.35delG/Nl
Q003	-/-	-/-	-/-	-/-	-	X	-15C>T
Q004	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q005	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q006	+/+	-/-	-/-	-/-	-	X	Nl/Nl
Q007	+/+	-/-	-/-	-/-	-	X	Nl/Nl
Q008	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q009	+/-	-/-	-/-	-/-	-	X	c.35delG/-34T>C
Q010	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q011	-/-	-/-	-/-	-/-	-	X	Nl/Nl
Q012	+/-	-/-	-/-	-/-	-	X	c.35delG/Nl
Q013	+/-	-/-	-/-	-/-	-	X	c.35delG/Nl
Q014	+/+	-/-	-/-	-/-	-	X	Nl/Nl
Q017	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q018	-/-	-/-	-/-	-/-	-	X	-34T>C/Nl
Q022	-/-	-/-	-/-	-/-	-	X	Nl/Nl
Q025	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q027	-/-	-/-	-/-	-/-	-	X	-34T>C/Nl
Q028	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q030	-/-	-/-	-/-	-/-	-	X	Nl/Nl
Q031	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q033	-/-	-/-	-/-	-/-	-	X	Nl/Nl
Q037	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q038	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q040	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	Nl/Nl
Q041	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	Nl/Nl
Q042	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	Nl/Nl
Q045	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	Nl/Nl
Q046	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q048	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q049	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	Nl/Nl
Q054	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	Nl/Nl
Q055	+/+	-/-	-/-	-/-	-	x	Nl/Nl
Q056	+/+	-/-	-/-	-/-	-	x	Nl/Nl
Q057	+/+	-/-	-/-	-/-	-	x	Nl/Nl
Q058	+/+	-/-	-/-	-/-	-	x	Nl/Nl
Q060	+/+	-/-	-/-	-/-	-	x	Nl/Nl
Q061	+/-	-/-	-/-	-/-	-	x	c.35delG/-34T>C
Q064	+/+	-/-	-/-	-/-	-	x	Nl/Nl
Q065	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	-34T>C/Nl
Q066	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	Nl/Nl
Q067	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q069	-/-	-/-	-/-	-/-	-		

Legenda: +/+ :portador da mutação em homozigose; +/- : portador da mutação em heterozigose; -/- : não portador da mutação;
 + : portador da mutação; - : não portador da mutação; x : gene *GJB2* sequenciado; Nl : Normal (mutação não detectada).

Registro	Gene/Mutação					Sequência <i>GJB2</i>	Alteração
	<i>GJB2</i>		<i>GJB6</i>		<i>MTRNR1</i>		
	c.35delG	c.167delT	del(<i>GJB6</i> -13S1830)	del(<i>GJB6</i> -13S1854)	m.A1555G		
Q070	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q071	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q072	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q073	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	79G>A/NI
Q026	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	-6T>A/NI
Q074	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q075	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q076	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q077	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q078	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q079	+/-	-/-	-/-	-/-	-	x	c.35delG/NI
Q081	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q082	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q083	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q084	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q085	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q086	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q087	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q090	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q092	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q093	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q096	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q097	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q098	+/+	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q099	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q100	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q101	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q103	+/+	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q104	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	-34T>C/NI
Q106	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q107	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q108	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q109	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q110	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q111	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q112	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q113	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q114	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q019	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q117	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q118	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q119	+/-	-/-	-/-	-/-	-	x	c.35delG/NI
Q120	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q122	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q123	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q124	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q125	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q127	-/-	-/-	-/-	-/-	-		

Legenda: +/+ :portador da mutação em homozigose; +/- : portador da mutação em heterozigose; -/- : não portador da mutação;
+ : portador da mutação; - : não portador da mutação; x : gene *GJB2* sequenciado; NI : Normal (mutação não detectada).

Registro	Gene/Mutação					Sequência	Alteração
	GJB2		GJB6		MTRNR1		
	c.35delG	c.167delT	del(GJB6-13S1830)	del(GJB6-13S1854)	m.A1555G		
						GJB2	
Q128	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q129	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q130	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q131	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q132	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q102	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q052	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q053	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
Q051	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q044	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q063	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	-34T>C/NI
Q133	+/-	-/-	-/-	-/-	-	x	c.35delG/-34T>C
Q138	+/+	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
Q139	+/+	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
GB01	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	79G>A/NI
GB02	+/-	-/-	-/-	+/-	-	x	c.35delG/NI
GB03	+/-	-/-	-/-	+/-	-	x	c.35delG/NI
GB04	+/-	-/-	-/-	+/-	-	x	c.35delG/NI
GB05	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	79G>A/NI
GB06	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB07	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB08	+/+	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
GB09	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
GB10	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	79G>A/NI
GB11	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	-34T>C/NI
GB12	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB13	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
GB14	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
GB15	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB16	-/-	-/-	-/-	+/-	-	x	79G>A/NI
GB17	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB18	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
GB19	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB20	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB21	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB22	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB23	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
GB24	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB25	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB26	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
GB27	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
GB28	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB29	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB30	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB31	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI
GB32	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB33	-/-	-/-	-/-	-/-	-		
GB34	-/-	-/-	-/-	-/-	-		

Legenda: +/+ :portador da mutação em homozigose; +/- : portador da mutação em heterozigose; -/- : não portador da mutação;
+ : portador da mutação; - : não portador da mutação; x : gene *GJB2* sequenciado; NI : Normal (mutação não detectada).

Registro	Gene/Mutação						Sequência	Alteração
	GJB2		GJB6		MTRNR1			
	c.35delG	c.167delT	del(GJB6-13S1830)	del(GJB6-13S1854)	m.A1555G			
GJB2								
GB35	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI	
GB36	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB37	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB38	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI	
GB39	+/-	-/-	-/-	-/-	-	x	c.35delG/71G>A	
GB40	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB41	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	79G>A/NI	
GB42	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	71G>A/NI	
GB43	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB44	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB45	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI	
GB46	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI	
GB47	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB48	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI	
GB49	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB50	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB51	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	-34T>C/NI	
GB52	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB53	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB54	+/-	-/-	-/-	-/-	-	x	c.35delG/71G>A	
GB55	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	-15C>T	
GB56	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI	
GB57	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	79G>A/NI	
GB58	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	-34T>C/NI	
GB59	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB60	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB61	+/-	-/-	-/-	-/-	-	x	c.35delG/NI	
GB62	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI	
GB63	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI	
GB64	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	-34T>C/NI	
GB65	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB66	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB67	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB68	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB69	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB70	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB71	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	NI/NI	
GB72	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB73	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB74	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	-34T>C/NI	
GB75	-/-	-/-	-/-	-/-	-			
GB76	-/-	-/-	-/-	-/-	-	x	79G>A/NI	

Legenda: +/- :portador da mutação em homozigose;

+/- : portador da mutação em heterozigose;

-/- : não portador da mutação;

+ : portador da mutação;

- : não portador da mutação;

x : gene *GJB2* sequenciado;

NI : Normal (mutação não detectada).

Anexo 2: Tabela com a provável etiologia da surdez em cada família.

Família	Registro	Resultado da Triagem Molecular	Provável Etiologia	Provável mecanismo
FamGB1	GB01	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamGB2	GB02	c.35delG/del-D13S1854	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
	GB03	c.35delG/del-D13S1854	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
	GB04	c.35delG/del-D13S1854	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
FamGB3	GB05	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
	GB06	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
	GB07	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
	GB76	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
FamGB4	GB08	c.35delG/c.35delG	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
FamGB5	GB09	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamGB6	GB10	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamGB7	GB11	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamGB8	GB12	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante, Síndrome de Waardenburg I
FamGB9	GB13	NI/NI	Ambiental	Provável rubéola na gravidez
FamGB10	GB14	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamGB11	GB15	NI/NI	Ambiental	Provável rubéola na gravidez
FamGB12	GB16	del-D13S1854/?	Genética	Autossômico Dominante/Mitocondrial
	GB17	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante/Mitocondrial
FamGB13	GB18	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
	GB19	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
FamGB14	GB20	NI/NI	Idiopático	
FamGB15	GB21	NI/NI	Idiopático	
FamGB16	GB22	NI/NI	Idiopático	
FamGB17	GB23	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
	GB24	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
	GB25	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
FamGB18	GB26	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
	GB30	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
FamGB19	GB27	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
	GB28	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
	GB29	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
FamGB20	GB31	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
	GB67	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
	GB68	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
FamGB21	GB32	NI/NI	Idiopático	
FamGB22	GB33	NI/NI	Idiopático	
FamGB23	GB34	NI/NI	Idiopático	
FamGB24	GB35	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
	GB36	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
	GB37	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
FamGB25	GB38	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamGB26	GB39	c.35delG/p.W24X	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
FamGB27	GB40	NI/NI	Idiopático	
FamGB28	GB41	NI/NI	Idiopático	

FamGB29	GB42	p.W24X/?	Idiopático	
FamGB30	GB43	NI/NI	Idiopático	
FamGB31	GB44	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
FamGB32	GB45	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamGB33	GB46	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo/Dominante/Mitocondrial
	GB47	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo/Dominante/Mitocondrial
	GB72	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo/Dominante/Mitocondrial, com possível Retardo Mental
FamGB34	GB48	NI/NI	Idiopático	
FamGB35	GB49	NI/NI	Idiopático	
FamGB36	GB50	NI/NI	Idiopático	
FamGB37	GB51	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante/Mitocondrial
FamGB38	GB52	NI/NI	Ambiental	Relato de meningite aos 4 anos
FamGB39	GB53	NI/NI	Idiopático	
FamGB40	GB54	c.35delG/p.W24X	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
FamGB41	GB55	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamGB42	GB56	NI/NI	Idiopático	
FamGB43	GB57	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamGB44	GB58	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
	GB59	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
	GB60	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamGB45	GB62	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
FamGB46	GB63	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
FamGB47	GB64	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
	GB65	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamGB48	GB66	NI/NI	Idiopático	
FamGB49	GB69	NI/NI	Idiopático	
FamGB50	GB70	NI/NI	Idiopático	
FamGB51	GB71	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Síndrome de Usher
FamGB52	GB73	NI/NI	Idiopático	
FamGB53	GB61	c.35delG/?	Idiopático	
FamGB54	GB74	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo ou Ligado ao X
FamGB55	GB75	NI/NI	Idiopático	

Anexo 3: Tabela com a provável etiologia da surdez por família.

Família	Registro	Resultado da Triagem Molecular	Provável Etiologia	Provável mecanismo
FamQ1	Q001	NI/NI	Idiopático	Aparente Retardo Mental
FamQ2	Q002	c.35delG/?	Idiopático	
FamQ3	Q003	NI/NI	Idiopático	
FamQ4	Q004	NI/NI	Idiopático	
FamQ5	Q005	NI/NI	Idiopático	
FamQ6	Q006	c.35delG/c.35delG	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
	Q007	c.35delG/c.35delG	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
	Q055	c.35delG/c.35delG	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
	Q056	c.35delG/c.35delG	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
	Q057	c.35delG/c.35delG	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
	Q058	c.35delG/c.35delG	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
	Q060	c.35delG/c.35delG	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
FamQ7	Q008	NI/NI	Idiopático	
FamQ8	Q009	c.35delG/?	Idiopático	
FamQ9	Q010	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, síndrome de Usher
FamQ10	Q011	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
FamQ11	Q012	c.35delG/?	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
	Q013	c.35delG/?	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
	Q014	c.35delG/c.35delG	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
FamQ12	Q017	NI/NI	Idiopático	
FamQ13	Q018	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
	Q019	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamQ14	Q022	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
	Q025	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamQ15	Q027	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
FamQ16	Q028	NI/NI	Idiopático	Aparente Retardo Mental
FamQ17	Q030	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
FamQ18	Q031	NI/NI	Idiopático	
FamQ19	Q033	NI/NI	Ambiental	Relato de prematuridade e longo tempo na incubadora
FamQ20	Q037	NI/NI	Ambiental	Provável rubéola na gravidez
FamQ21	Q038	NI/NI	Ambiental	Provável rubéola na gravidez
FamQ22	Q040	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
	Q084	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamQ23	Q041	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
FamQ24	Q042	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamQ25	Q045	NI/NI	Genética	Ligado ao X
FamQ26	Q046	NI/NI	Ambiental	Provável rubéola na gravidez
FamQ27	Q048	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamQ28	Q049	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
FamQ29	Q052	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
	Q053	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamQ30	Q051	NI/NI	Idiopático	Diagnóstico de Polineuropatia
FamQ31	Q026	NI/NI	Idiopático	
FamQ32	Q054	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia

FamQ33	Q061	c.35delG/?	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamQ34	Q064	c.35delG/c.35delG	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
	Q063	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamQ35	Q065	NI/NI	Idiopático	
FamQ36	Q066	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
FamQ37	Q067	NI/NI	Ambiental	Relato de prematuridade e pneumonia
FamQ38	Q069	NI/NI	Ambiental	Relato de meningite aos 5 anos
FamQ39	Q070	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
FamQ40	Q071	NI/NI	Idiopático	
FamQ41	Q072	NI/NI	Idiopático	
FamQ42	Q073	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante/Mitocondrial
FamQ43	Q074	NI/NI	Idiopático	
FamQ44	Q075	NI/NI	Idiopático	
FamQ45	Q076	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
	Q077	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
	Q078	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamQ46	Q079	c.35delG/?	Idiopático	
FamQ47	Q081	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamQ48	Q082	NI/NI	Idiopático	Aparente Retardo Mental
FamQ49	Q083	NI/NI	Idiopático	
FamQ50	Q085	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante/Mitocondrial
FamQ51	Q086	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamQ52	Q087	NI/NI	Idiopático	
FamQ53	Q090	NI/NI	Idiopático	
FamQ54	Q092	NI/NI	Idiopático	
FamQ55	Q093	NI/NI	Ambiental	Relato de complicações perinatais
FamQ56	Q096	NI/NI	Idiopático	
FamQ57	Q097	NI/NI	Idiopático	
FamQ58	Q098	c.35delG/c.35delG	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
FamQ59	Q099	NI/NI	Idiopático	
FamQ60	Q100	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
	Q118	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
	Q119	c.35delG/?	Genética	Autossômico Dominante
	Q120	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
	Q123	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
	Q124	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
FamQ61	Q101	NI/NI	Idiopático	
FamQ62	Q103	c.35delG/c.35delG	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
FamQ63	Q104	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
FamQ64	Q106	NI/NI	Ambiental	Relato de meningite
FamQ65	Q107	NI/NI	Ambiental	Relato de tempo na incubadora por 27 dias
FamQ66	Q108	NI/NI	Ambiental	Relato de anóxia
FamQ67	Q109	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamQ68	Q110	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamQ69	Q111	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
	Q112	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante

FamQ70	Q113	NI/NI	Ambiental	Relato de meningite
FamQ71	Q114	NI/NI	Idiopático	
FamQ72	Q117	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
	Q127	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
	Q128	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
	Q132	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante
FamQ73	Q122	NI/NI	Idiopático	
FamQ74	Q129	NI/NI	Idiopático	
FamQ75	Q130	NI/NI	Genética	Autossômico Dominante/Mitocondrial
FamQ76	Q102	NI/NI	Idiopático	
FamQ77	Q044	NI/NI	Genética	Autossômico Recessivo, Genealogia
FamQ78	Q133	c.35delG/?	Idiopático	
FamQ79	Q138	c.35delG/c.35delG	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
	Q139	c.35delG/c.35delG	Genética	Autossômico Recessivo, DFNB1
FamQ80	Q125	NI/NI	Idiopático	
FamQ81	Q131	NI/NI	Ambiental	Provável rubéola na gravidez

Anexo 4: Genealogias com resultado da análise de cinco marcadores de microssatélites localizados próximos ao gene da Pendrina.

Continuação do Anexo 4: Genealogias com os cinco marcadores localizados próximos ao gene da Pendrina.

Fam5

Resultado: Não compatível com ligação à pendrina

Fam6

Resultado: Compatível com ligação à pendrina

Fam7

Resultado: Não compatível com ligação à pendrina

Continuação do Anexo 4: Genealogias com os cinco marcadores localizados próximos ao gene da Pendrina.

Fam8

Resultado: Não compatível com ligação à pendrina

Fam9

Resultado: Não compatível com ligação à pendrina

Fam10

Resultado: Não compatível com ligação à pendrina

Fam11

Resultado: Não compatível com ligação à pendrina

Continuação do Anexo 4: Genealogias com os cinco marcadores localizados próximos ao gene da Pendrina.

Fam12

Resultado: Não compatível com ligação à pendrina

Fam13

Resultado: Compatível com ligação à pendrina

Fam14

Resultado: Não compatível com ligação à pendrina

Fam15

Resultado: Não compatível com ligação à pendrina

Continuação do Anexo 4: Genealogias com os cinco marcadores localizados próximos ao gene da Pendrina.

Fam16

Resultado: Não compatível com ligação à pendrina

Fam17

Resultado: Não compatível com ligação à pendrina

Fam18

Resultado: Não compatível com ligação à pendrina

Fam19

Resultado: Não compatível com ligação à pendrina

Fam20

Resultado: Não compatível com ligação à pendrina

Fam21

Resultado: Não compatível com ligação à pendrina

Continuação do Anexo 4: Genealogias com os cinco marcadores localizados próximos ao gene da Pendrina.