

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Otorrinolaringologia

DFNB1 – Surdez Hereditária Neurosensorial Associada a Mutações nos Genes das Conexinas

Catarina de Jesus dos Santos-Jorge

Novembro'2018

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Otorrinolaringologia

DFNB1 – Surdez Hereditária Neurosensorial Associada a Mutações nos Genes das Conexinas

Catarina de Jesus dos Santos-Jorge

Orientado por:

Dr. Marco António Alveirinho Cabrita Simão

Novembro'2018

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família pelo apoio, não só na realização deste trabalho, mas sempre.

Seguidamente, quero agradecer ao Dr Marco Simão por ter sido o meu orientador neste trabalho final de mestrado.

E por fim, quero também agradecer ao Professor Óscar Dias pela disponibilidade, pela ajuda, e pela sua forma incentivante de estar no ensino.

Resumo

A surdez é a deficiência sensorial mais comum e afecta cerca de 466 milhões de pessoas em todo o mundo, das quais 34 milhões são crianças.

Apesar de a surdez hereditária poder estar associada a causas adquiridas, estima-se que, de todos os casos de surdez, mais de 50% tenha uma causa genética, tendo já sido identificados mais de 100 genes em humanos associados a esta patologia.

A surdez não sindrómica, corresponde a cerca de 70% dos casos congénitos e destes, cerca de 80% está associado a um padrão de hereditariedade autossómico recessivo. Neste contexto, o locus DFNB1, que inclui os genes GJB2 e GJB6, que codificam as conexinas 26 e 30, associa-se a mais de 50% dos casos.

De forma a diagnosticar o mais precocemente possível estes doentes, está implementado, na maioria dos países desenvolvidos, um rastreio neonatal auditivo. Adicionalmente, recorre-se cada vez mais ao diagnóstico molecular que, para além de outras vantagens, permite identificar a etiologia nos casos de surdez genética.

Actualmente, os implantes cocleares constituem uma opção segura e eficaz de reabilitação dos doentes com surdez severa a profunda neuro-sensorial. No entanto, uma maior compreensão dos mecanismos genéticos moleculares subjacentes a esta patologia possibilita o desenvolvimento de novas terapias, nomeadamente a génica coclear.

Palavras-chave: surdez, DFNB1, conexinas, GJB2, GJB6

Abstract

Deafness is the most common sensory impairment and affects about 466 million people worldwide, of which 34 million are children.

Although hereditary deafness may be associated with acquired causes, it is estimated that, of all cases of deafness, more than 50% have a genetic cause, having already been identified more than 100 genes in humans associated with this pathology.

Non-syndromic deafness accounts for about 70% of congenital cases and of which about 80% are associated with an autosomal recessive inheritance pattern. In this context, the DFNB1 locus, which includes the GJB2 and GJB6 genes, that encode the 26 and 30 connexins, is associated with more than 50% of the cases.

In order to diagnose these patients as early as possible, a neonatal auditory screening test is implemented in most developed countries. In addition, molecular diagnosis is increasingly used, which, in addition to other advantages, makes it possible to identify the etiology in cases of genetic deafness.

Currently, cochlear implants are a safe and effective option for the rehabilitation of patients ranging from severe to profound sensorineural deafness. However, a better understanding of the molecular genetic mechanisms underlying this pathology is enabling the development of new therapies such as cochlear genetics.

Key words: deafness, DFNB1, connexins, GJB2, GJB6

Índice

<i>Introdução</i>	<i>8</i>
<i>Prevalência</i>	<i>8</i>
<i>Classificação da surdez</i>	<i>9</i>
<i>Causas de surdez.....</i>	<i>9</i>
• <i>Causas adquiridas</i>	<i>9</i>
• <i>Causas genéticas.....</i>	<i>10</i>
<i>Surdez síndrômica</i>	<i>10</i>
<i>Surdez não síndrômica</i>	<i>10</i>
<i>Conexinas</i>	<i>11</i>
• <i>Conexina 26</i>	<i>13</i>
• <i>Conexina 30</i>	<i>14</i>
• <i>Portugal</i>	<i>15</i>
<i>Apresentação clínica.....</i>	<i>16</i>
<i>Relação genótipo-fenótipo</i>	<i>16</i>
<i>Rastreio auditivo</i>	<i>17</i>
<i>Diagnóstico genético</i>	<i>18</i>
<i>Diagnóstico pré-natal e pré-implantação</i>	<i>20</i>
<i>Aconselhamento genético.....</i>	<i>20</i>
• <i>Risco familiar</i>	<i>21</i>
<i>Implante coclear</i>	<i>22</i>
• <i>Funcionamento do implante.....</i>	<i>22</i>
• <i>Candidatos ao implante.....</i>	<i>23</i>
• <i>Rapidez da intervenção e da implantação bilateral</i>	<i>23</i>
• <i>Resultados do implante</i>	<i>23</i>
<i>Novas terapias.....</i>	<i>24</i>
<i>Conclusão</i>	<i>26</i>
<i>Bibliografia.....</i>	<i>27</i>

Introdução

A surdez corresponde a uma redução total ou parcial da capacidade de um indivíduo detectar som. É a deficiência sensorial mais comum e afecta cerca de 466 milhões de pessoas em todo o mundo, das quais 34 milhões são crianças. [1]

De uma forma geral, a prevalência da surdez aumenta com a idade, o que reflecte a importância do impacto quer dos factores genéticos, quer dos ambientais. [2] O número crescente de famílias com surdez com idade de instalação tardia demonstra que a influência genética tem sido subestimada. [3]

A surdez congénita corresponde à perda ou ausência da capacidade auditiva ao nascimento, sendo uma das patologias crónicas mais frequentes nas crianças. [4]

As implicações da surdez congénita ou da surdez precocemente adquirida relacionam-se com o desenvolvimento da linguagem e da fala, desempenho escolar, capacidade de comunicação, cognição e desenvolvimento sócio-emocional [5] [6]. Assim, de forma a melhorar o prognóstico, é essencial identificar as crianças com perda auditiva e implementar uma intervenção terapêutica precoce. Em Portugal, é realizado o Rastreio Auditivo Neonatal Universal. [6]

O objetivo deste trabalho é de sistematizar a informação disponível na literatura relativamente ao panorama actual da surdez congénita, nomeadamente da surdez hereditária neurosensorial associada a mutações nos genes das conexinas.

Prevalência

Estima-se que 1 em cada 2000 recém-nascidos sofra de surdez congénita. Destes, 70% dos casos correspondem a surdez não síndrómica, cerca de 80% são herdados de forma autossómica recessiva e 50% tem como causa mutações no gene GJB2. Tendo em conta estes dados, a prevalência estimada na população geral da surdez congénita não síndrómica associada ao gene GJB2 é de 14:100000. [7]

Classificação da surdez

A surdez pode ser classificada quanto ao tipo, a idade de aparecimento e a gravidade. [2]

Quanto ao **tipo**, podemos classificar a surdez em condutiva, neurosensorial ou mista. A primeira, a condutiva, refere-se a alterações ao nível do ouvido externo e/ou nos ossículos do ouvido médio. A surdez neurosensorial refere-se a alterações na funcionalidade das estruturas internas do ouvido, como a cóclea e o nervo auditivo [3]. A surdez mista corresponde a uma sobreposição dos dois tipos supra descritos [2].

Relativamente à **idade** de aparecimento, a surdez pode ser classificada em pré-natal, peri-natal e pós-natal. E, relativamente à relação com a **aquisição linguística**, em pré-lingual, se surge antes do desenvolvimento da linguagem. Mais de 50% dos casos de surdez pré-lingual são de natureza hereditária, sendo os restantes 40-50% secundários a factores ambientais, como infecções e iatrogenia. E, por oposição, a surdez pós-lingual ocorre após o desenvolvimento da linguagem [2].

Quanto ao **grau**, é possível quantificar a perda de capacidade de percepção do som através da realização de um audiograma, no qual a unidade de medida utilizada para a intensidade dos sons é o Decibel, e para a frequência é o Hertz. Uma perda entre os 26 e os 40 dB corresponde a uma surdez ligeira, entre os 41 e os 55dB é moderada, entre os 56 e os 70 é moderada a grave, entre os 71 e os 90 é grave e, superior a 90dB é profunda [2].

Causas de surdez

Na investigação da surdez, devem-se ter em conta as causas adquiridas, genéticas e combinações de ambas [2].

- **Causas adquiridas**

A surdez pediátrica adquirida deve-se a factores ambientais, como a prematuridade, exposição a fármacos ototóxicos, trauma e infecções [8]. Estas últimas podem ser pré-

natais, causadas por microorganismos do grupo TORCH (toxoplasmose, rubéola, CMV e herpes), ou pós-natais, como meningites bacterianas [2]. Nos países desenvolvidos, o CMV, é o principal agente de infecção congénita, podendo afectar de 0,2 a 2% dos recém-nascidos e cursar com um quadro clínico muito variável e de difícil diagnóstico [9] [2].

No caso dos adultos, a surdez adquirida é geralmente associada a factores ambientais, como a exposição ao ruído, ou associada à idade – presbiacusia. Nos países ocidentais, cerca de 10% da população padece de surdez com gravidade suficiente para interferir com a capacidade de comunicação, sendo que esta percentagem sobe para 40% quando se refere a indivíduos com mais de 65 anos [2].

- **Causas genéticas**

Estima-se que, de todos os casos de surdez, mais de 50% tenha uma causa genética, estando a maioria associada a mutações de um único gene, ou seja, com uma transmissão monogénica [10].

Surdez síndrómica

Dentro das causas da surdez hereditária, estas podem estar **associadas a síndromes**, ou seja, têm características clínicas distintivas. Estas correspondem a cerca de 30% dos casos e podem ser classificadas em condutivas, neurosensoriais ou mistas [11] [2].

As formas síndrómicas de surdez, exceptuando embriopatias causadas, por exemplo, por infecções a rubéola, CMV ou toxoplasmose, têm maioritariamente uma origem genética, tendo já sido identificados mais de 100 genes associados [3].

Surdez não síndrómica

A surdez que não está associada a síndromes, a **surdez não síndrómica**, corresponde a cerca de 70% dos casos congénitos, e tem uma natureza quase exclusivamente neurosensorial [11] [2] [3].

A maioria dos casos, cerca de 80%, associa-se a um padrão de hereditariedade autossómico recessivo (DFNB); 17% associa-se a hereditariedade autossómica dominante (DFNA), 1-2% tem hereditariedade ligada ao X (DFN) e menos de 1% associa-se a genes mitocondriais [10].

Ambiental ~25%		
Etiologia Desconhecida ~25%		
Genética ~50%	Sindrômica ~30%	
	Não sindrômica ~70%	Mitocondrial <1%
		Ligada ao X ~2%
		Autossômica dominante ~17%
		Autossômica recessiva ~80%

Quadro 1 – Coluna 1: causas de surdez congênita; coluna 2: presença ou ausência de outras manifestações dentro das causas genéticas; coluna 3: modo de hereditariedade da surdez não sindrômica. Quadro adaptado de Schrijver, I., [2004].

Dos genes responsáveis por surdez não sindrômica, foram identificados, até à data, 71 com hereditariedade autossômica recessiva, 44 com hereditariedade autossômica dominante e 5 ligada ao X [12].

Apesar de ter sido identificada uma relação entre a surdez não sindrômica transmitida de forma autossômica recessiva e mais de 90 locus [12], o locus **DFNB1**, localizado no cromossoma 13q11-12, associa-se a mais de 50% dos casos [13], [14]. Este locus, inclui os genes **GJB2** e **GJB6**, que codificam duas proteínas transmembranares: as **conexinas 26 e 30**, respectivamente, que são expressas ao nível da cóclea, sendo importantes no processo auditivo [13], [6], [2], [8], [15].

As mutações no **gene GJB2**, herdadas maioritariamente de um modo autossômico recessivo, são responsáveis por mais de 50% dos casos, constituindo a causa mais comum de surdez de etiologia genética não sindrômica neuro-sensorial pré-lingual [16] [17] [15].

Desta forma, a surdez não sindrômica autossômica recessiva devida a mutações no gene GJB2 designa-se por DFNB1 [18].

Conexinas

As conexinas são proteínas de membrana expressas na maioria dos vertebrados superiores, tendo sido, até à data, identificados 21 genes humanos diferentes que as codificam [16].

Quanto à topologia, as conexinas têm quatro domínios transmembranares ligados por duas ansas extracelulares e uma intracelular, um domínio amino terminal (-NH₂) e um domínio carboxilo terminal (-COOH) [19].

Seis conexinas sofrem oligomerização intra-celularmente para formar uma unidade de canal gap junction, um conexão ou hemicanal, que é transportada para a membrana plasmática. Seguidamente, os conexões de duas células adjacentes alinham-se simetricamente de maneira a formar um **poro/canal intercelular**.

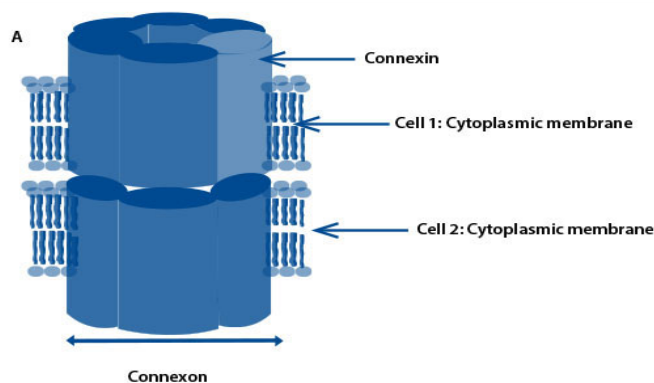


Imagem 1: As conexinas formam canais intercelulares organizando-se em grupos de seis de modo a formar uma estrutura designada por conexão. Dois conexões de células adjacentes formam uma gap junction. Imagem retirada de Wonkam, A *et al.* [2015].

Estas junções são responsáveis pela comunicação intercelular e permitem a troca de pequenos íões, mensageiros secundários e metabolitos, entre células adjacentes, essenciais para a homeostase dos tecidos, crescimento e diferenciação celulares [20] [21].

Os conexões podem ser compostos por conexinas do mesmo ou de diferentes tipos e, devido a esta capacidade combinativa, mutações patogénicas nos genes que codificam as conexinas podem produzir diferentes outcomes clínicos [17]. Foram já identificados 9 genes implicados em doenças hereditárias na espécie humana, como cataratas, doença de Charcot-Marie-Tooth, displasia oculodentodigital e surdez síndrómica e não síndrómica. Das patologias referidas, a surdez é a mais importante em termos de frequência na população humana [16] [22] [19] [20].

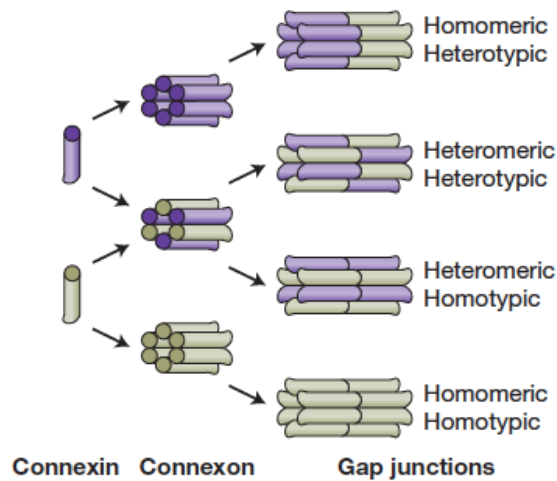


Imagem 2: O diagrama mostra como as conexinas podem organizar-se para formar hemicanais (conexões) na membrana da célula, como estes últimos podem formar canais inter-celulares (gap junctions) e a terminologia usada para as diferentes combinações. Os conexões podem ser homoméricos ou heteroméricos e as gap junctions podem ser homotípicos ou heterotípicos. Imagem retirada de Lee, J.R; White, T.W. [2009].

As conexinas mencionadas, 26 e 30, são altamente expressas na cóclea, entre as células de suporte, e pensa-se que têm um papel fundamental na recirculação dos iões de potássio das células ciliadas de volta para a endolinfa, sendo essenciais no processo auditivo [14] [19] [15] [23].

- **Conexina 26**

A conexina 26 é uma proteína codificada pelo gene GJB2, que é o mais frequentemente mutado, sendo responsável por cerca de 50% dos casos de surdez neurosensorial autossómica recessiva.

As observações feitas num estudo mostram que, em ratinhos, as mutações no GJB2 afectam predominantemente o normal desenvolvimento do epitélio sensorial na cóclea [24].

A maioria das mutações no gene da conexina 26 e que se associam a surdez não sindrómica são **deleções** que levam a frameshifts, e **mutações nonsense** que levam a proteínas precocemente truncadas. Para além disso, a maioria das mutações no gene GJB2 resultam essencialmente num knockout do gene em doentes homozigóticos, com perda completa da função da conexina 26, resultando em surdez [25].

Os tipos e as frequências das mutações são fortemente influenciados pela etnia da população em causa [14].

Apesar de estarem descritas mais de 100 mutações no gene GJB2, a variante 35delG representa mais de 70% de todas as mutações patológicas em muitas populações, sendo a mais frequentemente detectada na população caucasiana, com uma prevalência de portadores de 1 a 5% [11] [14]. Nesta, ocorre deleção de seis repetições G na posição 35 (35delG), que leva a uma frameshift e, como tal, à formação de um codão stop prematuro na posição 13, o que leva a uma perda completa da função da proteína [26] [25].

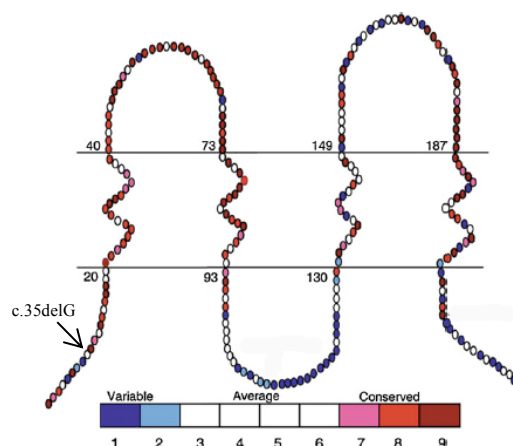


Imagem 3: Representação esquemática da cadeia de aminoácidos da conexina 26. A seta identifica o local da mutação c.35delG associada ao GJB2. O índice de cores representa os vários níveis de conservação dos aminoácidos da Cx26. Imagem adaptada de Gonçalves *et al.* [2013].

Na população Judia Ashkenazi, uma das mutações mais frequentes é a167delT, na população asiática é a 235delC e na população africana é a Arg143Trp [14] [26].

Estas mutações nonsense só resultam em surdez não síndrômica e sugerem que a perda completa de função causa surdez não síndrômica associada ao gene GJB2 [25] [27].

- **Conexina 30**

A conexina 30 é codificada pelo gene GJB6, localizado a montante do GJB2, no locus DFNB1 [14]. É muito semelhante à conexina 26 (com uma semelhança de 76%), sendo ambas expressas na cóclea [26].

Estudos realizados em ratinhos knockout para a conexina 30 indicam que a ausência de potencial endococlear, durante o desenvolvimento coclear, é a principal causa de surdez [24].

Apesar de as mutações bialélicas no gene GJB2 representarem cerca de 50% dos casos de surdez não sindrômica autossômica recessiva, existem casos com uma única mutação neste gene que não são explicados desta forma [14] e a identificação de famílias surdas associadas ao 13q12 mas negativas para mutações no gene GJB2 sugeriu a presença de outros genes causadores de surdez nesta região [28].

Assim, mutações no gene GJB6 podem explicar os casos em que apenas foi identificada uma mutação em GJB2, sugerindo um padrão de hereditariedade digênico [26] [29]. Isto significa que quando um indivíduo apresenta duas mutações, em cada um de dois genes diferentes, a combinação dessas alterações genéticas tem como consequência um fenótipo que não surgiria caso o indivíduo fosse portador apenas de uma das mutações.

As mutações digênicas heterozigóticas nas conexinas 26 e 30, nos genes GJB2 e GJB6, respectivamente, constituem a segunda causa mais frequente de surdez recessiva em humanos, no entanto, o mecanismo pelo qual estas mutações causam surdez permanece pouco claro [30].

- **Portugal**

Num estudo realizado em Portugal, em 57 crianças com surdez não sindrômica, concluiu-se que a mutação no gene GJB2 é a causa mais frequente de surdez pré-lingual transmitida de forma autossômica recessiva, tendo sido detectada em 42% dos doentes e, para além disso, 87% dessas mutações corresponderam a 35delG. Adicionalmente, não foram encontradas mutações GJB6 [31].

Outro estudo, também realizado em Portugal, com 117 crianças, concluiu que a mutação 35delG foi a mais frequentemente encontrada, correspondendo a 85% dos alelos mutados. Sendo que apenas dois indivíduos, heterozigóticos para 35delG, apresentavam deleções que envolviam o GJB6, o que confirma a baixa prevalência destas mutações na população portuguesa [32].

Apresentação clínica

A surdez não sindrômica associada a mutações no locus DFNB1 está presente, na maioria dos casos, desde o nascimento, no entanto, não se deve assumir que é congênita em todos os casos uma vez que existem casos reportados de crianças com respostas normais ao rastreio neonatal que desenvolveram surdez severa em poucos meses, tendo sido estimada a frequência de não penetrância ao nascimento em 6,9% [17].

É mais frequentemente pré-lingual, geralmente não progressiva, tem uma natureza neuro-sensorial, e pode ser de gravidade desde ligeira a profunda [7] [17]. Apesar de geralmente não progressiva, a surdez pode ser progressiva e, em casos raros, flutuante [33].

Geralmente não se associa a sintomas de alterações vestibulares, como vertigens e tonturas, logo, as crianças com esta patologia, adquirem as competências motoras dependentes do equilíbrio nas idades apropriadas [7]. No entanto, existem dados que sugerem a existência de disfunção vestibular, sendo que uma compensação central pode provavelmente explicar a ausência de sintomas [17].

Exceptuando a incapacidade auditiva, estes indivíduos são saudáveis e têm uma esperança média de vida semelhante à dos indivíduos sem a mutação [7].

Relação genótipo-fenótipo

Estudos indicam que é possível prever o fenótipo com base no genótipo [7] [34].

Num estudo que avaliou 1531 pessoas com surdez não sindrômica autossômica recessiva (DFNB1), de 16 países diferentes, verificou-se que a gravidade era muito variável dentro do mesmo genótipo. No entanto, quando os autores classificaram as mutações de acordo com a gravidade dos seus efeitos moleculares foram encontradas algumas relações. As variantes genótípicas incluíram *biallelic truncating* (T/T), *biallelic non-truncating* (NT/NT) e *heterozygous truncating/non-truncating* (T/NT).

Genótipo	Percentagem	Surdez ligeira	Surdez profunda
T/T	36%	0-3%	59-64%
NT/NT	24%	53%	13%
T/NT	40%	29-37%	24-30%

Quadro 2: Mostra as relações genótipo-fenótipo por variante, num estudo realizado em 1531 pessoas com variantes bialélicas patogénicas GJB2. Quadro adaptado de Smith R.J.H., Jones M.K.N. [2016].

Estes dados sugerem que os genótipos com duas mutações truncadas (que levam à formação de codões stop prematuros) levam a perdas auditivas mais graves do que genótipos com duas mutações não truncadas (mutações que levam a substituições de aminoácidos). Genótipos com mutações truncadas e não truncadas resultaram em fenótipos de severidade intermédia entre os dois descritos. Adicionalmente às conclusões descritas, os autores reforçam que existe uma grande variabilidade fenotípica e que isso se pode dever ao efeito de genes modificadores e/ou factores ambientais, que levam a uma penetrância incompleta e expressão variável [10] [17].

De modo a compreender a variabilidade fenotípica existente entre indivíduos homozigóticos para a mutação 35delG, foi realizado um estudo cujos resultados sugerem que não existe um gene modificador major mas sim que a variabilidade fenotípica se deve ao efeito de vários genes que interagem entre si [35].

Rastreio auditivo

Antes da implementação dos rastreios neonatais e programas de intervenção, a idade média de diagnóstico era 1,5-3 anos, o que corresponde a uma idade muito depois do intervalo crítico para o início do discurso e aquisição da linguagem [36].

Uma vez que a plasticidade cerebral muda durante a infância, as crianças que não foram expostas a estímulos auditivos adequados ou tiveram exposição insuficiente à linguagem, vão enfrentar obstáculos subsequentes na aquisição da linguagem, desenvolvimento cognitivo, funcionamento psicossocial e interacções sociais [36].

O diagnóstico de surdez deve ser feito o mais precocemente possível para permitir que a criança desenvolva capacidades comunicativas apropriadas [37].

Na maioria dos países desenvolvidos, o rastreio neonatal auditivo permite a detecção precoce, prevenindo atrasos no desenvolvimento do discurso e da linguagem, e outras implicações sociais e emocionais da surdez [4]. Em Portugal, é feito o Rastreio Auditivo Neonatal Universal. Segundo a NOC 018/2015 “todos os recém-nascidos devem ser submetidos ao rastreio auditivo até ao final do primeiro mês de vida”, deve haver confirmação do diagnóstico “até aos 3 meses de vida” e “intervenção precoce e adequada até aos 6 meses de idade” [6].

O rastreio auditivo neonatal pode ser feito através do método das otoemissões acústicas (OEA). As otoemissões acústicas são sons produzidos por células do ouvido interno que na maioria das patologias associadas à surdez infantil têm a sua funcionalidade comprometida. É colocado uma sonda no ouvido através do qual são enviados estímulos sonoros e que possui um microfone que regista as respostas (otoemissões acústicas) aos sons emitidos. Na criança com défice auditivo não se obtêm otoemissões acústicas. Quando o teste de rastreio identifica um défice auditivo, é necessária uma avaliação mais detalhada em consulta de otorrinolaringologia.

No entanto, existem algumas limitações neste rastreio, como casos de surdez com desenvolvimento progressivo que não se manifesta no período neonatal, a existência de mutações que predispõe ao desenvolvimento de surdez mais tardiamente quando associadas a outros factores de risco ambientais e ainda casos de surdez com graus ligeiros, uma vez que este método só detecta surdez de cerca de 30-40dB.

Diagnóstico genético

Devido à sua importância crescente na prática clínica, é necessário que os profissionais de saúde estejam familiarizados com os testes genéticos existentes e tenham conhecimentos adequados relativamente às implicações dos mesmos [38].

Os testes moleculares para os genes GJB2 e GJB6 devem ser considerados na avaliação dos indivíduos com surdez congénita não sindrómica neurosensorial e nas famílias que têm duas gerações com surdez não sindrómica [2].

A importância do diagnóstico molecular passa por permitir um aconselhamento genético dirigido, prevenir novos casos de surdez, excluir o risco de casos síndromicos, identificar a susceptibilidade a aminoglicósidos, seleccionar os bons candidatos a implante coclear e determinar o risco de recorrência [39].

A utilização de testes genéticos permite a identificação dos doentes que não são detectados no rastreio neonatal, identificar a etiologia nos casos de surdez genética e diminuir o consumo de outros recursos e exames complementares de diagnóstico que se revelariam inúteis na grande maioria dos casos [7].

Os testes genéticos moleculares disponíveis incluem testes-alvo (*single-gene testing* ou *multigene panel*) e testes genómicos (*comprehensive genomic sequencing*). Os testes recomendados são os que permitem uma avaliação de um painel de genes especificamente associados à surdez, ou seja, todos os genes identificados como responsáveis por surdez congénita não síndromica e por diagnósticos diferenciais [7].

São exemplos de testes genéticos a genotipagem, para detecção de variantes patogénicas, sequenciação de genes, métodos de amplificação ou hibridização que detectam o número de cópias variantes, técnicas de metilação específicas que detectam alterações epigenéticas que influenciam a expressão génica, e sequenciação de genoma [40].

A sequenciação directa do ADN envolve a determinação sequencial da ordem das bases nucleicas numa determinada cadeia de ADN, o que permite identificar todas as mutações possíveis num determinado gene. A *next-generation sequencing (NGS)* permite a análise simultânea de fragmentos de sequências de DNA, sendo possível detectar variações tão pequenas quanto substituições de uma única base e o número de cópias variantes. Este método suplantou o Método de Sanger, que se limita unicamente à análise de sequências de uma região do ADN (no máximo ~1000bp), por oposição à sequenciação paralela maciça que é possível com a NGS [41].

Considerando o facto que a surdez congénita afecta 1-3 em cada 1000 crianças anualmente e que 90-95% destas têm progenitores não surdos, é importante o reconhecimento da taxa de portadores e a compreensão do espectro de mutações mais

prevalente na população geral, uma vez que estas informações são úteis não apenas para as famílias mas também para um melhor planeamento das políticas de saúde e de educação, assim como uma melhor alocação de recursos [36].

Diagnóstico pré-natal e pré-implantação

Uma vez identificada a variante patogénica num membro da família, é possível realizar testes pré-natais e diagnóstico pré-implantação.

O diagnóstico pré-natal consiste numa abordagem que avalia o material genético fetal. É possível ser feito através de dois métodos: análise de DNA obtido a partir de amniocentese, entre as 15 e as 18 semanas de gestação, ou biópsia das vilosidades coriônicas, entre as 10 e as 12 semanas de gestação. É importante ter em conta aquando da decisão de realizar estes procedimentos que estes não são isentos de riscos para o feto, podendo complicar em aborto.

O diagnóstico pré-implantação detecta alterações cromossómicas e mutações nos embriões. Este método é usado por pessoas que recorrem a métodos de reprodução medicamente assistida.

Aconselhamento genético

O aconselhamento genético é um processo que visa providenciar, aos indivíduos e às famílias, informação quanto à natureza, hereditariedade e implicações da doença genética, de modo a que estes possam tomar decisões, médicas e pessoais, devidamente informadas [37] [7].

O aconselhamento genético deve incluir duas vertentes: uma antes e outra depois do teste. A vertente pré-teste deve esclarecer quanto à natureza da surdez, as diferentes causas de surdez, os modos de hereditariedade e as opções existentes para a realização de testes genéticos, tendo em conta os riscos, benefícios e limitações. A vertente pós-teste deve incluir explicações dos resultados tendo em conta o contexto pré-teste e avaliação do impacto psicológico dos resultados na família [36].

Quando se trata de uma família não surda, ter uma criança surda cria geralmente diversas questões e preocupações. Como tal, a possibilidade de compreender a etiologia da surdez através de testes não invasivos, a perspectiva de se realizarem tratamentos dirigidos numa fase precoce e a compreensão do modo de transmissão e probabilidade de recorrência, são geralmente factores importantes que favorecem a compreensão e a melhor aceitação da situação [8].

Num estudo sobre o aconselhamento genético, foi escolhida uma população de pais não surdos com um ou mais filhos surdos, que foram questionados quanto aos testes diagnósticos, pré-natais e a condição de portador. Destes, 96% teve uma atitude positiva quanto aos testes genéticos, incluindo os pré-natais. No entanto, todos os inquiridos tinham um pobre entendimento da genética, 98% não sabia estimar o risco de recorrência e não compreendia o conceito de hereditariedade. Estes resultados permitiram concluir que esta população está interessada nos testes genéticos e reforça a importância de providenciar aconselhamento genético formal previamente aos mesmos [42].

No entanto, é necessário ter em consideração que os testes genéticos não são considerados benéficos universalmente. Membros da comunidade surda podem encarar a surdez como uma característica distintiva e não como uma condição médica incapacitante que requer um tratamento, cura ou prevenção. Trata-se de uma comunidade com a sua própria cultura linguística e identidade, que pode não encarar a surdez como uma doença, mas sim como uma característica. Os testes e aconselhamento genéticos podem e devem ser oferecidos, mas tem de se ter em conta que existem famílias que preferem ter filho surdos ou que não pretendem ter acesso a essa informação [2] [8].

- **Risco familiar**

A avaliação do risco genético deve ter em consideração a história familiar e os testes genéticos disponíveis.

Uma vez que se trata de uma patologia herdada de um modo autossómico recessivo, os pais saudáveis de um indivíduo doente são necessariamente portadores assintomáticos de uma variante patogénica do gene GJB2 e, portanto, heterozigóticos.

Um segundo filho, dos mesmos pais, terá 25% de probabilidade de ser homozigótico para a mutação e, por isso, doente; 50% de ser um portador assintomático, heterozigótico; e 25% de não ser portador de nenhuma mutação, homozigótico.

Um filho de um progenitor afectado será, pelo menos, heterozigótico para a mutação, uma vez que vai de certeza herdar uma cópia mutada [7] [37].

Implante coclear

Antes dos implantes cocleares, a intervenção na surdez neuro-sensorial severa a profunda consistia no uso de próteses auditivas, estimulação oral, leitura labial e linguagem gestual.

Actualmente, os implantes cocleares constituem uma opção segura e eficaz de reabilitação dos doentes com surdez severa a profunda [24] [18].

- **Funcionamento do implante**

Os implantes cocleares são dispositivos com dois componentes. O componente externo, geralmente usado atrás da orelha, contém um microfone que capta os sons, um processador que os transforma num código eléctrico e um transmissor que envia estes estímulos por radiofrequência e através da pele até ao componente interno. O componente interno é cirurgicamente implantado de forma subcutânea atrás da orelha e é formado por um receptor, que recebe o sinal acústico codificado pelo componente externo, converte-o em impulsos eléctricos e os envia através eléctrodos no interior da cóclea, na *scala tympani*, que estimulam as terminações do nervo auditivo [4].

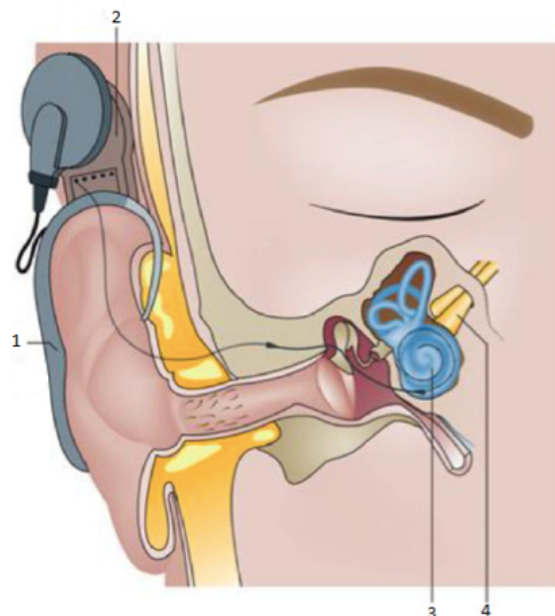


Imagem 4: Esquema de um implante coclear. 1 – Microfone; 2 – Receptor subcutâneo; 3 – Eléctrodos colocados directamente na *Scala Tympani*; 6 – Nervo auditivo. Imagem retirada de Korver, A.M.H [2018]

- **Candidatos ao implante**

São candidatas ao tratamento com implantes cocleares as crianças com surdez neuro-sensorial bilateral de grau profundo bilateral ou de grau severo bilateral sem benefício funcional com prótese auditiva [6].

- **Rapidez da intervenção e da implantação bilateral**

Apesar de não estar estabelecido um limite mínimo para a idade de implantação, os estudos evidenciam que há maiores benefícios se esta for realizada o mais precocemente possível e se a duração da surdez for o menor possível [43].

A importância da rápida intervenção prende-se com as consequências do atraso da implantação coclear, que pode levar a menor maturidade auditiva central e a uma menor estimulação das células do córtex auditivo que, por este motivo, sofrem uma transformação progressiva para células de córtex visual, alterações estas que têm algum grau de irreversibilidade [6] [44].

Alguns centros recomendam que deve ser privilegiada a implantação bilateral uma vez que foi determinado de um modo objectivo e por apreciação parental que há melhor processamento da linguagem e, para além disso, há melhor localização do som [45] [6]. Adicionalmente, estudos demonstram que a implantação bilateral precoce em crianças com surdez profunda congénita pode conduzir a resultados escolares sobreponíveis com os obtidos em crianças não surdas [6] [46] [47].

- **Resultados do implante**

Esta intervenção tem impacto positivo no desenvolvimento psicomotor, intelectual e social. O implante tem o potencial de melhorar a audição, depois de reabilitação adequada, e de desenvolver a linguagem, com consequências positivas ao nível da qualidade de vida, aumentando o desempenho escolar, académico e a capacidade de

trabalho, constituindo um factor facilitador de integração e de interacção na sociedade [6].

Uma vez que as mutações GJB2 não afectam as células do órgão de Corti, que corresponde ao local de estimulação do implante coclear, é expectável que indivíduos com esta mutação tenham melhores resultados após a colocação do implante do que aqueles que têm surdez associada a danos neurais e/ou centrais do sistema auditivo.

Depois de realizada uma avaliação clínica, audiológica e da habilitação oral após o implante, um estudo feito em Portugal concluiu que indivíduos com mutações DFNB1, sujeitos à colocação de um implante coclear, atingem scores de performance oral superiores, em cerca de 6%, relativamente aos candidatos com surdez de etiologia diferente [32].

No entanto deve-se ter em conta que vários factores podem ter influência no resultado final da operação, como a idade de implantação, a qual quanto mais cedo ocorrer melhores resultados apresenta, a duração da surdez antes da implantação, a estimulação auditiva antes da colocação do implante, a motivação e o empenho no processo de reabilitação auditiva quer do doente, quer da família [6].

Novas terapias

Terapias genéticas e celulares têm o potencial de preservar ou restaurar a audição com uma percepção sonora mais natural e sem a necessidade de utilizar material protésico [24].

A compreensão dos mecanismos moleculares genéticos subjacentes à surdez e das consequências das mutações nos tecidos afectados permite a possibilidade de desenvolvimento de novas terapias, como a génica coclear, que influencia a expressão génica nos tecidos afectados [48] [24].

As mutações no gene da conexina 26 correspondem à maioria dos casos de surdez genética, o que faz do *GJB2* um dos mais importantes alvos da terapia génica da surdez [48]. Logo, uma vez que as mutações recessivas homozigóticas são a principal causa de surdez genética, existe um potencial de realizar substituição génica ou indução de

expressão exógena de um gene wildtype [24]. Inclusivamente, estudos realizados em ratinhos mostram que a substituição de um gene ausente e a downregulation de um gene dominante podem restaurar a audição [48].

Uma das técnicas a ser mais estudadas é a utilização de vectores virais que visam substituir um gene não funcionante ou com uma função aberrante, por outro saudável. Estes vectores virais surgiram como veículos eficazes para a terapia génica, particularmente nas doenças monogénicas recessivas [49]. Actualmente, o vector com maior potencial é o *Adeno-Associated Virus* (AAV). Uma vez que a entrada do AAV nas células é mediada por receptores específicos, diferentes subtipos de AAV podem ter efeitos directos nas células passíveis de serem infectadas. Outra vantagem é que o AAV pode ser incorporado no genoma do hospedeiro, resultando numa expressão estável e de longa duração. Para além disso, a utilização destes vectores mostrou-se eficaz e segura em vários ensaios clínicos. Uma vez que não se associa o AAV com nenhuma doença humana, infecção ou ototoxicidade, este mantém-se o candidato ideal para ser usado em terapia génica na surdez hereditária [48]. No entanto, uma vez que todas as células que expressam gap junctions teriam de ser alvo da terapêutica de forma a prevenir a surdez e, dada a distribuição alargada das gap junctions na cóclea, são questões que fazem deste alvo um dos mais desafiantes.

Estima-se que mais de metade dos casos de surdez genética seja causada por mutações no gene GJB2, logo, de uma aplicação de terapia génica bem sucedida poder-se-ia potencialmente esperar benefícios para uma grande proporção dos doentes surdos. No entanto, este gene é crítico para o desenvolvimento da cóclea, e se os resultados obtidos em ratos forem aplicáveis em humanos, a terapia génica para os genes GJB2 e GJB6 teria de ser realizada numa fase precoce de modo a restaurar a audição, provavelmente numa fase ainda embrionária. Uma vez que se trata de uma doença não letal e estes procedimentos têm riscos inerentes, é susceptível de discussão se os benefícios decorrentes dos tratamentos compensam os riscos a que o feto humano poderia estar exposto [24].

Conclusão

Nos últimos anos têm sido identificados cada vez mais genes cujas mutações conduzem à existência de surdez nos seres humanos. A compreensão dos mecanismos genéticos moleculares subjacentes a esta condição possibilita o desenvolvimento de novas terapias, nomeadamente a génica coclear [48].

Mutações no gene da conexina 26 (GJB2) são a causa mais comum de surdez genética, sendo responsáveis por mais de metade dos casos de surdez não sindrómica [37]. Como tal, nestes casos, deve ser analisada a presença de mutações no gene GJB2 e considerar a análise concomitante do GJB6 [8].

Após o estabelecimento da etiologia da surdez, pode ser iniciado ou programado um tratamento precoce, como implantação coclear, que melhora significativamente a comunicação e a qualidade de vida dos doentes [8], para além do aconselhamento genético e a determinação do prognóstico.

A grande heterogeneidade genética e a quantidade de genes envolvidos torna o processo de identificação das mutações responsáveis pela surdez difícil e dispendioso, sendo que o *Next Generation Sequencing* representa um método de diagnóstico molecular de alta sensibilidade, rapidez e com menor custo [39].

A par do desenvolvimento dos testes genéticos, é necessário que ocorra um avanço paralelo da terapia génica e da compreensão da correlação entre o genótipo e o fenótipo [48], uma vez que a genética terá um papel cada vez mais importante na prática médica e nas decisões clínicas.

Bibliografia

- [1] “World Health Organization,” 15 Março 2018. [Online]. Available: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss>. [Acedido em Setembro 2018].
- [2] A. Kochhar, M. Hildebrand e R. Smith, “Clinical aspects of hereditary hearing loss,” *Genetics IN Medicine*, vol. 9, pp. 393-408, 2007.
- [3] C. Petit, J. Levilliers e J. Hardelin, “Molecular Genetics of Hearing Loss,” *Annual Review of Genetics*, vol. 35, pp. 589-646, 2001.
- [4] A. Korver, R. C. C. G. Smith, M. Schelss, M. Bitner-Giindzlcz, L. Lustig e S. B. A. Usami, “Congenital Hearing Loss,” *Nat Rev Dis Primers*, 12 January 2018.
- [5] J. C. o. I. Hearing, “Year 2007 Position Statement: Principles and Guidelines for Early Hearing Detection and Intervention Programs,” *American Academy of Pediatrics*, vol. 120 (4), pp. 898-921, 2007.
- [6] F. Moura George, “Norma nº 018/2015: Rastreio e Tratamento da Surdez com Implantes Cocleares em Idade Pediátrica,” 11/12/2015 actualizada a 14/07/2017.
- [7] R. Smith e M. Jones, “Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, DFNB1,” *GeneReviews*, 1998 Sep 28 Updated 2016 Aug 18.
- [8] I. Schrijver, “Hereditary Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss - Transforming Silence to Sound,” *Journal of Molecular Diagnosis*, vol. 6, pp. 275-284, Novembro 2004.
- [9] S. Almeida, P. Gouveia, A. Jorge, A. Mendes, C. Duarte, N. Faria e P. Paixão, “Infecção congénita por Citomegalovirus. Prevalência numa população da Beira Interior,” *Acta Pediátrica Portuguesa*, vol. 41 (4), pp. 162-165, 2010.
- [10] R. Snoeckx, P. Huygen, D. Feldmann, S. Marlin, F. Denoyelle, J. Waligora, M. Mueller-Malesinska, A. Pollak, R. Ploski, A. Murgia, E. Orzan, P. Castorina, U. Ambrosetti, E. Nowakowska-Syrwinska, J. Bal, W. Wiszniewski e A. Janecke, “GJB2 Mutations and Degree of Hearing Loss: A Multicenter Study,” *American Journal of Human Genetics*, vol. 77, pp. 945-957, 2005.
- [11] C. Morton e W. Nance, “Newborn Hearing Screening — A Silent Revolution,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 354, pp. 2151-64, 2006.
- [12] S. R. Van Camp G, “Hereditary Hearing Loss Homepage,” [Online]. Available:

- <https://hereditaryhearingloss.org>. [Acedido em Setembro 2018].
- [13] V. M. R. R. G. P. E. X. Ballana E, "The Connexin-deafness homepage," [Online]. Available: <http://davinci.crg.es/deafness/>. [Acedido em Setembro 2018].
- [14] A. Batisso, R. Abreu-Silva, M. Braga, K. Lezirivitz, V. Della-Rosa, T. Alfredo, P. Otto e R. Mingroni-Netto, "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 and Hearing*, vol. 30 (1), pp. 1-7, 2009.
- [15] J. Paris-Rodriguez, M. Tamayo, N. Gelvez e I. Schrijver, "Allele-Specific Impairment of GJB2 Expression by GJB6 Deletion del(GJB6-D13S1854)," *PLoS ONE*, vol. 6 (6), p. e21665, 2011.
- [16] C. Ambrosi, A. Walker, A. DePriest, A. Cone, C. Lu, J. Badger, I. Skerrett e G. Sosinsky, "Analysis of Trafficking, Stability and Function of Human Connexin 26 Gap Junction Channels with Deafness- Causing Mutations in the Fourth Transmembrane Helix," *PLOS ONE*, vol. 8 (8), p. e70916, August 2013.
- [17] C. I. Castillo F.J., "DFNB1 Non-syndromic Hearing Impairment:Diversity of Mutatons and Associated Phenotypes," *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 10:428, 22 December 2017.
- [18] S. Connell, S. Angeli, H. Suarez, A. Hodges, T. Balkany e X. Liu, "Performance after cochlear implantation in DFNB1 patients," *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, vol. 137, pp. 596-602, 2007.
- [19] A. Martínez, R. Acuña, V. Figueroa e J. N. B. Maripillan, "Gap-Junction Channels Dysfunction in Deafness and Hearing Loss," *Antioxidants & redox signaling 11*, vol. 11 (2), pp. 309-322, 2009.
- [20] N. Marziano, S. Casalotti, A. Portelli, D. Becker e A. Forge, "Mutations in the gene for connexin 26 (GJB2) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30," *Human Molecular Genetics*, vol. 12 (8), pp. 805-812, 2002.
- [21] E. Dinh, S. Ahmad, Q. Chang, Q. Tang, B. Stong e X. Lin, "Diverse deafness mechanisms of connexin mutations revealed by studies using in vitro approaches and mouse models.," *Brain Research Journal.*, vol. 24, pp. 1277:52-69, 2010.
- [22] D. Kalmatsky, Y. Batir, T. Bargiello e T. Dowd, "Structural Studies of N-Terminal

- Mutants of Connexin 32 Using ^1H NMR Spectroscopy,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, pp. 526: 1-8., 2012.
- [23] J. Lautermann, W. ten Cate, P. Altenhoff, K. Jahnke e E. Winterhager, “Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea,” *Cell and Tissue Research*, vol. 294, pp. 414-420, 1998.
- [24] W. Zhang, S. Kim, W. Wang, C. Cai, Y. Feng, W. Kong e X. Lin, “Cochlear Gene Therapy for Sensorineural Hearing Loss: Current Status and Major Remaining Hurdles for Translational Success,” *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 11, 26 June 2018.
- [25] J. Lee e T. White, “Connexin-26 mutations in deafness and skin disease,” *Expert Reviews*, vol. 11, 2009.
- [26] R. Rabionet, P. Gasparini e X. Estivill, “Molecular Genetics of Hearing Impairment Due to Mutations in Gap Junction Genes Encoding Beta Connexins,” *Human Mutation*, vol. 16, pp. 190-202, 2000.
- [27] X. Estivill, P. Fortina, S. Surrey, R. Rabionet, S. Melchionda, L. D'Agruma, E. Mansfield, E. Rappaport, N. Govea, M. Milà, L. Zelante e P. Gasparini, “Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness,” *Lancet*, vol. 351, pp. 394-98, 1998.
- [28] A. Grifa, C. Wagner, L. D'Ambrosio, S. Melchionda, F. Bernardi, N. Lopez-Bigas, R. Rabionet, M. Arbones, M. Monica, X. Estivill, L. Zelante, F. Lang e P. Gasparini, “Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus,” *Nature Genetics*, vol. 23, 1999.
- [29] S. Wilcox, A. Osborn, D. Allen-Powell, M. Maw, H. Dahl e R. Gardner, “Connexin26 deafness in several interconnected families,” *J Med Genet*, vol. 36, pp. 383-385, 1999.
- [30] L. Mei, J. Cheng, L. Zong, Y. Zhu, C. Liang, R. Jones e H. Zhao, “A deafness mechanism of digenic Cx26 (GJB2) and Cx30 (GJB6) mutations: Reduction of endocochlear potential by impairment of heterogeneous gap junctional function in the cochlear lateral wall,” *Neurobiology of Disease*, 2017.
- [31] J. Moura, J. Chora, S. Andrade, J. Martins, L. Silva, H. Caria e C. Ribeiro, “GJB2/GJB6 mutations and cochlear implant performance,” *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, vol. 141 (3S1), p. 188, Setembro 2009.

- [32] J. Chora, T. Matos, J. Martins, M. Alves, S. Andrade, L. Silva, C. Ribeiro, M. Antunes, M. Fialho e H. Caria, "DFNB1-associated deafness in Portuguese cochlear implant users: Prevalence and impact on oral outcome," *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, vol. 74, pp. 1135-1139, 2010.
- [33] S. Marlin e e. al, "GJB2 and GJB6 - Mutations Genotypic and Phenotypic Correlations in a Large Cohort of Hearing-Impaired Patients," *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, vol. 131, pp. 481-487, 2005.
- [34] K. Cryns, E. Orzan, A. Murgia, P. Huygen, F. Moreno, I. del Castillo, G. Chamberlain, H. Azaiez, S. Prasad, R. Cucci, E. Leonardi, R. Snoeckx, P. Govaerts, P. Van de Heyning, C. Van de Heyning, R. Smith e G. Can Camp, "A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness," *Journal of Medical Genetics*, vol. 41, pp. 147-154, 2003.
- [35] N. e. a. Hilgert, "NPhenotypic variability of patients homozygous for the GJB2 mutation 35delG cannot be explained by the influence of one major modifier gene," *European Journal of Human Genetics*, vol. 17, pp. 517-524, 2009.
- [36] A. Yin, C. Liu, Y. Chang, J. Wu, M. Mai, H. Ding, J. Yang e X. Zhang, "Genetic counseling and prenatal diagnosis for hereditary hearing loss in high-risk families," *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2014.
- [37] H. Rehm, R. Williamson, M. Kenna, D. Corey e B. Korf, *Understanding the Genetics of Deafness - A Guide for Patients and Families*, Harvard Medical School Center For Hereditary Deafness, 2003.
- [38] R. Duncan, S. Prucka, B. Wiatrak, R. Smith e N. Robin, "Pediatric Otolaryngologists' Use of Genetic Testing," *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, vol. 133, pp. 231-236, 2007.
- [39] M. Fialho, "SURDEZ HEREDITÁRIA EM PORTUGAL: 1999-2013," 2013.
- [40] "GeneReviews," [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5191/def-item/molecular-genetic-testing/>. [Acedido em Setembro 2018].
- [41] "Gene Reviews," [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5191/def-item/sanger-sequencing/>. [Acedido em Setembro 2018].
- [42] J. Brunger, G. Murray, M. O'Riordan, A. Matthews, R. Smith e N. Robin, "Parental

- Attitudes toward Genetic Testing for Pediatric Deafness,” *American Journal of Human Genetics*, vol. 67, pp. 1621-1625, 2000.
- [43] F. Forli, E. Arslan, S. Bellelli, S. Burdo, P. Mancini, A. Martini, M. Miccoli, N. Quaranta e S. Berrettini, “Systematic review of the literature on the clinical effectiveness of the cochlear implant procedure in paediatric patients,” *Acta otorhinolaryngologica italica*, vol. 31, pp. 281-298, 2011.
- [44] Y. Chung, B. Delgutte e H. Colbrun, “Modeling Binaural Responses in the Auditory Brainstem to Electric Stimulation of the Auditory Nerve,” *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, vol. 16, pp. 135-158, 2015.
- [45] F. Asp, E. Mäki-Torkko, E. Karltorp, H. Harder, L. Hergils, G. Eskilsson e S. Stenfelt, “Bilateral versus unilateral cochlear implants in children: Speech recognition, sound localization, and parental reports,” *International Journal of Audiology*, vol. 51, pp. 817-832, 2012.
- [46] J. Sarant, D. Harris e L. Bennet, “Academic Outcomes for School-Aged Children With Severe–Profound Hearing Loss and Early Unilateral and Bilateral Cochlear Implants,” *Journal of Speech, Language and Hearing Research*, vol. 58, pp. 1017-1032, 2015.
- [47] D. Toe e L. Paatsh, “The conversational skills of school-aged children with cochlear implants,” *Cochlear Implants International*, vol. 14 (2), pp. 67-79, 2013.
- [48] O. Akil e L. Lustig, “Current Understanding and Potential of Gene Therapy for Hearing Restoration in Humans,” *Vona B, Haaf T (eds): Genetics of Deafness*, vol. 20, n° 132-141, 2016.
- [49] M. Kotterman, T. Chalberg e D. Schaffer, “Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook,” *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 17, pp. 63-89, 2015.
- [50] R. Mani, A. Ganapathy, R. Jalvi, C. Srisailapathy, V. Malhotra, S. Chadha, A. Agarwal, A. Ramesh, R. Rangasayee e A. Anand, “Functional consequences of novel connexin 26 mutations associated with hereditary hearing loss,” *European Journal of Human Genetics*, vol. 17, pp. 502-509, 2009.
- [51] A. Gonçalves, J. Chora, T. Matos, R. Santos, A. O'Neill, P. Escada, G. Fialho e H. Caria, “A novel p.Leu213X mutation in GJB2 gene in a Portuguese family,” *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2012.

- [52] A. Wonkam, J. Bosch, J. Noubiap, K. Lebeko, N. Makubalo e C. Dandara, “No evidence for clinical utility in investigating the connexin genes GJB2, GJB6 and GJA1 in non-syndromic hearing loss in black Africans,” *South African Medical Journal*, vol. 105, Janeiro 2015.