



**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTABELECIMENTO DE UMA RELAÇÃO
GENÓTIPO *GJB2/GJB6* VS SUCESSO DO IMPLANTE COCLEAR EM
INDIVÍDUOS SURDOS DA POPULAÇÃO PORTUGUESA**

Joana Rita Gaspar de Barros Martinho Chora

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2008



CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTABELECIMENTO DE UMA RELAÇÃO GENÓTIPO *GJB2/GJB6* VS SUCESSO DO IMPLANTE COCLEAR EM INDIVÍDUOS SURDOS DA POPULAÇÃO PORTUGUESA

Joana Rita Gaspar de Barros Martinho Chora

O trabalho experimental conducente a esta dissertação foi realizado no grupo de Genética da Surdez, BioFIG (Center for Biodiversity, Functional and Integrative Genomics), sob a orientação da Prof^ª. Doutora Helena Caria e do Prof. Doutor Pedro Silva, tendo dado origem a duas comunicações/publicações em dois encontros científicos internacionais (Chora *et al.* *GJB2* analysis in Portuguese cochlear implant users. *European Journal of Human Genetics* vol.16 suppl.2 p.253 Barcelona, Espanha 2008 e Chora *et al.* *GJB2* analysis and oral habilitation success in Portuguese cochlear implant users. *Proceedings 45th Inner Ear Biology Workshop* Ferrara, Italy 2008).

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2008

Índice geral

Índice geral	III
Índice de tabelas	V
Índice de figuras	VI
Abreviaturas e Siglas	VII
Agradecimentos	VIII
Resumo	IX
Abstract	X
1. Introdução	1
1.1 Surdez	2
1.2 Conexinas	3
1.2.1 Conexina 26 (<i>GJB2</i>)	4
1.2.2 Conexina 30 (<i>GJB6</i>)	4
1.3 Implantes cocleares	5
2. Objectivo	7
3. Materiais e Métodos	9
3.1 Selecção e caracterização das amostras	10
3.1.1 Amostras aleatórias de Leiria e do Alentejo	10
3.1.2 Famílias com surdez	10
3.1.3 Indivíduos implantados	10
3.2 Testes efectuados para avaliar sucesso do implante	10
3.3 Métodos	12
3.3.1 Extracção de DNA genómico a partir de amostras de sangue	12
3.3.2 Amplificação por <i>Polimerase Chain Reaction</i> (PCR)	13
3.3.2.1 Amplificação por PCR para sequenciação	13
3.3.2.2 Amplificação por PCR <i>multiplex</i> para detectar deleções em <i>GJB6</i>	14
3.3.2.3 Amplificação por PSDM para detectar a mutação 35delG por restrição	15
3.3.3 Restrição enzimática para detectar a mutação 35delG	15
3.3.4 Purificação e sequenciação dos produtos de PCR	16
3.4 Análise estatística	17
4. Resultados	18
4.1 Análise das amostras aleatórias de Leiria e do Alentejo	19
4.2 Análise das famílias com surdez	20
4.2.1 Detecção da mutação 35delG	20
4.2.2 Sequenciação do gene <i>GJB2</i>	20
4.3 Análise dos indivíduos implantados	21
4.3.1 Caracterização dos indivíduos da amostra	21

4.3.2 Análise genética	22
4.3.2.1 Sequenciação do gene <i>GJB2</i>	22
4.3.2.2 Deleções envolvendo o gene <i>GJB6</i>	23
4.3.3 Avaliação do sucesso da (re)habilitação oral	23
4.3.3.1 Resultados nos testes	23
4.3.3.2 Avaliação global	24
4.3.4 Análise estatística.....	25
5. Discussão e Conclusões	28
5.1 Amostras aleatórias de Leiria e do Alentejo	29
5.2 Famílias com surdez	30
5.3 Indivíduos implantados.....	30
5.4 Considerações finais	33
6. Bibliografia.....	34
7. Anexos	37

Índice de tabelas

Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> utilizados, respectivas temperaturas de <i>melting</i> (Tm) e dimensão dos fragmentos amplificados.	13
Tabela 2. Padrão de bandas esperado do teste das deleções envolvendo <i>GJB6</i>	14
Tabela 3. Padrão de bandas esperado da digestão com <i>BslI</i>	16
Tabela 4. Percentagens dos genótipos encontrados nas amostras de Leiria	19
Tabela 5. Percentagens dos genótipos encontrados nas amostras do Alentejo	19
Tabela 6. Percentagens dos genótipos identificados nos probandos das famílias analisadas	21
Tabela 7. Caracterização da amostra de indivíduos implantados	21
Tabela 8. Genótipos de todos os indivíduos implantados incluídos na amostra e respectiva avaliação oral global.....	24
Tabela 9. Resultados do teste de Kruskal-Wallis para a avaliação global vs genótipo.	26
Tabela 10. Resultados do teste de Kruskal-Wallis para cada um dos testes realizados vs genótipo.....	26
Tabela 11. Resultados do teste de Kruskal-Wallis para a avaliação global vs modelo de implante.....	26
Tabela 12. Resultados da correlação de Spearman para tempo de uso de implante, idade de implantação e avaliação global.	27
Tabela 13. Resultados dos 12 testes efectuados e da avaliação global.	38

Índice de figuras

Figura 1. Esquema da cóclea e do órgão de Corti	3
Figura 2. Localização das deleções del(<i>GJB6</i> -D13S1830) e del(<i>GJB6</i> -D13S1854) em relação aos genes <i>GJB2</i> , <i>GJB6</i> e <i>CRYL1</i>	5
Figura 3. Esquema da localização de um implante coclear e respectivos componentes internos.....	6
Figura 4. Esquema da reacção de PCR <i>multiplex</i> para a pesquisa das deleções del(<i>GJB6</i> -D13S1830) e del(<i>GJB6</i> -D13S1854).....	14
Figura 5. Electroforetogramas das variantes de <i>GJB2</i> (A a L) registadas nas amostras de Leiria e do Alentejo.....	19
Figura 6. Fotografia do gel de restrição com <i>BslI</i>	20
Figura 7. Electroforetogramas das variantes de <i>GJB2</i> (A e B) identificadas nas famílias com surdez.....	20
Figura 8. Genótipos encontrados nos indivíduos com implante e respectivas percentagens.....	22
Figura 9. Electroforetogramas das variantes de <i>GJB2</i> (A a D) identificadas nos indivíduos com implante.	22
Figura 10. Fotografia do gel com os produtos do PCR <i>multiplex</i>	23
Figura 11. Média dos resultados da bateria de testes realizada no serviço de ORL do CHC nos grupos “com”, “sem mutações em <i>GJB2</i> ”, e no total da amostra.	23
Figura 12. Representação gráfica dos resultados individuais de avaliação quantitativa distribuídos por categorias qualitativas.	25
Figura 13. Resultados dos testes utilizados para o estabelecimento da avaliação global e resultados desta, comparando indivíduos com e sem mutações em <i>GJB2</i>	39

Abreviaturas e Siglas

BSA – soro acetilado de albumina de bovino

CI – Implante coclear

CHC – Centro Hospitalar de Coimbra

Cx 26 – Conexina 26

Da – Daltons

dB – Decibel

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleótido

EDTA – Etilodiaminotetracetato

g – Grama (Kg – quilograma, mg – miligrama, ng – nanograma)

H₂O_d – Água destilada

Hz – Hertz

INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

K⁺ – Ião potássio

L – Litro (mL – mililitro, µL – microlitro)

m – Metro (cm – centímetro, mm – milímetro)

M – Molar (mM – milimolar, µM – micromolar)

min – Minuto

nt+765 – Nucleótido na posição 765

NSRD – Surdez não-sindrómica autossómica recessiva

°C – Graus Celsius

ORL – Otorrinolaringologia

pb – Pares de bases (Kp – Kilobases)

PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reacção em cadeia da polimerase)

PNDP – Programa Nacional de Diagnóstico Precoce

PSDM – *PCR-site directed mutagenesis* (mutagénese dirigida por PCR)

rpm – Rotações por minuto

SD – Desvio padrão

SDS – Dodecil sulfato de sódio

seg – Segundo

TBE – Tris-Borato-EDTA

T_m – Temperatura de *melting*

U – Unidade de enzima de restrição

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os que tornaram este trabalho possível:

Ao serviço de Otorrinolaringologia do Centro Hospitalar de Coimbra pelo fornecimento das amostras e pela hospitalidade e disponibilidade com que me acolheram;

À empresa CochlearTM pelo financiamento deste projecto;

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo subsídio de deslocação que me permitiu participar no Congresso Internacional do ESHG 2008;

À Prof^a. Doutora Helena Caria e ao Prof. Doutor Pedro Silva por toda a orientação dada ao longo deste ano;

À Professora Doutora Graça Fialho e ao grupo da Surdez Hereditária do BioFIG por toda a ajuda e apoio fornecido;

Aos meus pais, irmã e toda a família por tudo o resto...

Resumo

O diagnóstico precoce da surdez é importante para a tomada de decisão relativamente à (re)habilitação dos indivíduos, nomeadamente através do uso de Implante coclear (CI). O diagnóstico molecular de mutações em *GJB2* é hoje realizado rotineiramente para estudos etiológicos da surdez, sugerindo alguns estudos anteriores que crianças com surdez associada a *GJB2* são bons candidatos a CI.

Neste estudo analisou-se o gene *GJB2* e duas deleções comuns em *GJB6* em 57 indivíduos portugueses com CI há pelo menos 5 anos e investigou-se uma possível associação com o sucesso da (re)habilitação oral. Também foram analisadas duas outras amostras, uma constituída por 94 indivíduos aleatórios de Leiria e do Alentejo, e outra por 22 famílias com NSRD, para estimar a prevalência de mutações em *GJB2* neste estudo.

Nas amostras de Leiria e do Alentejo encontrámos alterações em *GJB2* em 17% e 6.4% dos casos, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre estes valores. Não foram encontrados portadores da mutação 35delG.

Nas famílias com NSRD 17% dos probandos apresentavam surdez associada a *GJB2*, sendo 35delG o alelo mutado mais comum (87%).

Os indivíduos com CI foram implantados no CHC onde foram avaliados ao nível clínico, audiológico e de desempenho na fala, a fim de estimar o sucesso da sua (re)habilitação oral. Os resultados da análise molecular mostram que quase metade dos indivíduos (42%) tem mutações em *GJB2*, tendo a causa da surdez ficado estabelecida em 37% dos casos. O alelo mutado mais comum foi 35delG (87%). Nenhuma das deleções em *GJB6* foi detectada. Não foi encontrada uma associação significativa entre o sucesso da (re)habilitação oral e a presença/ausência de mutações em *GJB2* neste estudo.

No entanto, ficou bem evidenciado o papel importante da surdez associada ao gene *GJB2* em Portugal e o sucesso da (re)habilitação oral destes indivíduos.

Palavras chave: Surdez, Implantes Cocleares, Mutações em *GJB2*

Abstract

Early diagnosis of deafness is important for decision-making concerning (re)habilitation of the individuals, namely through the use of cochlear implant (CI). Molecular diagnosis of *GJB2* mutations is now routinely performed for etiological studies of deafness, some previous reports suggesting that children with *GJB2*-associated hearing loss are good CI candidates.

This study analyzed the *GJB2* gene and two common deletions in *GJB6* in 57 Portuguese individuals with CI for at least 5 years and investigated a possible association with the success of oral (re)habilitation. Two other samples were also analysed, one consisting of 94 random individuals from Leiria and Alentejo, and another of 22 families with NSRD, to estimate the prevalence of *GJB2* mutations in this study.

In the samples from Leiria and Alentejo *GJB2* variants were found in 17% and 6.4% of cases, respectively, with no significant differences between these values. No carriers of the 35delG mutation were found.

In the families with NSRD 17% of the probands presented *GJB2*-associated deafness, 35delG being the most common mutated allele (87%) found.

All individuals with CI were implanted in CHC where they were evaluated at clinical, audiological and speech performance level in order to estimate the success of their oral (re)habilitation. The molecular analysis showed that nearly half of individuals (42%) have mutations in *GJB2*, the cause of deafness having been established in 37% of cases. The most common mutated allele was 35delG (87%). None of the *GJB6* deletions was detected. No significant association between the success of oral (re)habilitation and presence/absence of mutations in *GJB2* was found in this study.

However, it was clearly highlighted the important role of *GJB2*-associated deafness in Portugal and the success of these individuals' oral (re)habilitation.

Key words: Deafness, Cochlear Implants, *GJB2* mutations

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Surdez

A surdez é a deficiência sensorial congénita mais frequente (Snoeckx *et al.* 2005) e estima-se que cerca de 4.2% da população mundial se encontra afectada com algum tipo de deficiência auditiva desabilitante (Morton e Nance 2006). Em Portugal, esse número chega a cerca de 116 000 habitantes (~1.2% da população) e em muitos casos essa perda auditiva tem solução em termos de ganho de comunicação (Inquérito Nacional às Incapacidades, Deficiências e Desvantagens 1996).

Trata-se de uma condição que limita a integração social da criança e interfere com o seu desenvolvimento ao nível cognitivo e linguístico. Estes efeitos são grandemente influenciados pela severidade da perda auditiva e pela idade de manifestação (Kalatzis e Nance 1998), mas quanto mais cedo a surdez for diagnosticada, melhor se consegue minimizar os seus efeitos. Crianças que nasçam surdas ou que desenvolvam surdez nos primeiros anos de vida, antes do desenvolvimento da fala (surdez pré-lingual), terão mais hipóteses de adquirir uma linguagem, seja falada ou gestual, e manter um desenvolvimento social e emocional paralelo ao seu desenvolvimento físico se a surdez for diagnosticada antes dos 6 meses de idade (Morton e Nance 2006).

Nos países desenvolvidos, cerca de 60% dos casos de surdez têm uma origem genética, dos quais em 30% a surdez está associada a outros sintomas (sindrómica) e nos restantes 70% encontra-se isolada (não-sindrómica) (Taitelbaum-Swead *et al.* 2006). A maioria dos casos de surdez não-sindrómica tem um padrão de hereditariedade autossómico recessivo (80%) existindo também casos em que é autossómico dominante (17%), ligado ao cromossoma X (2% a 3%) ou ainda mitocondrial (1%) (Snoeckx *et al.* 2005). As formas autossómicas recessivas são normalmente as mais severas e são quase exclusivamente pré-linguais e devidas a defeitos cocleares. Este tipo de surdez denomina-se sensorineural, dado que a deficiência ocorre na transmissão do sinal sonoro desde o ouvido interno até ao cérebro, em oposição à surdez de condução, onde as alterações se encontram ao nível do ouvido externo e/ou médio (Kalatzis e Nance 1998).

As causas genéticas da surdez são extremamente heterogéneas, estando identificados até ao momento 77 *loci* associados à surdez não-sindrómica autossómica recessiva, dos quais já foram clonados 26 genes diferentes (Hereditary Hearing Loss Homepage, Agosto de 2008). Estes codificam uma enorme variedade de proteínas, desde factores de transcrição, canais iónicos, junções comunicantes e proteínas que formam a matriz extracelular do ouvido interno (Taitelbaum-Swead *et al.* 2006). Com a evolução que o estudo da surdez sofreu nos últimos anos parece provável que, no futuro, a lista de genes que estejam envolvidos em qualquer tipo de surdez chegue a incluir mais de 1% de todos os genes humanos (Nance 2003).

1. INTRODUÇÃO

1.2 Conexinas

As conexinas são uma família de proteínas que compõem as subunidades das junções comunicantes (Nance 2003). Seis conexinas oligomerizam para formar hemi-canais hexaméricos na membrana plasmática, chamados conexões. Quando 2 conexões de células vizinhas se ligam, forma-se uma junção comunicante funcional, tornando assim possível a transferência de íons e de pequenas moléculas com tamanho até 1200Da entre células adjacentes (Harris e Bevans 2001). Da mesma maneira que os conexões podem ser formados por conexinas idênticas (homoméricos) ou de diferentes tipos (heteroméricos), também as junções comunicantes podem ser compostas por 2 conexões semelhantes (homotípicas) ou de composições diferentes (heterotípicas) (Snoeckx *et al.* 2005).

Sabe-se que as conexinas 26, 30, 31, 32 e 43 são expressas no ouvido interno tendo um papel importante na audição (Schrijver 2004). A vibração mecânica do som, após passar pelo ouvido médio, vai provocar a ondulação da endolinfa presente no ducto coclear. Esta vibração vai estimular os cílios das células ciliadas presentes no órgão de Corti levando-as a receber os íons potássio (K^+) que estão em grande concentração na endolinfa (Figura 1). É este influxo de K^+ que vai provocar a despolarização da membrana e consequente potencial de acção que vai activar o nervo acústico (Schrijver 2004). Ainda não se sabe exactamente por que mecanismo, mas pensa-se que as junções comunicantes formadas pelas conexinas são as responsáveis pela reciclagem do K^+ necessário para manter o gradiente electroquímico entre as células ciliadas e a endolinfa indispensável à audição (Kalatzis e Nance 1998).

Mutações descritas nestes genes comprometem a função dos canais iónicos, levando a alterações na circulação de K^+ e estão geralmente associadas a fenótipos de surdez profunda e congénita (Propst *et al.* 2006).

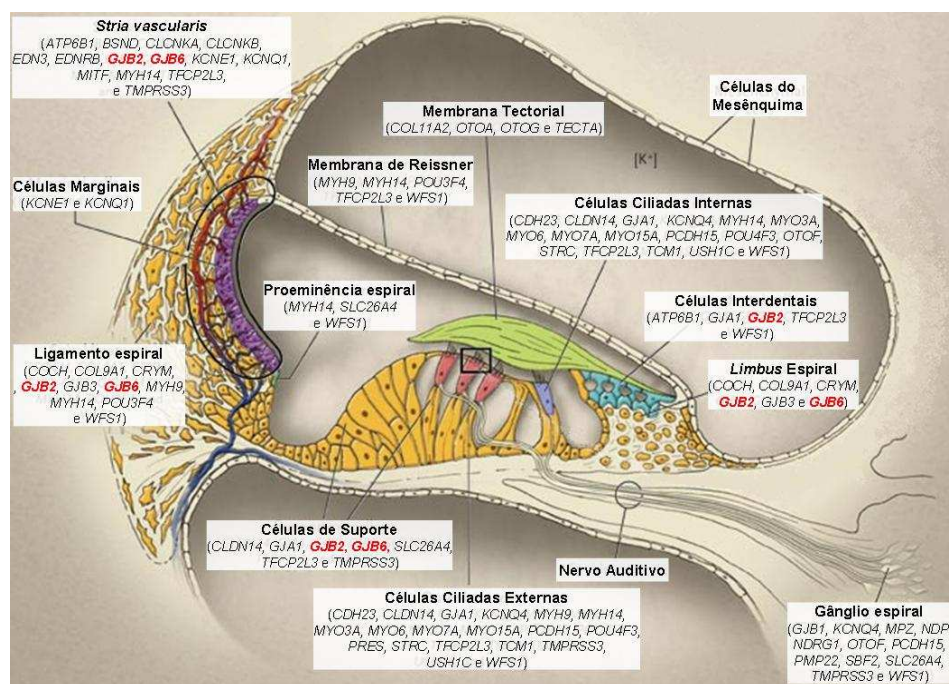


Figura 1. Esquema da cóclea e do órgão de Corti, adaptado de Morton e Nance (2006).

Estão representados os genes envolvidos na surdez (onde os genes **GJB2** e **GJB6** estão assinalados a vermelho) e os locais onde os seus produtos são expressos.

1. INTRODUÇÃO

1.2.1 Conexina 26 (*GJB2*)

O gene *GJB2* foi o primeiro a ser identificado como associado à surdez autossômica recessiva (Kelsell *et al.* 1997), tendo sido mapeado no cromossoma 13 onde estava identificado o primeiro *locus* (DFNB1) deste tipo de surdez (Guilford *et al.* 1994). Este gene codifica a proteína conexina 26 (cx26) que é largamente expressa na cóclea ao nível das células de suporte do órgão de Corti e dos tecidos conectivos (Morton e Nance 2006) (Figura 1). Como o resto das conexinas, pensa-se que a cx26 esteja envolvida na circulação de K⁺ no órgão de Corti (Taitelbaum-Swead *et al.* 2006).

Apesar da grande variedade de genes envolvidos na surdez (Figura 1), verificou-se que as mutações no gene *GJB2* são as mais frequentes em casos de surdez neurosensorial não síndrômica recessiva, sendo responsáveis por aproximadamente 50% destes casos (Christiani *et al.* 2007). Encontram-se já descritas 109 mutações não-sindrômicas em *GJB2*, das quais 9 são dominantes, 90 recessivas e 10 com hereditariedade ainda desconhecida, sendo que a patogenicidade ainda não tenha sido determinada em algumas destas mutações (The Connexin Deafness Homepage, Agosto de 2008). O espectro de mutações e as respectivas frequências divergem bastante entre diferentes populações, sendo que a mutação 35delG é a mais comum em caucasianos, a 235delC em japoneses, a 167delT em judeus Ashkenazi e a V37I em Taiwan (Snoeckx *et al.* 2005). Em Portugal a mutação 35delG é de longe a mais frequente, correspondendo a 80% dos alelos mutados em *GJB2*, e está presente em cerca de 15% das famílias portuguesas com surdez bilateral congénita não síndrômica recessiva (Trincão *et al.* 2006). A surdez associada a homocigóticos para 35delG está descrita como sendo sensorineural, simétrica, severa a profunda e tipicamente não progressiva (Hişmi *et al.* 2006). Está também descrito, na região 3' UTR de *GJB2*, um polimorfismo localizado no nucleótido 765 (nt+765) do qual se sabe estar o alelo T associado à mutação 35delG (Roux *et al.* 2004).

1.2.2 Conexina 30 (*GJB6*)

Localizado no mesmo *locus* DFNB1 que o gene *GJB2*, a cerca de 40Kb encontra-se o gene *GJB6* (Nance 2003). A proteína expressa pelo gene *GJB6* é a conexina 30 (cx30) que é co-expressa com a cx26 na cóclea (Figura 1), podendo formar conexões heteroméricas com esta (Morton e Nance 2006).

Envolvendo este gene foram identificadas 2 grandes deleções, del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854), com tamanhos de 342Kb e 232Kb, respectivamente (del Castillo *et al.* 2005). Estas deleções inactivam o gene *CRYL1*, que se encontra a montante de *GJB6*, e delectam os exões 1 e 2 de *GJB6* (Figura 2).

1. INTRODUÇÃO

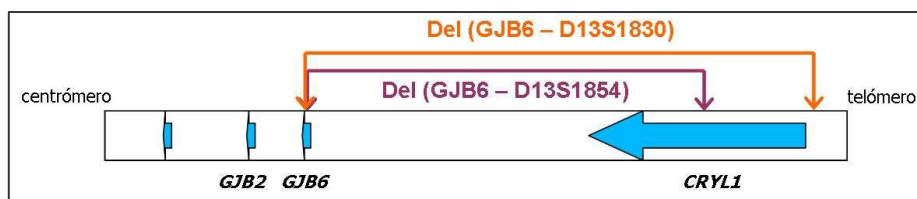


Figura 2. Localização das deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) em relação aos genes *GJB2*, *GJB6* e *CRYL1*, adaptado de del Castillo *et al.* (2005).

Estas duas deleções são frequentemente encontradas em dupla heterozigotia com mutações em *GJB2*, resultando na perda funcional do *cluster* de conexinas, o que leva a pensar que a surdez associada a estes casos seja causada por uma interacção digénica (Taitelbaum-Swead *et al.* 2006). Este efeito digénico poderá ajudar a explicar a etiologia da surdez em indivíduos com mutações monoalélicas em *GJB2* que por si só não sejam a causa da deficiência auditiva (Nance 2003). Está descrito que cerca de 8% dos casos associados a DFNB1 sejam causados por esta dupla heterozigotia (Morton e Nance 2006). Alternativamente, estas deleções podem estar simplesmente a inactivar um elemento regulatório de *GJB2*, localizado a montante, que ainda não tenha sido descoberto (Schrijver 2004) e o facto de estarem a delectar *GJB6* não seja importante.

Os duplos heterozigóticos com uma mutação em *GJB2* e qualquer uma das deleções de *GJB6* estão associados ao mesmo tipo de surdez que os homozigóticos para *GJB2* (Taitelbaum-Swead *et al.* 2006).

Também a prevalência destas deleções varia bastante em diferentes populações, desde 20% nos Estados Unidos a 71.4% em Israel (Schrijver 2004). Um caso extremo de variabilidade é a enorme diferença de prevalências entre Portugal e Espanha: enquanto que no nosso país vizinho a deleção del(*GJB6*-D13S1830) está presente em cerca de 2 terços dos surdos heterozigóticos para *GJB2* (Nance 2003), esta ainda não foi encontrada em nenhuma família portuguesa; e para os 25.5% de heterozigóticos para *GJB2* espanhóis que não tinham a deleção del(*GJB6*-D13S1830) mas cuja surdez ficou explicada com a deleção del(*GJB6*-D13S1854) (del Castillo *et al.* 2005), em Portugal apenas 4 famílias das 189 testadas (~2%) apresentavam esta última deleção.

1.3 Implantes cocleares

O ouvido foi o primeiro órgão dos sentidos a ser completamente substituído por um dispositivo electrónico, tornando-se assim a surdez o único defeito sensorial que pode ser tratado com sucesso, mesmo que a perda auditiva seja completa (Schrijver 2004). O dispositivo usado é o implante coclear que substitui fisiologicamente a cóclea do indivíduo, sendo usado principalmente em situações de surdez severa a profunda.

O implante é colocado cirurgicamente por dentro da pele atrás da orelha e uma espira de eléctrodos é introduzida através do crânio e do ouvido médio até à cóclea (Figura 3).

1. INTRODUÇÃO

O implante recebe o som codificado por um processador de linguagem e envia um padrão de pequenos e rápidos impulsos eléctricos aos eléctrodos dentro da cóclea. De acordo com a intensidade e frequência do som, estes estimulam directamente os nervos auditivos que transportam a informação ao cérebro onde é então processada (http://www.geocities.com/cicentral/how_ci_works.html).

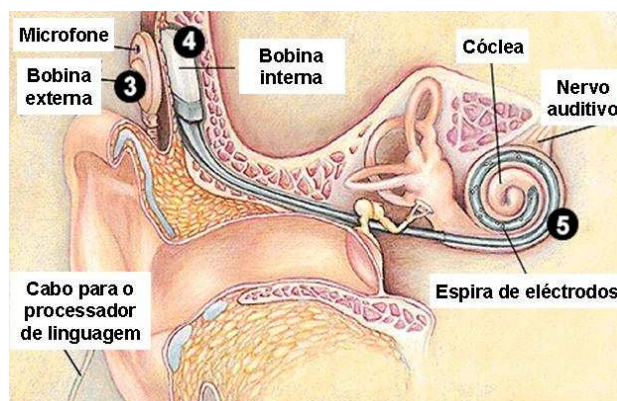


Figura 3. Esquema da localização de um implante coclear e respectivos componentes internos, adaptado de http://www.geocities.com/cicentral/how_ci_works.html

Uma vez que muitas crianças surdas têm pais ouvintes (Nance 2003) os implantes cocleares podem melhorar drasticamente a comunicação e a qualidade de vida de muitos implantados e das respectivas famílias. Mas o desempenho com o implante coclear é variável e sabe-se que depende de diversos factores como a idade de implantação – quanto mais cedo for implantado, melhor será o desempenho, e crianças implantadas antes dos 2 anos de idade têm um desenvolvimento semelhante a crianças normo-ouvintes (Manrique *et al.* 2004); tempo de uso do implante – quando se comparam diferentes idades e idades de implantação (Connell *et al.* 2007); quantidade de audição residual e modo de comunicação (Taitelbaum-Swead *et al.* 2006). No entanto, já foi documentado que a contribuição destes factores para a percepção da fala explica menos de 50% da variabilidade dos resultados (Clark *et al.* 1997), devendo os restantes estar relacionados com outros factores. Um destes factores poderá ser a etiologia da surdez (Morton e Nance 2006, Christiani *et al.* 2007, Connell *et al.* 2007). Casos de surdez onde a etiologia envolva a lesão das células ciliadas, como acontece na surdez genética associada a *GJB2*, terão uma performance com implante coclear melhor do que a manifestada pelos indivíduos onde a surdez esteja associada a danos neurais e/ou centrais do sistema auditivo, derivados por exemplo, de infecção com citomegalovírus, meningite ou neuropatia auditiva (Taitelbaum-Swead *et al.* 2006). Neste sentido, vários estudos compararam a percepção da fala em crianças implantadas em função da presença/ausência de mutações em *GJB2*. Enquanto uns autores apontam para melhores resultados no grupo onde a surdez está associada a mutações em *GJB2* (Fukushima *et al.* 2002, Kwasaki *et al.* 2006), outros indicam não haver diferenças significativas comparativamente ao grupo onde a surdez não tem esta etiologia (Green *et al.* 2002, Lustig *et al.* 2004).

Deste modo, conhecer o genótipo de indivíduos onde o implante coclear seja um sucesso ao nível da performance oral torna-se importante, pois este dado poderá ajudar a melhor compreender a fisiologia do ouvido interno e a definir de forma mais adequada a abordagem clínica destes indivíduos com vista à sua (re)habilitação oral.

2. OBJETIVOS

2. OBJECTIVOS

O objectivo geral deste trabalho consiste em estudar os génotipos dos genes *GJB2* e *GJB6* em indivíduos da população portuguesa com surdez congénita que tenham implante coclear e investigar uma possível associação entre o seu génotipo e o sucesso de (re)habilitação oral derivada do uso do implante.

Tendo em vista este objectivo pretende-se: I) seleccionar uma amostra de indivíduos com surdez neurosensorial autossómica recessiva que possuam implante coclear há mais de 5 anos; II) identificar alterações no exão codificante do gene *GJB2* e pesquisar a existência das deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6*; e III) comparar as frequências genótípicas encontradas com dados fornecidos pela equipa de Otorrinolaringologia (ORL) do Centro Hospitalar de Coimbra relativamente ao sucesso da (re)habilitação oral apresentado pelos indivíduos da amostra. Pretende-se com este trabalho contribuir para o estabelecimento de uma relação génotipo *GJB2/GJB6* - sucesso de implante coclear, que permita vir a prever o sucesso clínico da recuperação de um certo grau de audição em indivíduos com surdez profunda.

Paralelamente, pretende-se determinar a prevalência de mutações em *GJB2* numa amostra aleatória de indivíduos da população portuguesa (regiões de Leiria e do Alentejo) obtida através do Programa Nacional de Diagnóstico Precoce (Teste do Pézinho) e numa amostra de novos casos de surdez não-sindrómica em famílias portuguesas.

Este estudo é o primeiro, em Portugal, a ser realizado na população surda com implante coclear, esperando-se que possa contribuir para o aconselhamento genético de indivíduos candidatos a CI que sejam portadores de mutações em *GJB2*, bem como para um melhor conhecimento da surdez associada a *GJB2* em Portugal

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Selecção e caracterização das amostras

3.1.1 Amostras aleatórias de Leiria e do Alentejo

Foram testadas amostras de cartões de Guthrie, colhidos para o Teste do Pézinho (Programa Nacional de Diagnóstico Precoce, INSA), de recém-nascidos provenientes das regiões de Leiria e do Alentejo.

Incluímos nesta amostra, indivíduos nascidos nos últimos 5 anos, e não nos foi fornecido qualquer tipo de informação relativa às crianças, à excepção da sua região de origem (Leiria ou Alentejo), sendo este estudo, por isso, completamente cego.

3.1.2 Famílias com surdez

As famílias analisadas neste estudo foram-nos direccionadas pelos hospitais Egas Moniz, Dona Estefânia, Santa Maria, Garcia da Orta e pela Faculdade de Medicina do Porto, onde foram submetidas a uma avaliação clínica e audiológica. Após consentimento informado os indivíduos/famílias foram entrevistados de modo a obter informações precisas sobre a surdez, a idade de manifestação, severidade e progressividade, excluir possíveis causas ambientais e a perceber a sua hereditariedade através da árvore genealógica.

Foram seleccionados casos de surdez não-sindrómica sensorineural bilateral, de etiologia desconhecida e com padrão de hereditariedade autossómica recessiva.

3.1.3 Indivíduos implantados

A amostra de crianças implantadas foi recolhida pelo serviço de ORL do Centro Hospitalar de Coimbra, onde já se efectuam implantes cocleares há 23 anos. Todos os indivíduos apresentavam, antes de serem implantados, surdez congénita não-sindrómica bilateral profunda de origem desconhecida, tendo sido excluídos os que tivessem possíveis causas ambientais. Os indivíduos incluídos neste estudo não são relacionados entre si, tendo sido escolhido o irmão mais velho em casos familiares onde existe mais do que 1 indivíduo implantado.

Foram seleccionadas crianças que tivessem o implante coclear há pelo menos 5 anos, de modo a tentar esbater o efeito do tempo de uso do implante na sua (re)habilitação oral, uma vez que a performance oral tem um grande aumento nos primeiros anos, mas tende a estabilizar por volta dos 4-5 anos.

3.2 Testes efectuados para avaliar sucesso do implante

O sucesso da (re)habilitação oral derivado do implante coclear foi avaliado a partir dos resultados de uma bateria de 12 testes efectuados pelos terapeutas da fala e audiologistas do serviço de ORL do CHC. A maioria destes testes consistia na repetição, por parte do

3. MATERIAIS E MÉTODOS

indivíduo implantado, de palavras ou frases ditas pela terapeuta da fala por trás da criança, de modo a que esta não pudesse ler nos lábios, contabilizando-se o número de palavras (Teste de Frases Sem Apoio, Teste de Monossílabos e de Números) ou de fonemas (Teste de Monossílabos Fonemas e de Números Fonemas) repetidos correctamente. A Compreensão de Estruturas Complexas foi avaliada através de um teste que envolve uma série de perguntas e respostas acerca de uma situação ilustrada. De um modo semelhante, o teste TOKEN¹, usado para crianças mais novas, baseia-se na identificação de formas e de cores de objectos ditas pela terapeuta da fala. A Grelha de Avaliação das Características Vocais (GACV), como o próprio nome indica, avalia a fala dos indivíduos implantados, nomeadamente se têm uma intensidade, altura tonal, ressonância nasal, entoação e coordenação pneumofonoarticulatória adequadas, atribuindo um valor de 1 a 5 do menos ao mais adequado, respectivamente. Também o Rácio de Inteligibilidade do Discurso (SIR) é pontuado de 1 a 5 onde se atribui 5 a uma criança cujo discurso é inteligível para todos os ouvintes e 1 a uma criança em que o discurso não seja inteligível para todos. Por fim, as terapeutas da fala avaliaram também o modo geral de articulação das palavras (Teste Articulação) pela criança implantada. Os testes audiológicos consistiram na determinação do Limiar de Discriminação, que corresponde ao valor de decibéis a que é atingido 50% de discriminação dos sons e na avaliação do Limiar Tonal em Campo Livre, que se baseia no cálculo do limiar auditivo médio nas frequências 500Hz, 1000Hz, 2000Hz e 4000Hz em campo livre através da fórmula do BIAP (Bureau International d'AudioPhonologie) que consiste em:

$$\text{Limiar Tonal em Campo Livre} = (\text{limiar a 500} + \text{limiar a 1000} + \text{limiar a 2000} + \text{limiar a 4000})/4$$

No sentido de avaliar globalmente a oralidade destes indivíduos, foi desenvolvida uma fórmula que considera apenas 7 dos testes efectuados, cujos resultados foram sempre expressos numa escala de 1 a 5. Nesta fórmula, desenvolvida pela equipa de ORL do CHC, é atribuída a cada teste uma diferente ponderação em função das suas especificidades e contributo para a melhor performance oral:

$$\text{Avaliação Oral Global} = (\text{MonFon} * 2 + \text{NúmFon} * 2 + \text{Frases} * 2 + \text{GACV} * 2 + \text{SIR} * 2 + \text{LimTon} * 4 + \text{LimDis} * 6) / 20$$

MonFon = resultado do teste Monossílabos Fonemas; NúmFon = resultado do teste Números Fonemas; Frases = resultado do teste Frases Sem Apoio; GACV = resultado do teste Grelha de Avaliação das Características Vocais; SIR = resultado do teste Rácio de Inteligibilidade do Discurso; LimTon = resultado do teste Limiar Tonal em Campo Livre; LimDis = resultado do teste Limiar de Discriminação

Os resultados da aplicação desta fórmula são também expressos de 1 a 5 e para facilitar a comparação dos valores de avaliação global obtidos definiram-se categorias para uma avaliação qualitativa correspondendo os valores de 0 a 1.4 à categoria de “Mau”, de 1.5 a 2.4 à de “Insuficiente”, de 2.5 a 3.4 à de “Suficiente”, de 3.5 a 4.4 à de “Bom” e de 4.5 a 5 à de “Muito Bom”.

¹ Mantém-se em Portugal o nome original em inglês por não haver uma tradução adequada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.3 Métodos

3.3.1 Extração de DNA genómico a partir de amostras de sangue

As amostras de sangue utilizadas para obtenção de DNA foram recolhidas e armazenadas de 2 modos diferentes:

- extração de cerca de 5mL de sangue periférico para tubos de hemograma estéreis, contendo EDTA, armazenados a -20°C.

- utilização de cartões FTA (FTA Classic Cards – Whatman Bioscience Ltd.) ou cartões Guthrie em que o sangue é obtido por uma picada do dedo do indivíduo ou no pé do recém-nascido, respectivamente, criando a mancha de sangue no cartão. Os cartões são guardados a temperatura ambiente em local seco.

Para a extração de DNA genómico a partir de sangue em tubos de hemograma utilizou-se o JetQuick Blood and Cell Culture Kit (GENOMED), seguindo as instruções do fabricante.

Nos cartões FTA e Guthrie cortou-se cerca de 1cm² da mancha de sangue no cartão em pedaços de 2mm², ao qual se adicionou 500µL de tampão DLB (1mL Tris/HCl 1M pH=7.4; 0.2mL NaCl 5M; 2mL EDTA 0.5M pH=8.0; 96.8mL H₂O), 50µL de SDS (10%) e 5µL de proteinase K (20mg/mL). A mistura foi incubada a 56°C durante a noite agitando suavemente. De seguida adicionou-se 20µL de NaCl (5M) e 575µL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), misturou-se por inversão e separou-se a solução em 2 fases com uma centrifugação a 12000rpm durante 3 minutos. Recuperou-se a fase superior para um novo tubo, juntou-se 575µL de uma solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e voltou-se a centrifugar a 12000rpm durante 3 minutos. Recuperou-se a fase superior para um novo tubo ao qual se adicionou 1ml de etanol a 96% armazenado a -20°C e deixou-se a mistura a incubar durante 1 hora a -20°C. Após uma centrifugação de 15 minutos a 4°C e 12000rpm descartou-se o etanol e secou-se o precipitado. Por fim adicionou-se 100 µL de água ultra-pura para re-hidratar o DNA e incubou-se a 56°C durante a noite. Com este método obtêm-se concentrações de DNA de cerca de 50ng/µL.

Para verificar que as extrações tiveram sucesso o DNA foi sempre visualizado por electroforese, em gel de agarose 1% (UltrapureTM Agarose da Invitrogen) em tampão TBE 0.5X, utilizando-se o marcador de pesos moleculares 1Kb Plus Ladder (Invitrogen). Após a corrida do gel o DNA foi corado com brometo de etídeo e fotografado com o sistema fotográfico EDAS 290 (Kodak Digital Science). As fotografias dos géis foram tratadas com o software específico Kodak 1D (Scientific Imaging Systems).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.2 Amplificação por *Polimerase Chain Reaction* (PCR)

O método utilizado para amplificação das regiões de DNA estudadas neste trabalho foi a técnica de PCR. Esta técnica permite-nos obter uma grande quantidade de DNA da região pretendida partindo de uma amostra relativamente pequena.

Para confirmar a ausência de contaminantes em todos os reagentes utilizados, em cada reacção de PCR efectuada incluiu-se um controlo negativo, onde não se adicionou DNA à mistura de reacção. As reacções de PCR foram efectuadas nos termocicladores Biometra T Gradient, Biometra T1 Thermocycler e Biometra Personal Cycler (Whatman) e os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2% como descrito em 3.2.1.

3.3.2.1 Amplificação por PCR para sequenciação

A pesquisa de mutações no gene *GJB2* foi efectuada recorrendo à sequenciação automática de todo o exão codificante (exão 2). Os *primers* utilizados amplificam o exão codificante inteiro e o local aceitador de *splicing* e a reacção de PCR foi optimizada no termociclador Biometra T Gradient (Whatman) segundo as condições indicadas na Tabela 1.

As misturas de reacção de PCR tinham um volume final de 50µL e continham tampão de amplificação 1X, dNTPs (a 250µM cada), *primer forward* e *reverse* (a 0.4µM cada), MgCl₂ (1.5mM), BSA (0.001%), Taq DNA polimerase (Invitrogen) (0.75U), água ultra-pura esterilizada e 6µL de DNA molde. As reacções de PCR foram efectuadas com as seguintes condições: 5 min de desnaturação a 94°C seguida de 30 ciclos de 1 min de desnaturação a 94°C, 1 min de emparelhamento a 60.7°C (T_m) e 1 min de extensão a 72°C; e para finalizar 7 min de extensão final a 72°C.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados, respectivas temperaturas de *melting* (T_m) e dimensão dos fragmentos amplificados.

Amplificam	Sequência dos <i>primers</i>	T _m	Dimensão do fragmento
O Exão 2 de <i>GJB2</i>	2AF: AAGTCTCCCTGTTCTGTCTCCT 2BR: GGCATCTGGAGTTTCACC	60.7°C	928pb
O Exão 1 de <i>GJB6</i>	Cx30Ex1A: CGTCTTTGGGGGTGTTGCTT Cx30Ex1B: CATGAAGAGGGCGTACAAGTTAGAA	67°C	333pb
Se tiver del(<i>GJB6</i> -D13S1830)	<i>GJB6</i>-1R: TTTAGGGCATGATTGGGGTGATTI BKR-1: CACCATGCGTAGCCTTAACCATTI		460pb
Se tiver del(<i>GJB6</i> -D13S1854)	DelBK1: TCATAGTGAAGAACTCGATGCTGTI DelBK2: CAGCGGCTACCCTAGTTGTGGT		564pb
Fragmento delta de <i>GJB2</i>	22BF: GGTGAGGTTGTGTAAGAGTTGG 22BR: CTGGTGGAGTGTGTTGTTCCAC	61°C	209pb
Fragmento gama de <i>GJB2</i>	FP: GGGAGATGAGCAGGCCGACT RP: ACGTGCATGGCCACTAGGAGC		153pb

Primers 2AF, 2BR, Cx30Ex1A, Cx30Ex1B, *GJB6*-1R, BKR-1, DelBK1 e DelBK2 (Invitrogen), *primers* 22BF, 22BR, FP e RP (QIAGEN OPERON). ■ – *primer forward*; ■ – *primer reverse*; C – base alterada para o PSDM.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.2.2 Amplificação por PCR *multiplex* para detectar deleções em *GJB6*

Todos os indivíduos implantados que não apresentavam mutações em *GJB2*, ou que eram heterozigóticos para essas mutações foram testados para a presença das deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)* no gene *GJB6*.

O teste utilizado foi um PCR *multiplex* onde 3 pares de *primers* são adicionados à mistura de reacção e vão amplificar em alternativa, consoante estão ou não suficientemente próximos para tal, o que depende da presença ou ausência das deleções. Assim, e como se esquematiza na Figura 4: o par de *primers* Cx30Ex1A e Cx30Ex1B amplifica um fragmento de 333pb na presença de um alelo normal, o par de *primers* DelBK1 e DelBK2 origina um produto de PCR com 564pb num alelo com a deleção *del(GJB6-D13S1854)* e o par de *primers* *GJB6-1R* e BKR-1 amplifica um fragmento com 460pb num alelo com a deleção *del(GJB6-D13S1830)*.

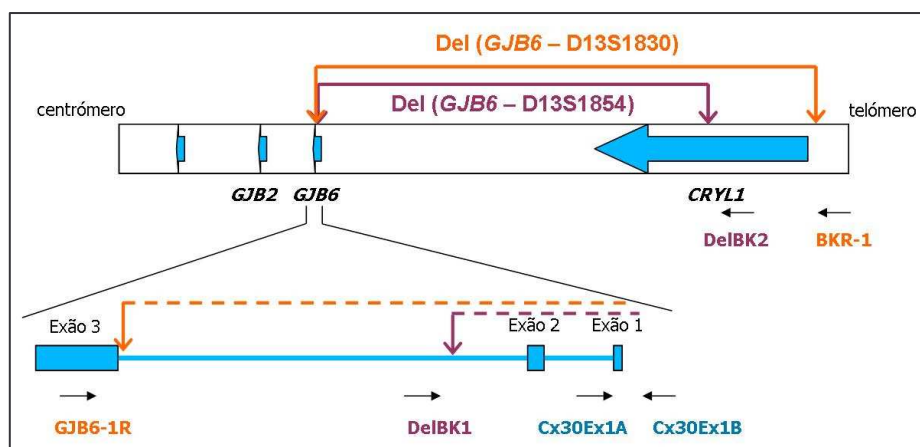


Figura 4. Esquema da reacção de PCR *multiplex* para a pesquisa das deleções *del(GJB6-D13S1830)* e *del(GJB6-D13S1854)*, adaptado de del Castillo *et al.* (2005).

Os pares de *primers* utilizados e a respectiva temperatura de *melting* encontram-se descritos na Tabela 1. O padrão de bandas esperado para cada uma das situações de homozigotia e heterozigotia encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2. Padrão de bandas esperado do teste das deleções envolvendo *GJB6*.

Genótipo	Homozigótico selvagem	Heterozigótico para <i>del(GJB6-D13S1830)</i>	Heterozigótico para <i>del(GJB6-D13S1854)</i>	Heterozigótico composto <i>del(GJB6-D13S1830)</i> <i>del(GJB6-D13S1854)</i>
Dimensão (pb)	333pb	333pb + 460pb	333pb + 564pb	460pb + 564pb

As misturas de reacção de PCR, com um volume final de 15µL, eram constituídas por tampão de amplificação 1X, dNTPs (a 0.17mM), *primers forward* e *reverse* (a 0.7µM), MgCl₂ (1.5mM), Taq DNA polimerase (Invitrogen) (0.75U), água ultra-pura esterilizada e 3µL de DNA molde. As condições das reacções de PCR eram: 5 min de desnaturação a 95°C seguidos de 5 ciclos de 40 seg de desnaturação a 94°C e 40 seg de emparelhamento que

3. MATERIAIS E MÉTODOS

diminuem em cada ciclo 1°C, começando a 72°C, até que chegam à temperatura óptima de *melting*, 67°C; os restantes 25 ciclos eram constituídos por 40 seg de desnaturação a 94°C e 40 seg de emparelhamento a 67°C (T_m); por fim 7 min de extensão a 72°C.

3.3.2.3 Amplificação por PSDM para detectar a mutação 35delG por restrição

Uma vez que a mutação 35delG é a mais frequente no gene *GJB2*, em casos de surdez sensorineural não síndromica autossómica recessiva, torna-se importante estudar a presença desta mutação antes de sequenciar todo o exão codificante de *GJB2*. Assim, nos casos das famílias com surdez detectou-se a mutação 35delG por PSDM (mutagénesis dirigida por PCR). Este método, após amplificação com um *primer* alterado, origina um outro local de reconhecimento para a enzima de restrição *BslI*, quando na presença da mutação no DNA molde. Os *primers* utilizados para amplificar o local da mutação 35delG (fragmento delta) encontram-se descritos na Tabela 1, assim como um par de *primers* que amplifica um outro fragmento (gama) que irá servir de controlo interno para a reacção de restrição.

A mistura de reacção para amplificação do fragmento delta, com um volume total de 25µL, continha tampão de amplificação 1X, dNTPs (a 0.25mM cada), *primer forward* (3.2µM) e *reverse* (0.8µM), MgCl₂ (1.5mM), Taq DNA polimerase (Invitrogen) (0.75U), água ultra-pura esterilizada e 3µL de DNA molde. Por outro lado, a mistura de reacção do fragmento gama tinha um volume final de 50µL e era constituída por tampão de amplificação 1X, dNTPs (a 0.25mM cada), *primers forward* e *reverse* (a 0.4µM cada), MgCl₂ (1.5mM), BSA (0.001%) Taq polimerase (Invitrogen) (0.75U), água ultra-pura esterilizada e 6µL de DNA molde (DNA de um indivíduo normo-ouvinte). As condições de PCR para as 2 reacções de amplificação foram as mesmas: 1 min de desnaturação a 94°C seguida de 30 ciclos de 30 seg de desnaturação a 94°C, 30 seg de emparelhamento a 61°C (T_m) e 30 seg de extensão a 72°C; e para finalizar 5 min de extensão final a 72°C.

3.3.3 Restrição enzimática para detectar a mutação 35delG

Após a amplificação das regiões necessárias, a detecção da mutação 35delG foi efectuada por restrição enzimática. A enzima utilizada foi a *BslI* (New England BioLabs) e o tampão 3 correspondente (NEBuffer 3 da New England BioLabs).

Para controlo interno da reacção, como já foi referido, utilizou-se o fragmento gama que também possuía um local de reconhecimento da enzima *BslI*. Deste modo, para manter a concentração de DNA adequada na mistura de restrição, juntou-se a cada fragmento delta a testar, o fragmento gama e concentrou-se a mistura durante 7 minutos a 45°C no *speed vacuum* (eppendorf Concentrator 5301). Distribuiu-se a mistura de restrição pelos tubos contendo já os produtos de PCR concentrados, ficando cada tubo com o volume final de 20µL constituídos por tampão 3 1X, enzima *BslI* (2U), água ultra-pura esterilizada e 8µL da

3. MATERIAIS E MÉTODOS

mistura dos produtos de PCR. Por fim os tubos de reacção foram colocados a incubar a 55°C durante 3 horas num banho BioBlock (Scientific).

Em cada reacção de restrição efectuada adicionou-se um controlo negativo composto por um tubo contendo mistura dos produtos de PCR, tampão 3 e água ultra-pura esterilizada, mas sem se adicionar enzima de restrição. Como controlos externos utilizou-se um indivíduo homozigótico e um heterozigótico para 35delG e ainda um indivíduo selvagem, cujos genótipos tenham sido previamente determinados por sequenciação.

O padrão de bandas esperado resultante da digestão de indivíduos heterozigóticos, homozigóticos selvagens ou mutados para 35delG, assim como do fragmento gama, o fragmento controlo, está indicado na Tabela 3.

Tabela 3. Padrão de bandas esperado da digestão com *BsI*.

Fragmento	Dimensão do fragmento amplificado	Homozigótico selvagem	Heterozigótico	Homozigótico mutado
Delta	209pb ou 208pb	209pb	209pb + 186pb + 22pb	186pb + 22pb
Gama	153pb	90pb + 56pb + 7pb		

O fragmento delta amplificado tem 209pb se tiver o alelo selvagem e 208bp se tiver o alelo mutado, uma vez que se trata da deleção de uma base. As bandas com peso molecular de 22pb e 7pb não se conseguem distinguir no gel devido às suas reduzidas dimensões.

A visualização dos produtos de restrição foi efectuada por electroforese em gel de agarose com uma mistura de 1 agarose 1000 (Invitrogen): 2 agarose normal a 2% (p/v) em tampão TBE 0.5X. Utilizou-se o marcador de pesos moleculares 50bp Ladder (Invitrogen). O DNA foi corado e fotografado como já descrito em 3.2.1.

3.3.4 Purificação e sequenciação dos produtos de PCR

A pesquisa de mutações no gene *GJB2* foi efectuada por sequenciação do exão 2, como já referido. Para tal, foi necessário purificar os produtos de PCR de modo a eliminar os *primers*, sais, enzima e nucleótidos não incorporados que se mantêm na mistura de PCR em conjunto com os fragmentos de DNA amplificados, de modo a não interferirem com o método de sequenciação automática.

A purificação dos produtos de PCR foi efectuada usando o JetQuick Spin Column PCR Purification Kit (GENOMED), seguindo as instruções do respectivo kit. Os produtos de purificação foram visualizados em gel de agarose 2% como descrito em 3.2.1 para confirmar a eliminação dos *primers* e a concentração dos fragmentos a sequenciar.

A sequenciação foi realizada comercialmente utilizando um sequenciador automático ABI3700 (Applied Biosystems). A análise das sequências foi feita usando o software

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Chromas 2.32 que permite a comparação das sequências obtidas com sequências padrão utilizando o programa BLAST do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

3.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do software SPSS 16.0. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para estudar a relação entre os genótipos observados nos indivíduos da amostra e a avaliação obtida nos testes de performance oral. Ao contrário dos teste paramétricos, o Kruskal-Wallis não tem como pressuposto a distribuição normal da variável dependente, podendo assim ser usado para testar variáveis ordinais. A correlação de Spearman, também não paramétrica, foi utilizada para avaliar possíveis correlações da idade de implantação e do tempo de uso de implante com os resultados da avaliação oral global. O teste do Qui-Quadrado (χ^2) foi aplicado para comparar a frequência de portadores de mutações em *GJB2* entre as regiões de Leiria e do Alentejo.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Análise das amostras aleatórias de Leiria e do Alentejo

A prevalência de mutações em *GJB2* nos indivíduos provenientes do Programa Nacional de Diagnóstico Precoce oriundos de Leiria e do Alentejo foi estudada recorrendo à análise do exão 2 do gene *GJB2*. Os resultados obtidos nestas amostras resumem-se nas Tabelas 4 e 5. Os casos positivos identificados nestas 2 populações apresentam-se na Figura 5.

Tabela 4. Percentagens dos genótipos encontrados nas amostras de Leiria

Genótipo		nº	%	
Sem alterações em <i>GJB2</i>	+/+	39	82.97872	
Com alterações em <i>GJB2</i>	nt-34 C/T, nt+785 A/T, nt+792 C/T	2	4.25532	17.02128
	nt+785 A/T, nt+792 C/T	1	2.12766	
	+/M34T	1	2.12766	
	+/R127H	1	2.12766	
	+/E47X	1	2.12766	
	+/V37I	1	2.12766	
		47	100	

Tabela 5. Percentagens dos genótipos encontrados nas amostras do Alentejo

Genótipo		nº	%	
Sem alterações em <i>GJB2</i>	+/+	44	93.61702	
Com alterações em <i>GJB2</i>	nt-28 T/C	1	2.12766	6.38298
	+/W24X	1	2.12766	
	+/V27I	1	2.12766	
		47	100	

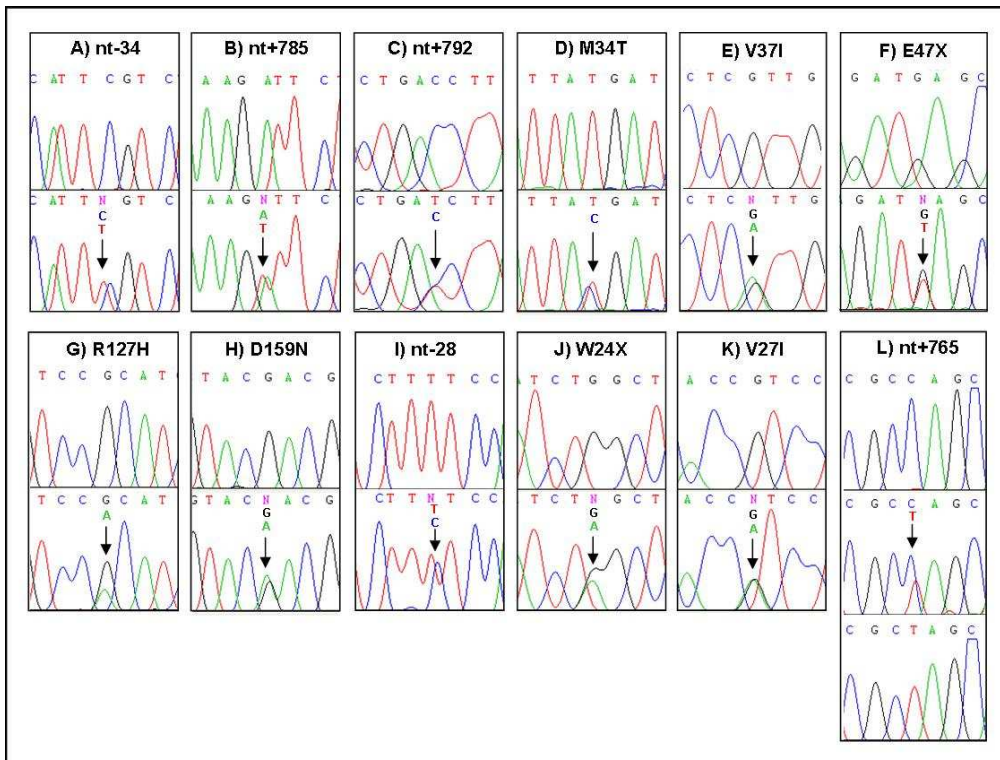


Figura 5. Electroforetogramas das variantes de *GJB2* (A a L) registadas nas amostras de Leiria e do Alentejo.

4. RESULTADOS

Todas as variantes identificadas no gene *GJB2*, foram apenas encontrados em heterozigotia. As mutações com patogenez já descrita V37I, D159N, E47X e W24X estão assinaladas a azul, os polimorfismos nt-34, nt+785, nt+792, nt-28 e V27I, a laranja e as alterações controversas M34T e R127H, a cinzento.

Foi feito o levantamento dos genótipos encontrados no nt+765, tendo-se encontrado na região de Leiria 31 indivíduos (~66%) com o genótipo C/C, 14 (~30%) com o genótipo C/T e 2 (~4%) com o genótipo T/T. Por sua vez, no Alentejo 21 (~45%) indivíduos tinham o genótipo C/C, 24 (~51%) o genótipo C/T e 2 (~4%) o genótipo T/T. Os casos com o genótipo nt+765 T/T aqui descritos não apresentam qualquer variante em *GJB2*.

4.2 Análise das famílias com surdez

4.2.1 Detecção da mutação 35delG

Foram analisados 23 probandos provenientes de 22 famílias diferentes com surdez sensorineural não-sindrômica autossômica recessiva. O estudo dos indivíduos começou pela pesquisa da mutação 35delG (Figura 6) feita por PSDM.

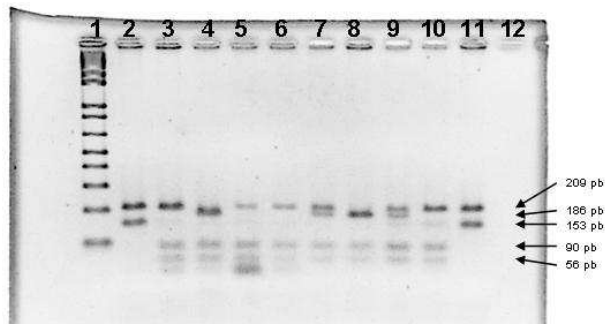


Figura 6. Fotografia do gel de restrição com *BslI*. Poço 1: Marcador de pesos moleculares 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen); poços 2 e 11: controle negativo da digestão (sem enzima); poços 3 a 5, 9 e 10: indivíduos em estudo; poço 6: controle homocigótico selvagem; poço 7: controle heterocigótico para 35delG; poço 8: controle homocigótico para 35delG; poço 12: vazio.

Esta mutação foi encontrada em 8 indivíduos (~35%) de 7 famílias (~32%) diferentes, sendo que 5 indivíduos eram heterocigóticos e 3 eram homocigóticos para 35delG. Os restantes 15 indivíduos não tinham esta mutação.

4.2.2 Sequenciação do gene *GJB2*

A pesquisa de outras mutações no gene *GJB2* foi efectuada através da sequenciação automática do exão 2. Na Figura 7 apresentam-se os electroforetogramas dos casos positivos. As variantes identificadas foram, para além da 35delG, a W24X, a M34T e a V95M, todas elas em heterocigotia. Estas mutações foram encontradas em 2 indivíduos com os genótipos 35delG/W24X e M34T/V95M.

Do total dos 23 probandos testados, 9 deles (~39%) provenientes de 8 famílias (~36%) distintas apresentavam

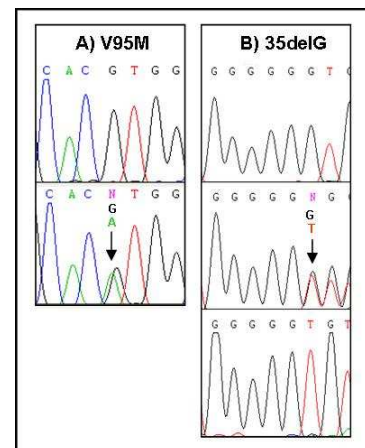


Figura 7. Electroforetogramas das variantes de *GJB2* (A e B) identificadas nas famílias com surdez¹

¹ As restantes variantes encontram-se ilustradas na figura 5: W24X (painel J), M34T (painel D) e nt+765 (painel L)

4. RESULTADOS

mutações em *GJB2* (Tabela 6), tendo sido identificada, sem dúvida, a causa de surdez em 4 indivíduos, com os genótipos 35delG/35delG (n=3) e 35delG/W24X (n=1).

Tabela 6. Percentagens dos genótipos identificados nos probandos das famílias analisadas

Genótipo		nº	%	
Sem mutações em <i>GJB2</i>	+/+	14	60.86957	
Com mutações em <i>GJB2</i>	+/35delG	4	17.39130	39.13043
	35delG/W24X	1	4.34783	
	35delG/35delG	3	13.04348	
	M34T/V95M	1	4.34783	
		23	100	

4.3 Análise dos indivíduos implantados

4.3.1 Caracterização dos indivíduos da amostra

Foi recolhida uma amostra de 64 indivíduos não relacionados entre si que correspondiam aos critérios de selecção. Devido a causas alheias a este estudo apenas 57 destes indivíduos realizaram todos os testes relevantes para a avaliação do sucesso da (re)habilitação oral (descritos em 3.2) e foram, por isso, incluídos neste trabalho.

Na Tabela 7 resume-se a informação relativa à caracterização dos 57 indivíduos estudados, nomeadamente: número de rapazes (M) e de raparigas (F); indicação de casos familiares e de casos esporádicos; a média de idades na altura da implantação; a média de idades dos indivíduos da amostra no momento em que realizaram a avaliação oral; os modelos de implante que cada indivíduo possui e a respectiva distribuição geográfica. Todos os indivíduos, apesar de apresentarem surdez bilateral, receberam apenas 1 implante coclear colocado por norma no ouvido direito, excepto nos indivíduos esquerditos.

Tabela 7. Caracterização da amostra de indivíduos implantados

Variável	Amostra (n=57)
M / F	32 / 25
Casos de surdez na família / Casos esporádicos	18 / 39
Idade de implantação (anos), média ± SD	3 ± 0.63
Idade aquando da avaliação (anos), média ± SD	11.56 ± 2.95
Modelo de implante	
CI22 *	6
CI22M *	8
CI24M *	23
CI24R CA Advance *	1
CI24R CS Contour *	16
CI24R ST K *	3
Distrito	
Aveiro	7
Braga	3
Castelo Branco	3
Coimbra	6
Funchal	2
Guarda	3
Leiria	9
Lisboa	5
Porto	10
Santarém	1
Setúbal	1
Viana do Castelo	1
Vila Real	1
Viseu	5

* modelo da CochlearTM.

4. RESULTADOS

4.3.2 Análise genética

4.3.2.1 Sequenciação do gene *GJB2*

As variantes encontradas por sequenciação do gene *GJB2* na amostra de indivíduos implantados, e as respectivas frequências relativas, ilustram-se na Figura 8.

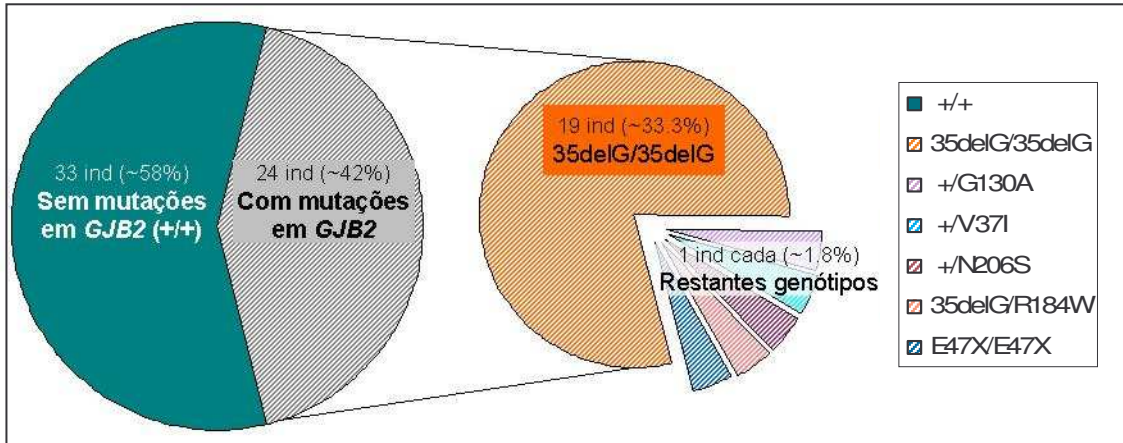


Figura 8. Genótipos encontrados nos indivíduos com implante e respectivas percentagens. Restantes genótipos: +/G130A, +/V37I, +/N206S, E47X/E47X e 35delG/R184W; ind: indivíduo(s)

Foram encontradas mutações em 24 (~42%) dos 57 indivíduos testados. A causa da surdez associada a *GJB2* foi identificada em 21 indivíduos (~37%), sendo 19 (33,3%) homocigóticos para 35delG, um (1,8%) homocigótico para E47X e um (1,8%) heterocigótico composto para 35delG/R184W. Observaram-se 3 indivíduos heterocigóticos para cada um dos genótipos +/G130A, +/N206S, +/V37I.

Na Figura 9 estão representados os electroforetogramas dos casos positivos para *GJB2* identificados nesta amostra.

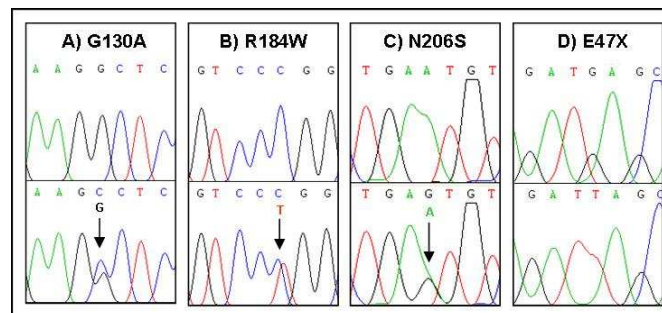


Figura 9. Electroforetogramas das variantes de *GJB2* (A a D) identificadas nos indivíduos com implante¹.

Em relação ao polimorfismo nt+765, 18 (~32%) indivíduos tinham o genótipo C/C, 19 (~34%) o genótipo C/T e 19 (~34%) o genótipo T/T, não tendo sido possível verificar qual o genótipo apresentado para um indivíduo da amostra.

¹ As restantes variantes encontram-se ilustradas na figura 5: V37I (painel E) e na figura 7: 35delG (painel B)

4. RESULTADOS

4.3.2.2 Deleções envolvendo o gene *GJB6*

Todos os indivíduos implantados sem mutações encontradas no gene *GJB2* ou que fossem heterozigóticos foram testados para a presença das deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854). No entanto, nenhum dos indivíduos testados apresentava qualquer destas deleções, como se pode observar na Figura 10.



Figura 10. Fotografia do gel com os produtos do PCR *multiplex*.

Poço 1: Marcador de pesos moleculares 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen); poços 2 a 12 e 15 a 24: indivíduos em estudo; poço 13: controlo heterozigótico para del(*GJB6*-D13S1854); poço 14: controlo heterozigótico para del(*GJB6*-D13S1830); poço 25: vazio; poço 26: controlo negativo da reacção de PCR (sem DNA). Os indivíduos 4 a 8 foram testados de novo por não terem bandas visíveis nesta reacção.

4.3.3 Avaliação do sucesso da (re)habilitação oral

4.3.3.1 Resultados nos testes

Uma vez que o número de indivíduos em algumas das classes de genótipos era muito baixo (apenas 1), os resultados referentes à (re)habilitação oral apresentam-se em dois grupos de indivíduos: “sem mutações em *GJB2*” composto pelos indivíduos com genótipo selvagem (+/+) e “com mutações em *GJB2*” que inclui os indivíduos com os genótipos monoalélicos +/G130A, +/N206S e +/V37I e os genótipos bialélicos 35delG/35delG, E47X/E47X e 35delG/R184W.

Os resultados referentes à bateria de testes aplicada no serviço de ORL do CHC encontram-se apresentados por médias na Figura 11, distribuídos pelos dois grupos (“sem” e “com” mutações em *GJB2*) e pelo total da amostra.

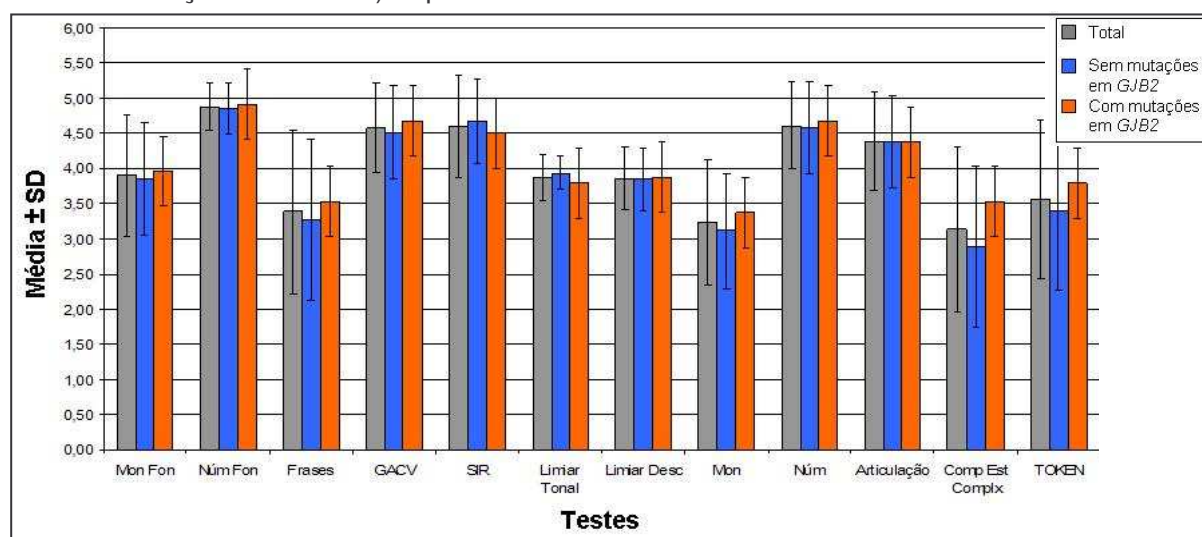


Figura 11. Média dos resultados da bateria de testes realizada no serviço de ORL do CHC nos grupos “com”, “sem mutações em *GJB2*”, e no total da amostra. SD, desvio padrão; Mon Fon, Monossílabos Fonemas; Núm Fon, Números Fonemas; GACV, Grelha de Avaliação das Características Vocais; SIR, Rácio de Inteligibilidade do Discurso; Limiar Desc, Limiar de Discriminação; Mon, Monossílabos; Núm, Números; Comp Est Complex, Compreensão de Estruturas Complexas.

4. RESULTADOS

4.3.3.2 Avaliação global

A aplicação da fórmula para estimação da avaliação oral global permite obter resultados numéricos compreendidos de 0 a 5 (avaliação quantitativa) a que correspondem 5 categorias (avaliação qualitativa). Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 8, indicando-se também os genótipos de cada indivíduo dado que um dos objectivos deste estudo era relacioná-los, apresentando-se primeiro o grupo “sem mutações em *GJB2*” e de seguida o grupo “com mutações em *GJB2*”.

Tabela 8. Genótipos de todos os indivíduos implantados incluídos na amostra e respectiva avaliação oral global.

código ICC	Genótipo <i>GJB2</i>	Avaliação	
		Quantitativa	Qualitativa
ICC01	+/+	3.6	bom
ICC02	+/+	3.5	bom
ICC04	+/+	3.9	bom
ICC07	+/+	4.2	bom
ICC08	+/+	4.1	bom
ICC10	+/+	4.3	bom
ICC12	+/+	4.1	bom
ICC15	+/+	3.8	bom
ICC17	+/+	4.3	bom
ICC19	+/+	4.2	bom
ICC20	+/+	4.3	bom
ICC24	+/+	4.1	bom
ICC25	+/+	4	bom
ICC26	+/+	4.2	bom
ICC27	+/+	3.8	bom
ICC28	+/+	4.4	bom
ICC30	+/+	4.3	bom
ICC31	+/+	4.3	bom
ICC38	+/+	4	bom
ICC39	+/+	4.4	bom
ICC41	+/+	4.4	bom
ICC44	+/+	4.3	bom
ICC48	+/+	4	bom
ICC50	+/+	4.4	bom
ICC53	+/+	4.4	bom
ICC54	+/+	4.1	bom
ICC55	+/+	3.9	bom
ICC59	+/+	4	bom
ICC61	+/+	3.9	bom

código ICC	Genótipo <i>GJB2</i>	Avaliação	
		Quantitativa	Qualitativa
ICC62	+/+	3.8	bom
ICC64	+/+	3.6	bom
ICC65	+/+	3.2	suficiente
ICC69	+/+	4.1	bom
ICC21	+/V37I	4	bom
ICC29	+/G130A	4.5	muito bom
ICC67	+/N206S	4.3	bom
ICC13	E47X/E47X	4.3	bom
ICC05	35delG/R184W	4.2	bom
ICC06	35delG/35delG	4.4	bom
ICC11	35delG/35delG	3.3	suficiente
ICC14	35delG/35delG	4.3	bom
ICC18	35delG/35delG	4.4	bom
ICC22	35delG/35delG	4	bom
ICC23	35delG/35delG	4.4	bom
ICC36	35delG/35delG	4.4	bom
ICC43	35delG/35delG	4.1	bom
ICC45	35delG/35delG	4.4	bom
ICC47	35delG/35delG	4.5	muito bom
ICC51	35delG/35delG	3.8	bom
ICC57	35delG/35delG	3.9	bom
ICC58	35delG/35delG	3.8	bom
ICC60	35delG/35delG	4	bom
ICC63	35delG/35delG	3	suficiente
ICC66	35delG/35delG	3.4	suficiente
ICC68	35delG/35delG	4.1	bom
ICC70	35delG/35delG	4	bom
ICC71	35delG/35delG	4.4	bom

Nenhum indivíduo de nenhum dos grupos recebeu classificação mau ou insuficiente, 4 indivíduos (7%) foram classificados com suficiente, 51 (89.5%) com bom e apenas 2 (3.5%) com muito bom. Em relação aos genótipos, um indivíduo com o genótipo +/G130A e outro homocigótico para 35delG foram classificados com muito bom. Nos homocigóticos para

4. RESULTADOS

35delG 3 indivíduos (16%) obtiveram classificação suficiente e 15 indivíduos (79%) obtiveram classificação bom. Os indivíduos com os genótipos +/N206S, +/V37I, 35delG/R184W e E47X/E47X tiveram todos classificação bom. De entre os indivíduos sem qualquer alteração em *GJB2* apenas 1 (3%) teve avaliação suficiente e os restantes 32 (97%) tiveram avaliação bom.

Na Figura 13 está representada a distribuição dos resultados quantitativos, consoante a categoria de avaliação qualitativa a que pertencem.

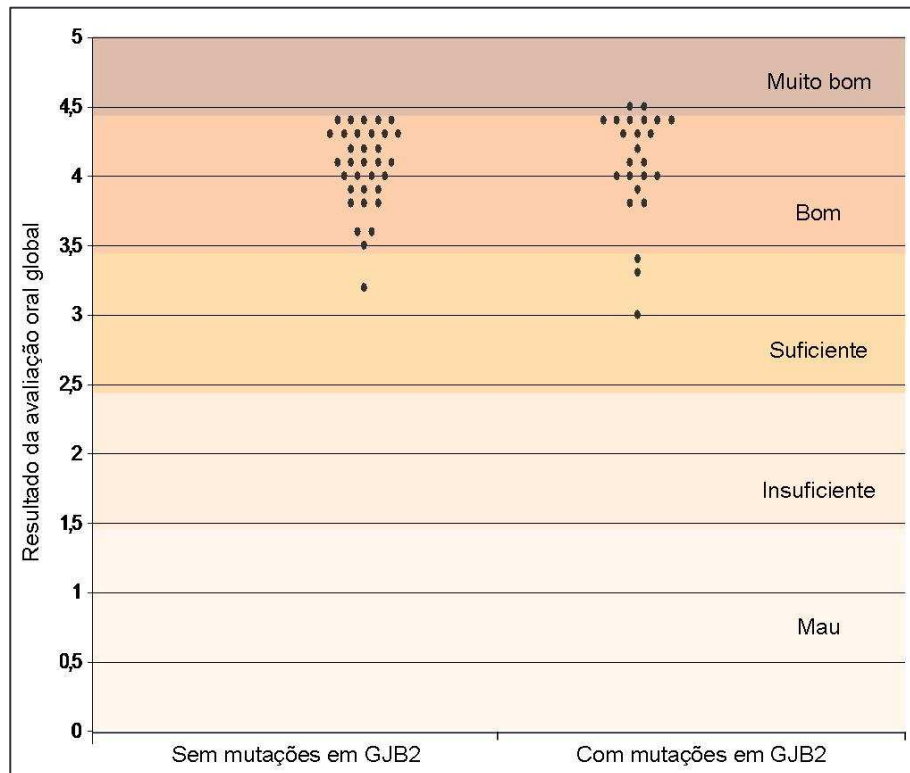


Figura 12. Representação gráfica dos resultados individuais de avaliação quantitativa distribuídos por categorias qualitativas.

4.3.4 Análise estatística

Para determinar se havia diferenças estatisticamente significativas nos valores da avaliação oral global entre os 2 grupos da amostra, “com” e “sem mutações em *GJB2*”, foi realizada uma análise de variância não paramétrica usando o teste Kruskal-Wallis. Este teste permite determinar se os valores de uma determinada variável diferem ou não entre grupos, quando a variável dependente não tem uma distribuição normal. O teste Kruskal-Wallis testa a hipótese nula que as amostras independentes (grupos de genótipos) provêm de uma mesma população. Os resultados desta análise encontram-se na Tabela 9.

4. RESULTADOS

Tabela 9. Resultados do teste de Kruskal-Wallis para a avaliação global vs genótipo.

Estatística de teste^{a,b}

	Avaliação quantitativa
K	.691
Graus de liberdade	1
Valor- <i>p</i>	.406

^a Teste Kruskal Wallis; ^b Variável de agrupamento: Mutações em *GJB2*

De um modo semelhante realizou-se a análise estatística aplicando o teste Kruskal-Wallis aos resultados da bateria de 12 testes aplicada a cada indivíduo no serviço de ORL do CHC (Tabela 10) relativamente aos 2 grupos de genótipos em *GJB2* (“com” e “sem”).

Tabela 10. Resultados do teste de Kruskal-Wallis para cada um dos testes realizados vs genótipo.

Estatística de Teste^{a,b}

	Mon Fon	Núm Fon	Frases	GACV	SIR	Lim Tonal	Lim Desc	Mon	Núm	Articulação	Comp Est Complx	TOKEN
K	.604	.589	.854	.900	.160	2.765	.181	1.660	.182	.008	3.520	.949
Graus de Liberdade	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Valor- <i>p</i>	.437	.443	.355	.343	.689	.096	.671	.198	.670	.929	.061	.330

^a Teste Kruskal Wallis; ^b Variável de agrupamento: Mutações em *GJB2*; Mon Fon, Monossílabos Fonemas; Núm Fon, Números Fonemas; GACV, Grelha de Avaliação das Características Vocais; SIR, Rácio de Inteligibilidade do Discurso; Lim Tonal; Limiar Tonal; Lim Desc, Limiar de Descrição; Mon, Monossílabos; Núm, Números; Comp Est Complx, Compreensão de Estruturas Complexas.

Conforme referido anteriormente, o sucesso da habilitação oral em indivíduos com implante coclear depende de vários factores que não apenas a etiologia da surdez. Neste sentido, comparámos os resultados da avaliação oral global (avaliação quantitativa) com a idade de implantação, o tempo de uso de implante e o modelo do implante usado. Os resultados da aplicação do teste de Kruskal-Wallis e da correlação de Spearman apresentam-se nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

Tabela 11. Resultados do teste de Kruskal-Wallis para a avaliação global vs modelo de implante.

Estatística de Teste^{a,b}

	Avaliação quantitativa
K	3.912
Graus de Liberdade	5
Valor- <i>p</i>	.562

^a Teste Kruskal Wallis; ^b Variável de agrupamento: Mutações em *GJB2*

4. RESULTADOS

Tabela 12. Resultados da correlação de Spearman para tempo de uso de implante, idade de implantação e avaliação global.

			Correlações		
			Tempo de uso de implante	Idade de implantação	Avaliação quantitativa
rho de Spearman	tempo de uso do CI	Coeficiente de correlação	1.000	.502**	-.153
		Valor- <i>p</i>	.	.000	.255
		N	57	57	57
	idade de implantação	Coeficiente de correlação	.502**	1.000	-.032
		Valor- <i>p</i>	.000	.	.814
		N	57	57	57
	avaliação quantitativa	Coeficiente de correlação	-.153	-.032	1.000
		Valor- <i>p</i>	.255	.814	.
		N	57	57	57

** Correlação significativa com $\alpha=0.01$

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

5.1 Amostras aleatórias de Leiria e do Alentejo

Os resultados obtidos indicam que 17% dos indivíduos da amostra oriunda de Leiria apresentam diversas variantes em *GJB2* (Tabela 4), já descritas na bibliografia. No entanto, apenas cerca de 11% dos indivíduos eram portadores de variantes associadas a fenótipos de surdez, ainda que as variantes M34T e R127H não tenham a sua patogenicidade clarificada. De facto, existem dados que apontam para que, em certos casos, estas mutações possam estar associadas à etiologia genética da surdez, enquanto noutros o mesmo não se verifica (Matos *et al.* 2008). Nesta amostra identificámos 6.4% de indivíduos portadores de mutações patogénicas e, portanto, associadas a formas de surdez autossómica recessiva.

Relativamente ao Alentejo, 6.4% dos indivíduos eram portadores de variantes em *GJB2*, também anteriormente descritas. No entanto apenas 2.1% dos indivíduos apresentavam uma variante patogénica, a mutação W24X, associada a formas de surdez autossómica recessiva.

Nenhum dos indivíduos destas duas amostras apresentava surdez associada a *GJB2*, dado não se ter identificado nenhum caso bialélico.

O polimorfismo C/T no nucleótido -34 tem sido descrito (Tang *et al.* 2006) ocorrendo em *cis* com os polimorfismos A/T no nucleótido 785 e C/T no nucleótido 792, o que se verifica nos 2 indivíduos observados neste estudo. Também as variantes nt+785 A/T e nt+792 C/T foram encontradas em conjunto noutro indivíduo. Apesar de serem polimorfismos, todas as variantes observadas são actualmente sempre registadas, visto não ser de excluir uma possível associação com genótipos patogénicos. Esta é a situação observada no nt+765 onde o alelo T é habitualmente segregado com a 35delG (Roux *et al.* 2004), ainda que também apareça em indivíduos sem mutações no exão codificante de *GJB2*, como verificado em 4 indivíduos no presente estudo.

De salientar que em Leiria o número de portadores com alterações em *GJB2*, apesar de superior, não é significativamente diferente ($p=0.11$; teste χ^2) do observado no Alentejo.

Igualmente relevante é o facto de nenhum portador da mutação 35delG ter sido encontrado nestas duas regiões, já que esta mutação é descrita como a mais comum no gene *GJB2* em populações no Sul da Europa, com valores de frequência de portadores de cerca de 2.9% (Gasparini *et al.* 2000). No entanto, já foram encontrados valores de prevalência desta mutação em Portugal de 0.25% (Rodrigues 2007), bastante mais baixos que os registados noutras populações da Europa, o que pode explicar os resultados aqui obtidos.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

5.2 Famílias com surdez

Foram analisados 23 indivíduos com NSRD provenientes de 22 famílias portuguesas, tendo sido encontradas alterações em *GJB2* em 9 indivíduos (~39%, Tabela 6), todas já descritas na literatura. Apenas em 4 (17%) indivíduos a etiologia da surdez ficou esclarecida porque estava associada aos genótipos 35delG/35delG (n=3) e 35delG/W24X (n=1).

Um caso controverso identificado, consiste no probando de uma família que apresentava o genótipo M34T/V95M, o qual não pode ser indiscutivelmente associado ao fenótipo de surdez, dado que apesar de a variante V95M estar descrita como mutação patogénica recessiva, a variante M34T, como já referido anteriormente, tem um papel ainda controverso na etiologia da surdez. Numa família analisada por Kelley *et al.* (1998) os 2 filhos surdos tinham o genótipo M34T/V95M e os seus pais ouvintes eram heterozigóticos para cada 1 das variantes, sugerindo que a variante M34T se comportava como uma mutação recessiva. No entanto, existem autores que excluem a possibilidade da variante M34T ser responsável pela surdez (Roux *et al.* 2004) em face da heterogeneidade de fenótipos observada. Deste modo, torna-se difícil associar o genótipo encontrado neste probando ao fenótipo de surdez que apresenta.

A mutação mais frequente identificada nestas famílias foi a 35delG, como expectável dada a sua elevada frequência nos casos de surdez associada a *GJB2* (Roux *et al.* 2004, Snoeckx *et al.* 2005), correspondendo a 87% dos alelos mutados.

As variantes M34T e W24X foram identificadas simultaneamente nas famílias analisadas e na amostra aleatória das regiões de Leiria e Alentejo. A mutação W24X, frequente na Índia (Maheshwari *et al.* 2003) e em populações ciganas (Bouwer *et al.* 2007) tem sido comumente observada na população portuguesa (Rodrigues 2007), apontando para influência de outras populações no nosso *pool* genético.

5.3 Indivíduos implantados

Uma grande proporção (42%) dos indivíduos com implante coclear considerados apresentava alterações em *GJB2*. Estes números estão de acordo com estudos prévios (Connell *et al.* 2007, Propst *et al.* 2006, Green *et al.* 2002) que encontraram mutações em *GJB2* em 37% a 40% das crianças com implante coclear testadas.

Registou-se uma elevada percentagem de indivíduos com mutações bialélicas, nos quais a etiologia da surdez ficou assim determinada. Efectivamente, dos 57 indivíduos estudados, 21 (37%) apresentavam mutações bialélicas que eram a causa da surdez e apenas 3 (5%) possuíam mutações monoalélicas que, por serem mutações recessivas, não explicavam a surdez. Por sua vez, a elevada frequência de alelos mutados em *GJB2* nesta amostra (39% - 45/114), em comparação com a encontrada nas famílias portuguesas com surdez

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

analisadas neste estudo (30% - 14/46) evidencia a relevância da surdez associada a *GJB2* na população surda portuguesa.

Como seria de esperar, a mutação 35delG foi a encontrada em maior frequência totalizando 87% dos alelos mutados. Curiosamente, este valor é o mesmo que foi observado nas famílias com surdez analisadas neste estudo (87%), salientando uma vez mais o contributo da mutação 35delG para os casos de surdez em Portugal.

Nenhum dos indivíduos sem mutações em *GJB2* ou heterozigóticos para *GJB2* apresentava as deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) em *GJB6*, o que está de acordo com os dados anteriormente obtidos na população portuguesa (Teixeira *et al.* 2006). A baixa prevalência destas deleções em Portugal contrasta com as observadas em Espanha (del Castillo *et al.* 2005).

Apesar dos indivíduos do grupo sem mutações em *GJB2* não terem ainda a etiologia da surdez esclarecida, é muito provável que a maioria destes casos tenha uma origem genética, uma vez que a surdez genética é extremamente heterogénea no que respeita à sua causa, para além de que os resultados negativos aqui obtidos não excluem a existência de mutações noutras regiões de *GJB2* (promotor, 3'UTR, exão 1, intrão, etc...).

Um dos objectivos do presente trabalho era estudar a associação entre os genótipos identificados e o sucesso da (re)habilitação oral. Assim, todos os resultados foram trabalhados subdividindo esta amostra em 2 grupos, “com” e “sem” mutações em *GJB2*. Os resultados da avaliação oral global dos indivíduos implantados, estimada com base numa fórmula que considerava 7 dos testes realizados, não apresentam diferenças significativas ($p > 0.05$, Tabela 8) entre os 2 grupos considerados, ainda que apenas no grupo “com mutações em *GJB2*” existam indivíduos com classificação muito bom (Tabela 7). Estes dados mostram claramente que os indivíduos da população portuguesa com surdez associada a *GJB2* são também bem sucedidos na (re)habilitação oral derivada do uso do CI. Apesar de semelhantes, os resultados de ambos os grupos foram bastante bons no referente à (re)habilitação oral, não havendo ninguém com classificação inferior a suficiente, o que indica que o implante coclear é uma técnica que permite o sucesso em termos de reabilitação oral, como observado em todos os casos estudados.

Dado que a avaliação global do sucesso oral considera apenas 7 testes, procurou-se verificar se existiam diferenças nos resultados dos 12 testes individuais entre os 2 grupos, “com” e “sem” mutações em *GJB2*. Em nenhum dos testes se observou diferenças significativas em relação ao genótipo (Tabela 9), ainda que os valores de p (teste de Kruskal-Wallis) para os testes Limiar Tonal em Campo Livre e Compreensão de Estruturas Complexas se aproximem de um valor significativo ($p = 0.096$ e $p = 0.061$, respectivamente). Este resultados sugerem que a fórmula definida é um bom indicador do sucesso da performance oral, não parecendo desprezar informação.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Estes resultados são suportados por outros estudos que indicam não haver diferenças significativas em termos de percepção da fala e desenvolvimento da linguagem entre os indivíduos com e sem mutações em *GJB2* (Connell *et al.* 2007, Taitelbaum-Swead *et al.* 2006, Green *et al.* 2002). No entanto, também existem alguns estudos que apontam para uma performance melhor no grupo com mutações em *GJB2* (Kwasaki *et al.* 2006, Fukushima *et al.* 2002). Nestes estudos o grupo com mutações em *GJB2* demonstrava um melhor desenvolvimento linguístico mas, para além de ambas as amostras serem muito pequenas, cerca de metade dos indivíduos sem mutações em *GJB2* possuía problemas de aprendizagem (Kwasaki *et al.* 2006) ou nasceu com um peso demasiado baixo (Fukushima *et al.* 2002). De salientar que no presente estudo os critérios de exclusão foram bem definidos e articulados com os clínicos no sentido de excluir todos os possíveis casos síndromicos ou de surdez explicada por factores externos, como infecções ou problemas durante a gravidez e o parto, de modo a obter uma amostra de indivíduos muito homogénea que difere apenas na causa da surdez.

Sabe-se também que certas variáveis como a idade de implantação (Manrique *et al.* 2004), tempo de uso do implante (Connell *et al.* 2007) e modelo do próprio implante (Moret *et al.* 2007) influenciam o desempenho oral. Neste estudo não encontramos diferenças significativas (Tabelas 10 e 11) entre estes aspectos e o sucesso global da (re)habilitação oral. No caso do modelo do implante estes resultados podem ser explicados pelo facto de a maioria de indivíduos usar o modelo CI24M ou o CI24R CS Contour. Também a idade de implantação ocorreu para todos os indivíduos entre os 2 e os 5 anos, sendo que 67% foram implantado com 3 anos, o que poderá explicar o não contributo deste factor para o sucesso oral dos indivíduos desta amostra. Relativamente ao tempo de uso de implante, as semelhanças encontradas entre os 2 grupos eram esperadas pois o tempo de uso de CI (pelo menos 5 anos) foi um dos factores de inclusão no presente estudo por forma a garantir a aplicabilidade de testes de performance oral mais precisos e simultaneamente esbater o efeito deste factor na (re)habilitação oral de cada indivíduo.

5.4 Considerações finais

Mutações no exão codificante do gene *GJB2* contribuem para numerosos casos de NSRD na amostra da população portuguesa com implante coclear (37%) e nas famílias estudadas (14%), sendo a mutação 35delG a mais frequentemente associada às causas de surdez. No entanto, esta mutação está ausente nas amostras aleatórias oriundas das regiões de Leiria e do Alentejo, ainda que nestas amostras se registem vários casos de portadores de outras variantes em *GJB2* (17% e 6.4%, respectivamente).

O implante coclear é uma técnica de (re)habilitação oral actualmente bem aceite em crianças com surdez neurosensorial não-sindrómica autossómica recessiva pré-lingual pois, como se verifica nos 57 indivíduos da amostra considerada, há sucesso na performance oral, independentemente da causa da surdez estar ou não relacionada com mutações em *GJB2*.

Os bons resultados em termos de performance oral (n=2 para “Muito Bom”, n=19 para “Bom”) registada nos indivíduos com implante coclear em que a surdez está associada a *GJB2* (37%) indicam que estes indivíduos são bons candidatos a implante coclear. Não sendo melhores do que os indivíduos sem mutações em *GJB2*, são igualmente bons na performance oral. Dado que muitos dos casos de surdez ocorrem como casos esporádicos, em que a família não tem experiência em lidar com esta situação incapacitante, esta informação não é irrelevante na perspectiva clínica de aconselhamento de indivíduos surdos com mutações em *GJB2* candidatos a implante coclear.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

- Bouwer S, Angelicheva D, Chandler D, Seeman P, Tournev I, Kalaydjieva L. Carrier Rates of the Ancestral Indian W24X Mutation in *GJB2* in the General Gypsy Population and Individual Subisolates. *Genetic Testing* 2007; 11(4):455-458
- Christiani TV, Alexandrino F, de Oliveira CA, Amantini RCB, Bevilacqua MC, Filho OAC, Porto P, Sartorato EL. Molecular study in Brazilian cochlear implant recipients. *American Journal of Medical Genetics A* 2007; 143(14):1580-1582
- Clark GM, Shepherd RK, Treaba CG, Cohen LT, Pyman BC, Huigen J, Xu J. Peri-modiolar electrode arrays: A comparison of electrode position in the human temporal bone. In: Cochlear Implants. XVI World Congress of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Monduzzi Editore, Bologna, Italy, pp 205-209, 1997.
- Connell SS, Angeli SI, Suarez H, Hodges AV, Balkany TJ, Liu XZ. Performance after cochlear implantation in DFNB1 patients. *Otolaryngology Head and Neck Surgery* 2007; 137(4):596-602
- del Castillo FJ *et al.* 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. *Journal of Medical Genetics* 2005; 42:588-594
- Fukushima K, Sugata K, Kasai N, Fukuda S, Nagayasu R, Toida N, Kimura N, Takishita T, Gunduz M, Nishizaki K. Better speech performance in cochlear implant patients with *GJB2*-related deafness. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2002; 62(2):151-157
- Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brondum-Nielsen *et al.* Genetic Analysis Consortium of *GJB2* 35delG: High carrier frequency of the 35 delG deafness mutation in European populations. *Eur. J. Hum. Genet.* 2000; 8:19–23
- Green GE, Scott DA, McDonald JM, Teagle HFB, Tomblin BJ, Spencer LJ, Woodworth GG, Knutson JF, Gantz BJ, Sheffield VC, Smith RJH. Performance of Cochlear Implant Recipients with *GJB2*-related Deafness. *American Journal of Medical Genetics* 2002; 109:167-170
- Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S. A nonsyndromic form of neurosensory recessive deafness maps to pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genetics* 1994; 6(1)24-8
- Harris AL, Bevans CG. Exploring hemichannel permeability in vitro. *Methods of Molecular Biology* 2001; 154:357–377
- Hişmi BÖ, Yılmaz ST, Incesulu A, Tekin M. Effects of *GJB2* genotypes on the audiological phenotype: Variability is present for all genotypes. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2006; 70:1687-1694
- Inquérito Nacional às Incapacidades, Deficiências e Desvantagens. Lisboa: SNR, 1996. ISBN972-9301-26-3
- Kalatzis V, Nance W. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Human Molecular Genetics* 1998; 7:1589-1597.
- Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ. Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *American Journal of Human Genetics* 1998; 62:792–799
- Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, *et al.* Connexin 26 mutations in hereditary nonsyndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387:80-83
- Kwasaki A, Fukushima K, Kataoka Y, Fukuda S, Nishizaki K. Using assessment of higher brain functions of children with *GJB2*-associated deafness and cochlear implants as a procedure to evaluate language development. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2006; 70:1343-1349
- Lustig LR, Lin D, Venick H, Larky J, Yeagle J, Chinnici J, Polite C, Mhatre AN, Niparko JK, Lalwani AK. *GJB2* Gene Mutations in Cochlear Implant Recipients – Prevalence and Impact on Outcome. *Archive Otolaryngology Head and Neck Surgery* 2004; 130:541-546
- Maheshwari M, Vijaya R, Ghosh M, Shastri S, Kabra M, Menon PSN. Screening of Families With Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Impairment (ARNSHI) for Mutations in *GJB2* Gene: Indian Scenario. *American Journal of Medical Genetics* 2003; 120A:180–184

6. BIBLIOGRAFIA

- Manrique M, Cervera-Paz FJ, Huarte A, Molina M. Advantages of Cochlear Implantation in Prelingual Deaf Children before 2 Years of Age when Compared with Later Implantation. *Laryngoscope* 2004; 114(8):1462-1469
- Matos TD, O'Neill A, Rosa H, Caria H, Fialho G. The controversial R127H mutation in *GJB2*: Report on three portuguese hearing loss family cases. *Proceedings 45th Inner Ear Biology Workshop* Ferrara, Italy 2008
- Moret ALM, Bevilacqua MC, Costa OA. Implante coclear: audição e linguagem em crianças deficientes auditivas pré-linguais. *Pró-Fono Revista de Atualização Científica* 2007; 19(3):295-304
- Morton C, Nance W. New-born Hearing Screening – A Silent Revolution. *New England Journal of Medicine* 2006; 354(20):2151-2164
- Nance W. The genetics of deafness. *Mental Retardation and Development Desability Research Reviews* 2003; 9:109-119
- Propst EJ, Stockley TL, Gordon KA, Harrison RV, Papsin BC. Ethnicity and mutations in *GJB2* (connexin 26) and *GJB6* (connexin 30) in a multi-cultural Canadian paediatric Cochlear Implant Program. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2006; 70:435-444
- Rodrigues AR. Epidemiologia molecular da Surdez Hereditária: Prevalência das variantes patogénicas do gene *GJB2* identificadas em famílias portuguesas. Tese de mestrado defendida na FCUL 2007
- Roux AF, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Faugère V, Templin C, Leprevost D, Artières F, Lina G, Molinari N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M. Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. *BMC Medical Genetics* 2004; 5(5):
- Schrijver I. Hereditary Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss -Transforming Silence to Sound. *Journal of Molecular Diagnostics* 2004; 6:275-284
- Snoeckx RL *et al.* *GJB2* mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *American Journal of Human Genetics* 2005; 77(6):945-57
- Taitelbaum-Swead R, Brownstein Z, Muchnik C, Kishon-Rabin L, Kronenberg J, Megirov L, Frydman M, Hildesheimer M, Avraham KB. Connexin-associated deafness and speech perception outcome of cochlear implantation. *Archive Otolaryngology Head and Neck Surgery* 2006; 132(5):495-500.
- Tang H, Fang P, Ward P, Schmitt E, Darilek S, Manolidis S, Oghalai J, Roa B, Alford R. DNA sequence analysis of *GJB2*, encoding connexin 26: observations from a population of hearing impaired cases and variable carrier rates, complex genotypes, and ethnic stratification or alleles among controls. *American Journal of Medical Genetics* 2006; 140(22):2401-15
- Teixeira H, Fialho G, Caria H. Contribution of *GJB6* to DFNB1 related hearing loss in Portuguese families. *Proceedings 43rd Inner Ear Biology Workshop* Montpellier, France, 2006.
- Trincão C, Rodrigues A, Teixeira H, Matos T, Caria H, Fialho G. Contribution of *GJB2* to Hearing Loss in the Portuguese population. *Proceedings 43rd Inner Ear Biology Workshop* Montpellier, France, 2006.

Referências electrónicas:

- The Connexin Deafness Homepage. URL: <http://davinci.crg.es/deafness/index.php> acedido em Agosto de 2008
- Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. URL: <http://webho1.ua.ac.be/hhh/> acedido em Agosto de 2008
- http://www.geocities.com/cicentral/how_ci_works.html How a Cochlear Implant Works acedido em Agosto de 2008
- www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. acedido em diferentes datas entre Setembro de 2007 e Setembro de 2008

7. ANEXOS

7. ANEXOS

A) Média dos valores (\pm SD) obtidos nos 12 testes realizados a cada um dos 57 indivíduos com CI.

Tabela 13. Resultados dos 12 testes efectuados e da avaliação global.

Teste	Total		Sem mutações em <i>GJB2</i>		Com mutações em <i>GJB2</i>	
	n	Média \pm SD	n	Média \pm SD	n	Média \pm SD
Monossílabos Fonemas	57	3,9 \pm 0,86	57	3,85 \pm 0,8	57	3,96 \pm 0,95
Números Fonemas	57	4,88 \pm 0,33	57	4,85 \pm 0,36	57	4,92 \pm 0,28
Frases	57	3,39 \pm 1,16	57	3,27 \pm 1,15	57	3,54 \pm 1,18
GACV	57	4,58 \pm 0,63	57	4,52 \pm 0,67	57	4,67 \pm 0,56
SIR	57	4,6 \pm 0,73	57	4,67 \pm 0,6	57	4,5 \pm 0,88
Limiar Tonal	57	3,88 \pm 0,33	57	3,94 \pm 0,24	57	3,79 \pm 0,41
Limiar de Discriminação	57	3,86 \pm 0,44	57	3,85 \pm 0,44	57	3,88 \pm 0,45
Avaliação Global	57	4,07 \pm 0,34	57	4,06 \pm 0,29	57	4,08 \pm 0,39
Monossílabos	57	3,23 \pm 0,89	57	3,12 \pm 0,82	57	3,38 \pm 0,97
Números	57	4,61 \pm 0,62	33	4,58 \pm 0,66	24	4,67 \pm 0,56
Articulação	57	4,39 \pm 0,7	33	4,39 \pm 0,66	24	4,38 \pm 0,77
Comp Estt Complx	44	3,14 \pm 1,17	27	2,89 \pm 1,15	17	3,53 \pm 1,12
TOKEN	36	3,56 \pm 1,13	22	3,41 \pm 1,14	14	3,79 \pm 1,12

SD, desvio padrão; GACV, Grelha de Avaliação das Características Vocais; SIR, Rácio de Inteligibilidade do Discurso, Comp Estt Complx, Compreensão de Estruturas Complexas.

7. ANEXOS

B) Representação gráfica das frequências relativas dos resultados obtidos nos 7 testes (A a G) considerados na avaliação global, também representada (H)

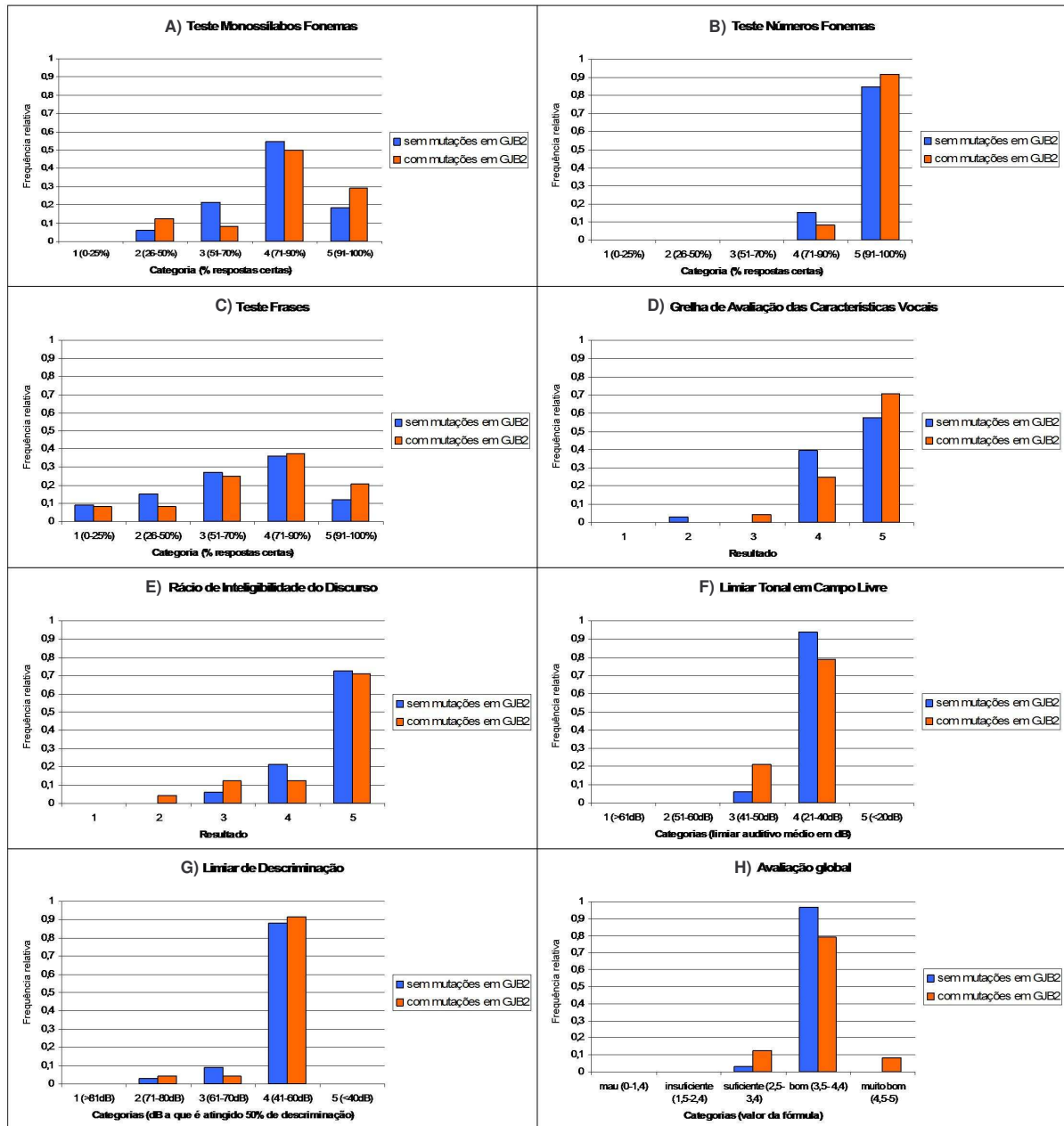


Figura 13. Resultados dos testes utilizados para o estabelecimento da avaliação global e resultados desta, comparando indivíduos com e sem mutações em *GJB2*.