



CONTRIBUTO PARA O ESTUDO DA ETIOLOGIA GENÉTICA DA PRESBIACÚSIA EM PORTUGAL

Linda Hamrol Pereira

Mestrado em Biologia Molecular Humana

2009



FACULDADE · DE · CIÊNCIAS UNIVERSIDADE · DE · LISBOA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

CONTRIBUTO PARA O ESTUDO DA ETIOLOGIA GENÉTICA DA PRESBIACÚSIA EM PORTUGAL

Linda Hamrol Pereira

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, Prof. Coordenadora na Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Setúbal, e do Prof. Doutor Pedro Silva, Prof. Auxiliar da FCUL.

Mestrado em Biologia Molecular Humana

2009

Índice geral

Índice geral	III
Índice de tabelas	IV
Índice de figuras	V
Lista de Siglas, Abreviaturas e Unidades	VI
Agradecimentos	VII
Resumo	VIII
Abstract.....	IX
1. Introdução.....	1
1.1 Presbiacúsia	2
1.2 Mecanismo da audição e estrutura da cóclea	3
1.3 Etiologia da presbiacúsia	5
1.3.1 Factores genéticos	6
1.3.1.1 Genes candidatos.....	7
1.3.1.2 O papel do <i>NAT2</i>	7
1.3.1.3 mtDNA	8
1.4 Objectivos	10
2. Metodologia	11
2.1 Colheita das amostras	12
2.2 Extracção de DNA	13
2.3 Reacção de amplificação por PCR.....	13
2.4 Análise de Sequências	16
2.5 Análise de dados	17
3. Resultados	18
3.1 Caracterização da população em estudo	19
3.2 Frequências para o gene <i>NAT2</i>	20
3.3 Frequências de haplogrupos do mtDNA.....	22
3.4 Frequências da deleção 4977pb	23
3.5 Comparação dos grupos dos melhores e dos piores ouvintes	23
3.6 Testes de independência.....	25
4. Discussão	27
5. Referências bibliográficas.....	32
6. Anexos	35

Índice de tabelas

Tabela 1 – Medianas dos valores de perda auditiva (dB) para cada frequência (Hz) por classes de gênero e idades.....	19
Tabela 2 – Frequências de cada haplótipo do gene <i>NAT2</i> , polimorfismos que os definem e efeito que têm no fenótipo da enzima NAT2.	20
Tabela 3 – Frequências para os genótipos do gene <i>NAT2</i>	21
Tabela 4 – Frequências dos fenótipos de NAT2.....	22
Tabela 5 – Frequências dos haplogrupos do mtDNA.	22
Tabela 6 – Resultados do teste de independência do χ^2 para os genótipos de <i>NAT2</i> e os dois grupos da amostra, melhores e piores ouvintes.....	38
Tabela 7 - Resultados do teste de independência do χ^2 para os haplótipos de <i>NAT2</i> e os dois grupos da amostra, melhores e piores ouvintes.....	38
Tabela 8 - Resultados do teste de independência do χ^2 para o fenótipo NAT2 lento e os dois grupos da amostra, melhores e piores ouvintes.	38
Tabela 9 - Resultados do teste de independência do χ^2 para o haplogrupo H do mtDNA e os dois grupos da amostra, melhores e piores ouvintes.....	38
Tabela 10 - Resultado da análise de regressão logística para os genótipos de <i>NAT2</i>	39
Tabela 11 - Resultado da análise de regressão logística para os haplótipos de <i>NAT2</i>	39
Tabela 12 - Resultado da análise de regressão logística para o fenótipo NAT2 lento.	39
Tabela 13 - Resultado da análise de regressão logística para o haplogrupo H do mtDNA...	39

Índice de figuras

Figura 1 – Esquema da estrutura do ouvido (a) e um corte da cóclea evidenciando a localização do órgão de Corti (b).	4
Figura 2 - Valores normais de audição de acordo com a ISO 7029 para homens (a) e para mulheres (b).	5
Figura 3 – Haplogrupos do mtDNA e respectiva distribuição geográfica [22].	9
Figura 4 – Sequência do fragmento amplificado do gene NAT2 e local de emparelhamento dos <i>primers forward</i> (azul) e <i>reverse</i> (laranja).	14
Figura 5 – Sequência do fragmento amplificado para a região HVS1 e local de emparelhamento dos <i>primers forward</i> (azul) e <i>reverse</i> (laranja).	14
Figura 6 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados para amplificação da região 4977pb, com e sem mutação. Na figura apresentam-se os locais de emparelhamento de cada <i>primer</i> [24].	15
Figura 7 - Média dos valores de perda auditiva (dB) calculados para cada frequência (Hz) para os homens e para as mulheres da amostra em estudo.	20
Figura 8 - Gel de agarose a 2% (p/v) para visualização dos DNAs amplificados por PCR multiplex para a deleção 4977pb.	23
Figura 9 – Comparação das variantes obtidas para o gene NAT2 nos grupos dos 34% melhores e 34% piores ouvintes.	24
Figura 10 – Comparação das frequências de haplogrupos do mtDNA observadas nos grupos dos 34% melhores ouvintes (a) e 34% piores ouvintes (b).	25
Figura 11 – Comparação das medianas de perdas auditivas da amostra com as medianas da ISO 7029, para os homens.	40
Figura 12 - Comparação das medianas de perdas auditivas da amostra com as medianas da ISO 7029, para as mulheres.	40

Lista de Siglas, Abreviaturas e Unidades

ARHL – *Age-related Hearing Loss* (perda auditiva relacionada com a idade)

ATP – trifosfato de adenosina

BSA – soro acetilado de albumina de bovino

Cm - centímetro

dB – decibel

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxirribonucleótido

EDTA – etilodiaminotetracetato

g – grama

h – hora

H₂O – água

Hz – hertz

IND – não definido

ISO – International Standard Organization

L – litro

min – minuto

mM - milimolar

mtDNA – DNA mitocondrial

nt - nucleótido

°C – grau Celsius

pb – pares de base

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

p/v – peso por volume

ROS – *Reactive Oxygen Species* (espécies reactivas de oxigénio)

Rpm – rotações por minuto

s – segundo

SDS - dodecilsulfato de sódio

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

TBE – tris-borato-EDTA

T_m – temperatura de *melting*

U – unidade de enzima de restrição

UV – radiação ultravioleta

V – volt

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

Agradecimentos

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

Ao serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Coimbra e do Hospital de Santa Maria, pelo fornecimento das amostras;

Aos centros de apoio social de Setúbal: CATI, Cáritas, Centro Social São Sebastião e Centro Comunitário de Vanincelos, por se terem disponibilizado a colaborar no estudo;

Ao Dr Edmundo Silva, audiologista na Widex-Setubal, e à Widex no geral, pela realização dos exames audiológicos;

À Prof. Doutora Marília Antunes e Prof. Doutora Valeska Andreozzi, do Departamento de Estatística e Investigação Operacional da FCUL, por todo o apoio dado à parte da análise estatística;

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

À Prof. Doutora Graça Fialho e ao grupo da Surdez Hereditária do BioFIG (Joana Chora, Helena Teixeira e Tiago Matos), por toda a ajuda e apoio fornecido;

Aos colegas de laboratório (Sandra, Teresa e Abdou), por todas as dúvidas tiradas;

À minha avó, irmã, pai, Nela e primo Miguel.

Resumo

A presbiacúsia ou perda auditiva relacionada com a idade (ARHL) é uma das doenças crónicas que mais afecta a população idosa e poderá vir a tornar-se um sério problema de saúde tendo em conta o aumento da esperança média de vida. A ARHL caracteriza-se por uma perda auditiva progressiva, bilateral, que se inicia nas altas frequências e resulta da degeneração das estruturas cocleares no ouvido interno. É normalmente acompanhada por uma diminuição na capacidade de comunicação, tendo uma influência negativa na qualidade de vida dos idosos podendo conduzir ao isolamento social o que também contribui para a depressão e ansiedade. Por este motivo torna-se especialmente relevante o presente estudo, que incide nesta população.

Neste estudo piloto procurou-se, numa amostra da população portuguesa com presbiacúsia (n=100), testar possíveis associações com SNPs no gene *NAT2*, com a deleção 4977pb do genoma mitocondrial e com os haplogrupos do genoma mitocondrial. Variantes neste gene e certos haplogrupos mitocondriais estão descritos como associadas à presbiacúsia, na população europeia (*NAT2*6A*) e na população australiana (haplogrupos U e K). A deleção 4977pb está descrita como sendo directamente proporcional ao aumento da idade, estando também associada à presença de presbiacúsia.

Regiões do gene *NAT2* e da região hipervariável 1 (HVS1) do genoma mitocondrial foram amplificadas por PCR e sequenciadas de modo a identificar polimorfismos. Estes permitiram definir os genótipos e os haplogrupos, respectivamente. A presença ou ausência da deleção 4977pb foi identificada por um PCR multiplex.

As frequências encontradas para as variantes em estudo estão de acordo com as esperadas para uma população europeia. Em nenhum caso se encontrou uma associação estatisticamente significativa entre a variante estudada e a presbiacúsia. A deleção 4977 pb não foi encontrada em nenhum indivíduo da amostra.

Este é o primeiro estudo sobre factores genéticos associados à presbiacúsia na população Portuguesa.

Palavras chave: presbiacúsia, stress oxidativo, *NAT2*, haplogrupo do mtDNA, deleção 4977 pb

Abstract

Presbycusis or age-related hearing loss (ARHL) is one of the major chronic diseases affecting the elderly population and may become a major health problem, considering the increase in life expectancy. ARHL is characterized by progressive, bilateral high-frequency hearing loss resulting from degeneration of cochlear structures within the inner ear, often accompanied by a decrease in speech discrimination. This has a negative influence on the elderly quality of life due to social isolation which contributes to depression and anxiety.

Associations of ARHL with SNPs on *NAT2* gene, the 4977bp mitochondrial deletion and mitochondrial haplogroups were tested in a sample (n=100) of the elderly Portuguese population with presbycusis. In the general European population (*NAT2*6A*) and in an Australian population (haplogroups U and K), associations have been described for these variants. The 4977bp deletion has been associated with the process of aging and ARHL.

NAT2 and the mitochondrial hypervariable region 1(HVS1) were amplified by PCR and automatically sequenced in order to determine the *NAT2* genotypes and haplogroups. The presence of the 4977bp deletion was assessed by multiplex PCR.

The patterns of variants found in this sample seem to be consistent with those previously described for the general European population. We could not find any statistical significant association between studied variants and presbycusis. The 4977bp deletion was not present in any individual.

Here we present the first genetic study on presbycusis in the Portuguese population.

Key words: presbycusis, oxidative stress, *NAT2*, haplogroup, 4977bp deletion

1. Introdução

1.1 Presbiacúsia

A presbiacúsia, ou perda auditiva relacionada com a idade, caracteriza-se pela deterioração progressiva da sensibilidade auditiva e está associada ao processo de envelhecimento biológico [1]. É caracterizada por perdas auditivas bilaterais, simétricas e progressivas. As frequências mais altas do espectro auditivo são as primeiras a ser afectadas, sendo as baixas frequências as últimas a ser lesadas. Consequentemente, para além da pior audição, as pessoas afectadas por presbiacúsia têm maiores dificuldades na compreensão da fala, principalmente em ambientes ruidosos, pois ouvem o som mas não percebem o que está a ser dito. Deste modo, há uma diminuição da capacidade de comunicar, o que tem efeitos negativos na qualidade de vida dos indivíduos podendo resultar em problemas a nível emocional e de isolamento social [1]. Outras alterações resultantes da presbiacúsia são a diminuição do suporte cognitivo, a diminuição da percepção e o aumento dos limiares de detecção de estímulos auditivos. A idade de início dos sintomas, velocidade de progressão e gravidade da doença apresentam uma grande variação de indivíduo para indivíduo, indicando uma grande variabilidade inter-individual, no entanto está associada a idades mais avançadas, esperando-se que exista nos idosos, ainda que existam alguns registos em indivíduos com idades próximas dos 40 e dos 50 anos [1].

Igualmente variável é a prevalência de presbiacúsia nas diferentes populações, o que é atribuído a diversos factores, como a genética do indivíduo, a alimentação, factores sócio-económicos e variáveis ambientais consideradas de risco (exposição a ruído, medicação ototóxica, exposição a químicos, condições médicas, malnutrição, fumo de tabaco e abuso de álcool) [2]. A contribuição dos factores genéticos para o desenvolvimento de presbiacúsia foi demonstrada por diversos estudos de heritabilidade, sendo estimada em 50%, o que também indicia uma predisposição genética em indivíduos com um historial familiar de presbiacúsia [3]. Não há cura para a presbiacúsia, o único tratamento possível é o recurso a ajudas técnicas, o que envolve o uso de um aparelho auditivo, mas o conhecimento da existência de uma predisposição genética pode levar o indivíduo a adoptar comportamentos auditivos mais seguros como por exemplo, a não exposição a ruídos intensos [4].

A presbiacúsia afecta aproximadamente 60% das pessoas com mais de 65 anos (definidos como idosos pela WHO) no mundo [5] e em 1980 cerca de 11% da população mundial tinha 76 anos e espera-se que este número duplique até 2030, traduzindo-se estes números num grande aumento da incidência de presbiacúsia [6]. A presbiacúsia é uma das quatro principais doenças crónicas que afectam a população idosa, podendo vir a tornar-se um grande problema de saúde pública considerando o aumento da esperança média de vida e o conseqüente envelhecimento da população [3].

Entre 2002 e 2007 a percentagem da população idosa em Portugal aumentou de 16,7% para 17,4% e em 2008 para 17,6%. No mesmo período, o índice de envelhecimento aumentou, passando de 105 para 115 em 2008, considerando-se este índice o número de indivíduos com 65 ou mais anos de idade por cada 100 indivíduos com menos de 15 anos de idade [7]. Deste modo, a percentagem da população que pode apresentar presbiacúsia está a aumentar, o que justifica a pertinência da realização de estudos que permitam identificar genes de susceptibilidade ou polimorfismos associados à presbiacúsia [3].

1.2 Mecanismo da audição e estrutura da cóclea

O sistema auditivo periférico consiste no ouvido externo, ouvido médio e ouvido interno (Figura 1a). O ouvido externo é constituído pelo pavilhão auricular e pelo canal auditivo externo, terminando na membrana do tímpano. No ouvido médio localizam-se três ossículos, o martelo, bigorna e estribo. O ouvido interno contém o labirinto membranoso, de estrutura complexa, dentro de uma cavidade do osso temporal, preenchido por um líquido denominado endolinfa e rodeado por outro líquido denominado perilinfa [8]. É no ouvido interno que se encontram os órgãos sensoriais, responsáveis pela audição (cóclea) e pelo equilíbrio (sistema vestibular). As células do interior do canal coclear são altamente modificadas de modo a formar o órgão de Corti, que contém células epiteliais de suporte e células sensoriais ciliadas, organizadas numa fila de células internas e três filas externas, que estão cobertas por membranas (Figura 1b). O órgão de Corti fica na membrana basilar e as suas células ciliadas são especializadas na transdução do sinal mecânico em potenciais de acção que são transmitidos ao córtex cerebral e percebidos como som [8]. O estereocílio, que se localiza na célula ciliada, é a estrutura responsável pela mecanorecepção. As células ciliadas encontram-se seladas na parte apical-lateral por junções apertadas o que leva a que diferentes regiões da mesma célula estejam banhadas por diferentes líquidos, de diferentes composições iónicas. As células ciliadas são banhadas na sua superfície superior pela endolinfa. No ouvido interno também existe o labirinto ósseo e o labirinto membranoso, este último preenchido pela endolinfa. O espaço entre os dois labirintos está preenchido pela perilinfa. A endolinfa é rica em potássio, pobre em cálcio e sódio. A perilinfa tem uma baixa concentração de potássio, uma alta concentração de sódio e uma baixa concentração de cálcio. As células ciliadas externas são contrácteis e têm a função de amplificar o estímulo auditivo, enquanto as células ciliadas internas são sensoriais e transmitem o estímulo auditivo aos nervos do centro auditivo. As células ciliadas externas podem alongar ou encurtar, em resposta ao movimento da membrana basilar, para produzir amplificação ou atenuação da resposta das células ciliadas internas [3]. A estria vascular,

uma estrutura secretora na parede lateral da cóclea, secreta potássio para a endolinfa e produz o potencial endococlear, com 80mV de diferença entre a endolinfa e a perilinfina [10].

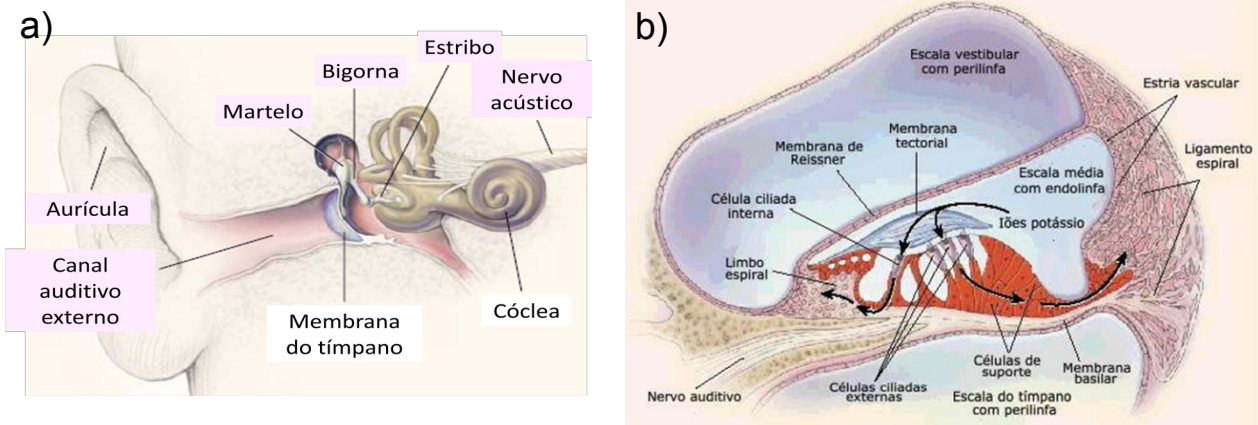


Figura 1 – Esquema da estrutura do ouvido (a) e um corte da cóclea evidenciando a localização do órgão de Corti (b), onde se encontram as células ciliadas, responsáveis pela audição [9].

O ouvido interno capta as ondas sonoras e transfere-as à membrana do tímpano, onde a vibração é transferida aos três ossículos, que por sua vez a transmitem à janela oval, o que leva à produção de ondas nos líquidos do ouvido interno. As vibrações na membrana basilar são transferidas às células ciliadas do órgão de Corti. Os estereocílios são deflectidos e abrem-se os canais de cálcio presentes nos estereocílios, ocorre a mecanotransdução do sinal. O influxo de potássio ocorre de seguida e mantém uma corrente de transdução, o gradiente eléctrico entre a endolinfa e o citoplasma da célula ciliada é de 150mV. A corrente que se gera leva à despolarização da célula ciliada, o que nas células ciliadas internas induz um influxo de potássio através da membrana basal, levando à libertação de neurotransmissor para as fibras nervosas que vão transmitir ao cérebro potenciais de acção codificando o estímulo sonoro. As células ciliadas respondem gradualmente a frequências variáveis e estão posicionadas linearmente ao longo do eixo longitudinal da cóclea, formando um mapa tonotópico. As altas frequências são detectadas na base da cóclea e as baixas frequências na parte apical [10], sendo a cóclea capaz de detectar sons com frequências que vão dos 20Hz aos 20kHz [8]. Lesões na cóclea ou no córtex cerebral podem causar perdas sensoriais e neurais com impacto na função auditiva [8].

Histologicamente, a presbiacúsia caracteriza-se pela degeneração e perda de células ciliadas e neurónios cocleares (associados a perdas das altas frequências), e atrofia da estria vascular (associada a perdas das baixas frequências) [1]. As células ciliadas da base da cóclea sofrem lesões antes das células do lado apical e este processo é visto como causa da progressão das perdas auditivas das altas para as baixas frequências, como acontece na presbiacúsia [3].

1.3 Etiologia da presbiacúsia

A etiologia da presbiacúsia é complexa e classifica-se como sensorial, quando associada à degeneração progressiva da cóclea, à perda das células ciliadas sensoriais e às conexões neurais associadas; ou mecânica, quando a elasticidade da membrana basal e outras estruturas do órgão de Corti, como a membrana tectorial, são afectadas [11]. As células ciliadas perdidas não regeneram no ser humano ao contrário do que acontece nas aves (que são capazes de produzir novas células ciliadas após lesões nas mesmas), o que confere à presbiacúsia um carácter permanente [12]. Dada a limitação da perda auditiva, um diagnóstico precoce torna-se essencial para reduzir o impacto na qualidade de vida dos indivíduos afectados [5].

A avaliação das perdas auditivas é realizada através de um exame audiológico, a audiometria tonal simples, que indica o valor, em decibéis, da perda auditiva para cada frequência testada (125, 250, 1000, 2000, 4000 e 8000Hz). O aparelho usado neste exame emite sons de frequência (Hz) e intensidade (dB) variáveis, o que permite detectar o limiar de audição de cada indivíduo, ou seja, o nível mais baixo de intensidade de um sinal acústico que provoca sensação auditiva. A partir dos valores obtém-se um gráfico denominado audiograma. A forma do audiograma permite determinar o tipo e o grau de surdez, e no caso da presbiacúsia tem uma forma típica, devido às perdas mais acentuadas nas altas frequências (Figura 2) [13].

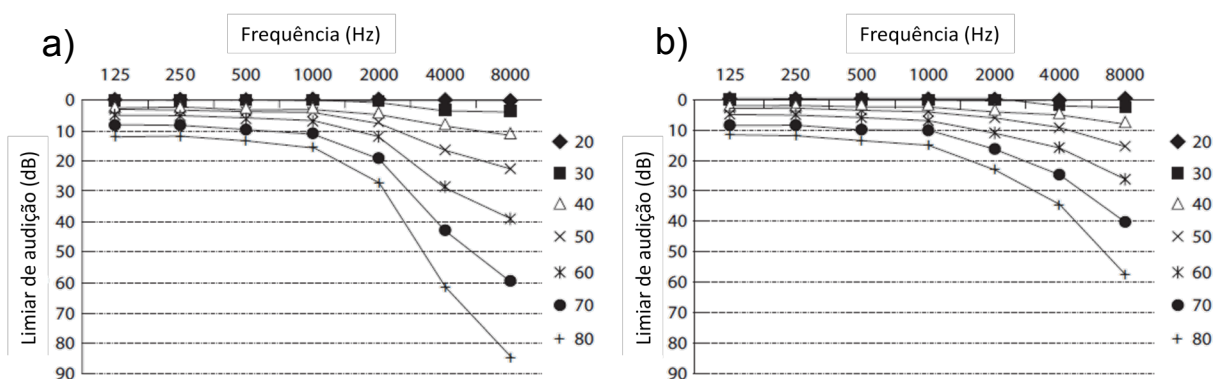


Figura 2 - Valores normais de audição de acordo com a ISO 7029 para homens (a) e para mulheres (b). No eixo das abcissas (OX) encontram-se as frequências (Hz) e no eixo das ordenadas (OY) os valores para o limiar de audição (dB). Cada gráfico representa a mediana dos limiares auditivos para uma dada frequência para uma dada faixa etária [13], por exemplo, nos homens, para a frequência de 8000Hz, na faixa etária dos 70 anos, o limiar de audição é de 60dB.

Os valores apresentados na figura 2 constam da ISO 7029, a qual define os valores padrão através do cálculo da mediana para cada frequência para um conjunto de indivíduos com audição normal, sem perdas nem doenças auditivas, sem cerúmen, sem historial familiar de perdas nem demasiada exposição a ruído. A ISO 7029, normalmente usada como referência, não se adapta a certas populações, já que a maioria das pessoas esteve

exposta a um destes factores durante a vida [4]. Também não é clara a nacionalidade da amostra considerada para estimar as medianas apresentadas na ISO 7029, nomeadamente a percentagem de indivíduos da população portuguesa.

Na presbiacúsia, os homens são mais afectados em relação às perdas auditivas nas altas frequências do que as mulheres, o que pode ser devido a mecanismos hormonais, como por exemplo os diferentes níveis de estrogénio [13].

1.3.1 Factores genéticos

O envelhecimento está associado a um grande conjunto de alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares que podem resultar de alterações no DNA, diminuição da função mitocondrial, redução das concentrações celulares de água, alterações iónicas, insuficiência vascular e diminuição da elasticidade da membrana plasmática [2]. Estão descritos vários factores que podem contribuir para o processo fisiológico do envelhecimento, sendo o stress oxidativo um dos mais referidos como relacionado com a presbiacúsia [2]. O stress oxidativo envolve o metabolismo de espécies reactivas de oxigénio (ROS), sendo estes radicais livres muito reactivos e extremamente tóxicos para as estruturas celulares. O aumento de ROS está também associado à diminuição da produção e/ou da actividade de enzimas que protegem a célula das lesões oxidativas. Consequentemente estas lesões podem contribuir para deleções específicas no DNA mitocondrial (mtDNA), tornando progressivamente a mitocôndria ineficiente em termos bioenergéticos. No caso da cóclea esta situação poderá estar relacionada para as perdas auditivas relacionadas com o envelhecimento [2]. Deleções no mtDNA acumulam-se preferencialmente em tecidos como o ouvido interno, retina, músculo esquelético e cérebro, daí a susceptibilidade destes tecidos a hipoxia, isquémia e ao envelhecimento [6]. Segundo a teoria do “Relógio mitocondrial do envelhecimento” a diminuição da capacidade protectora e dos mecanismos de reparação ocorre com o envelhecimento, o que leva à acumulação de erros bioquímicos e metabólicos que culminam na morte celular. Esta teoria sugere também que lesões induzidas por ROS medeiam o envelhecimento, o que pode levar a supor que com a idade ocorre hipoperfusão no tecido coclear, o que leva a isquémia e à formação de ROS, com efeitos adversos sobre o epitélio neuronal [6]. A diminuição da função mitocondrial e o aumento de deleções no mtDNA foram identificadas em diferentes tecidos de indivíduos envelhecidos [14]. Por diferentes autores foi descrito que 67% dos indivíduos com deleções no mtDNA manifestam também perda auditiva sensorial, o que pode ser explicado pelo facto dos efeitos destas deleções no mtDNA serem mais notórias em tecidos com muitas mitocôndrias [6,14].

1.3.1.1 Genes candidatos

Genes candidatos são aqueles que se pensa contribuir para a presbiacúsia e que, devido ao local de expressão e papel das suas proteínas, desempenham um papel na função auditiva normal [13]. Entre eles encontram-se genes responsáveis por formas não síndromicas de surdez, genes envolvidos no metabolismo oxidativo (que codificam para enzimas anti-oxidantes como a GST, GPX1 e GSR) e genes mitocondriais [3]. Devido a similaridades com a presbiacúsia, genes envolvidos no aparecimento tardio de perda auditiva não síndromica, são também excelentes candidatos [3]. Assim, estudos no gene *KCNQ4*, que codifica para uma proteína que forma canais de potássio com expressão na membrana basal das células ciliadas da cóclea e cujas mutações estão associadas a um tipo de surdez autossômica dominante, permitiram identificar polimorfismos em associação com a presbiacúsia [15]. Sabe-se que mutações no gene *GJB2*, que codifica para a conexina 26, uma proteína das *gap junction*, são responsáveis por 80% das formas recessivas de surdez não síndromica e também uma forma de surdez não síndromica dominante [16]. É possível que um mecanismo semelhante esteja relacionado com a presbiacúsia, existindo um gene principalmente envolvido na perda auditiva decorrente do envelhecimento, mas que ainda não foi identificado [2]. No entanto existe evidência de linkage com a presbiacúsia para vários *loci*, como seja a região DFNA18 e DFNA2 [3]. Há no entanto outros genes e locais do genoma com associação descrita à presbiacúsia. Um polimorfismo no gene *NAT2*, importante para o balanço do estado oxidativo da célula, bem como mutações no mtDNA e dois dos seus haplogrupos estão descritos como associados significativamente à presbiacúsia [2, 5, 17,18].

1.3.1.2 O papel do *NAT2*

A enzima *NAT2* é uma N-acetiltransferase que actua na detoxificação de substratos exógenos através de N-acetilação ou O-acetilação, sendo também importante na defesa contra ROS e para o balanço do estado oxidativo da célula [19]. Drogas insuficientemente acetiladas acumulam-se e convertem-se em substratos para as enzimas oxidativas, estando as enzimas *NAT* envolvidas na redução da formação destes metabolitos reactivos. A enzima *NAT2* é codificada pelo gene *NAT2*, que se localiza no cromossoma 8p22 e envolve a transcrição de dois exões codificantes, um de 100pb e outro de 870pb [19]. As populações humanas são muito heterogéneas no que diz respeito ao genótipo de *NAT2* que podem apresentar, sendo o *NAT2*4* considerado o haplótipo selvagem. Assim, todas as substituições nucleotídicas referem-se a esta sequência. Na Europa foi encontrada uma alta correlação em frequência para os três polimorfismos T341C, C481T e A803G (este conjunto de três polimorfismos define o haplótipo *NAT2*5B*), encontrados sempre juntos na população europeia [20]. Alguns polimorfismos neste gene resultam em enzimas com baixas

taxas de acetilação, que levam à redução dos mecanismos de detoxificação, outros codificam para enzimas de altas taxas. As substituições nucleotídicas têm portanto um efeito fenotípico na actividade da enzima NAT2, aumentando ou reduzindo a sua função consoante a alteração aminoacídica resultante, resultando em alterações da afinidade para o substrato, à actividade catalítica e/ou da estabilidade proteica [19]. Cada genótipo de NAT2 pode ser classificado num de três fenótipos: rápido (presença de dois haplótipos rápidos), intermédio (um rápido e um lento) e lento (dois haplótipos lentos). Este último é predominante nas populações europeias, provavelmente reflectindo passadas pressões selectivas que poderão ter dado alguma vantagem selectiva para estes SNPs [20]. Actualmente, estão descritas sete substituições *missense* (G191A, T341C, A434C, G590A, A803G, A845C e G857A) e quatro substituições silenciosas (T111C, C282T, C481T e C759T) na região codificante do gene NAT2 que estão associadas a fenótipos específicos. Por exemplo, as mutações G191A, T341C, A434C, G590A e G857A correspondem a fenótipos de acetilador lento e são designadas respectivamente por NAT2*14, NAT2*5, NAT2*17, NAT2*6 e NAT2*7 [19]. Numa amostra da população europeia, foi descrita uma associação significativa entre o polimorfismo NAT2*6A, que corresponde à presença das alterações G590A e C282T, e a presbiacúsia, o que sugere um papel importante deste gene para o desenvolvimento da presbiacúsia [2].

1.3.1.3 mtDNA

A mitocôndria é um dos organelos que se encontram presentes nas células dos organismos eucariotas. O seu papel principal é a síntese de ATP, produção de calor e produção de ROS decorrentes das reacções da respiração mitocondrial. O seu DNA é circular e tem 16569 pb, contendo 13 genes que codificam para proteínas pertencentes à cadeia respiratória [21]. O genoma mitocondrial apenas é transmitido através da linhagem materna, o que permite seguir a sua transmissão desde um ancestral comum, pela identificação de polimorfismos que se acumulam com o passar do tempo. Certos conjuntos de polimorfismos definem grupos de mtDNA, os haplogrupos, todos eles derivados de um ancestral comum. Estudos filogenéticos permitiram construir uma árvore filogenética dos haplogrupos, onde se demonstra uma distribuição específica por regiões, estando a raiz da árvore localizada em África. Os haplogrupos mais frequentes na Europa são H, U, K, J, T, V, X, I e W, conforme se pode ver na figura 3 [21].

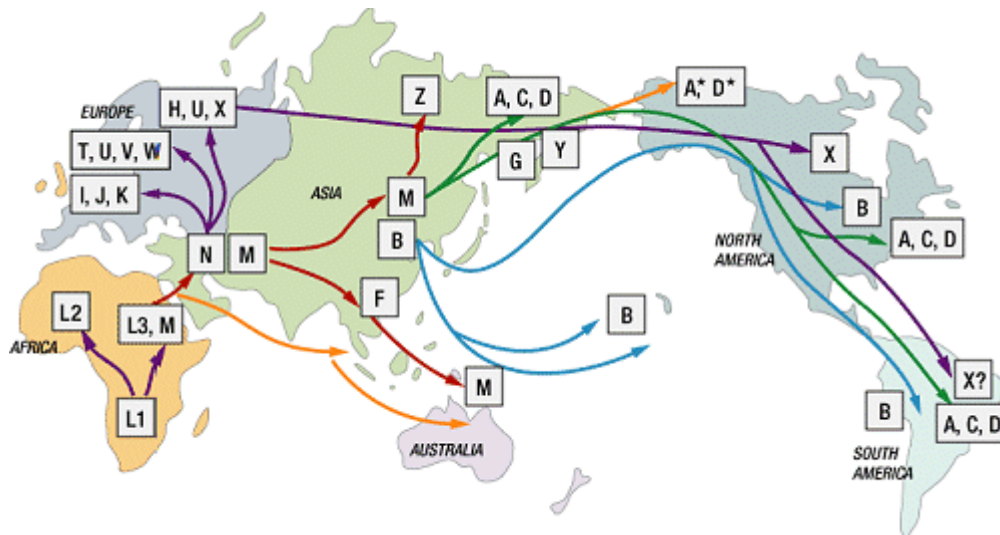


Figura 3 – Haplogrupos do mtDNA e respectiva distribuição geográfica [22].

Muitos dos polimorfismos que caracterizam os haplogrupos, localizam-se na região codificante e alguns deles introduzem substituições nos aminoácidos. A diversidade de polipéptidos que daqui se origina pode ter um efeito funcional nos complexos proteicos. Diferentes estados proteicos poderão ser seleccionados em diferentes regiões [21].

O mtDNA é extremamente susceptível a mutações, por estar exposto a grandes concentrações de radicais livres gerados pela cadeia respiratória e por não possuir enzimas que o protejam de lesões. Algumas destas mutações têm sido descritas como tendo um papel importante no envelhecimento [14]. Variações/Mutações na região controlo não codificante não afectam directamente a produção de ATP nem a de ROS, no entanto podem ter um papel muito importante a nível da regulação da expressão génica. A grande maioria da região controlo tem uma função desconhecida [21]. A região não codificante, importante para a replicação da mitocôndria, apresenta taxas de mutação muito mais elevadas do que a região codificante, daí que esta região, chamada de região hipervariável (HVS) seja muitas vezes sequenciada de modo a se obter informações sobre o genoma da mitocôndria. Os polimorfismos identificados na região hipervariável podem ser usados para a classificação de haplogrupos [23]. Relativamente à presbiacúcia foi descrita, numa população australiana, a existência de uma associação com os haplogrupos U e K do genótipo mitocondrial [18]. A associação de deleções mitocondriais com a presbiacúcia também está descrita. Conhecem-se deleções específicas que se sabem ser directamente proporcionais ao aumento da idade, nomeadamente a deleção de 4977pb de comprimento, por vezes referida na bibliografia como “deleção da idade” [5,6]. Neste sentido, torna-se relevante estudar a presença desta deleção em indivíduos com presbiacúcia.

1.4 Objectivos

Este trabalho tem como principal objectivo contribuir para o conhecimento da presbiacúsia na população portuguesa, sendo esta uma área de relevância actual. Para o devido efeito pretende-se caracterizar uma amostra da população idosa portuguesa com presbiacúsia quanto ao grau de surdez, quanto aos haplogrupos do mtDNA nos indivíduos da amostra; quanto à deleção de 4977pb do mtDNA; genotipar a amostra para polimorfismos no gene *NAT2*; analisar estatisticamente a associação entre as variantes identificadas e a presbiacúsia.

2. Metodologia

2.1 Colheita das amostras

A amostra seleccionada consiste em 100 indivíduos da população portuguesa, com mais de 65 anos de idade e com indicação clínica de presbiacusia. A selecção dos indivíduos foi realizada seguindo uma lista de critérios de exclusão, verificada pela realização de um questionário (Anexo A), pelo qual se procurou informações relevantes de modo a excluir factores de confundimento. Excluíram-se todos os indivíduos que tinham:

- doenças cardiovasculares: síndrome do QT longo, transplante cardíaco, AVC, cirurgias nas carótidas;
- doenças metabólicas e/ou hormonais: todas excepto diabetes, doenças da tiróide, hiperparatiroidismo e insuficiência crónica renal;
- doenças autoimunes excepto artrite reumatóide e gota;
- neoplasias excepto neoplasias locais fora da região da cabeça e que não tenham sido tratadas com quimioterapia;
- doenças do foro neurológico exceptuando epilepsia e enxaquecas;
- doenças psiquiátricas caso tenha ocorrido hospitalização;
- doenças pulmonares: fibrose pulmonar idiopática, fibrose quística e sarcoidose;
- doenças hematológicas que tenham sido tratadas com medicação ototóxica;
- doenças infecciosas como a sida, sífilis, tuberculose apenas quando tratada com estreptomicina e meningite;
- algum síndrome congénito.

Em caso de cirurgia otológica unilateral pode-se incluir indivíduos considerando apenas os resultados audiológicos do ouvido que não foi operado. Assim e em caso de perdas unilaterais considerou-se sempre o ouvido melhor, ou seja, com menor défice auditivo. Podem incluir-se os casos de surdez de condução, surdez unilateral e surdez assimétrica, desde que não devidas a factores genéticos.

A amostra foi recolhida por conveniência, incluindo indivíduos que obedeciam aos critérios de exclusão e que foram contactados no Hospital de Coimbra, Hospital de Santa Maria; e pelo grupo da Surdez da BioFIG. Assim a amostra inclui doentes dos serviços de ORL e idosos contactados em centros de apoio social de Setúbal: CATI, Cáritas, Centro Social São Sebastião e Centro Comunitário de Vanincelos. A selecção de indivíduos da amostra pelos membros do grupo do BioFIG foi acompanhada por um audiólogo da Widex, que realizou os exames audiológicos. Estes exames foram realizados num local o mais isolado possível de qualquer tipo de ruído, tendo sido utilizado um audiómetro Auriga Smart portátil. O exame audiológico realizado a todos os indivíduos da amostra foi o audiograma tonal simples, tendo sido as frequências testadas: 125, 250, 1000, 2000, 4000 e 8000Hz.

A colheita de sangue foi feita em cartões FTA da Whatman, após picada no dedo, seguindo o protocolo do fabricante, envolvendo uma colheita de sangue menos agressiva e por isso habitualmente bem aceite pelos indivíduos que se voluntariam para o estudo. As amostras colhidas em cartões FTA foram codificadas e guardadas à temperatura ambiente. Todos os indivíduos assinaram consentimento informado.

2.2 Extração de DNA

Para se proceder à extração do DNA, a partir das amostras de sangue colhidas em cartões FTA, seguiu-se o protocolo: Cortar 1cm² da mancha de sangue no cartão FTA em pedaços de 2mm² e colocá-los num tubo *ependorf* 1,5mL. Depois junta-se 500µL de tampão DLB (1mL Tris/HCl 1M pH=7,4), 50µL de SDS (10%), 5µL de proteinase K (20 mg/mL) e incuba-se a 56°C durante a noite agitando suavemente. Junta-se 20µL de NaCl (5M), 575µL da mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e agita-se por inversão. Centrifuga-se a 12.000 rpm durante 3min e recupera-se a fase superior para um novo tubo *ependorf* 1,5mL. Junta-se à fase recuperada 575µL da mistura de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agita-se por inversão. Centrifuga-se novamente a 12.000 rpm durante 3min e recupera-se a fase superior para um novo tubo *ependorf* 1,5mL. Neste tubo adiciona-se 1mL de etanol a 96% a -20°C e incuba-se o tubo a -20°C durante pelo menos 1 hora. Passado o tempo centrifuga-se a 12.000 rpm durante 15min numa centrífuga refrigerada a 4°C. Rejeita-se o sobrenadante e seca-se o precipitado. Quando o tubo estiver completamente seco, isto é, sem vestígios de etanol junta-se 100µL de H₂O estéril e incuba-se a 56°C durante a noite agitando suavemente. Os tubos deverão ser guardados a -20°C. Este método deve reter cerca de 50 ng/µL (2-5 µg/cm²).

Após a extração, os DNAs foram sempre corridos em gel de agarose 1% (Ultrapure[™] Agarose da Invitrogen) em tampão TBE 0,5X, numa tina sunrise, com uma voltagem de 95V durante 1h30min. Foram aplicados 4µL de DNA no poço. Após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio (2 µg/mL) e depois foi fotografado quando exposto a UV, utilizando o sistema EDAS 290 (Kodak Digital Science). As fotos foram manipuladas utilizando o software Kodak 1D (Scientific Imaging Systems). O aparecimento de uma banda de grandes dimensões indica que se tem realmente DNA e que este está em boas condições e não degradado.

2.3 Reacção de amplificação por PCR

De modo a sequenciar o gene *NAT2* e a região HVS1 do genoma mitocondrial para posterior identificação dos polimorfismos, foi necessário primeiro amplificar a região a

sequeciar. A detecção da presença ou ausência da deleção 4977pb no mtDNA também foi feita utilizando a técnica de PCR.

O gene *NAT2* foi amplificado a partir da posição nt+127 até à posição nt+965. O par de *primers* utilizado foi adaptado de outros descritos [2] e que permitem obter um fragmento de 839pb, conforme indicado na figura 4.

```
CATTGTGGGCAAGCCA TGAGATTGGGCTTAGAGGCTATTTTTGATCACATTGTAAGAAGAAACCGGGGTGGGTG
GTGTCTCCAGGTCAATCAACTTCTGTACTGGGCTCTGACCACAATCGGTTTTTCAGACCACAATGTTAGGAGGGT
ATTTTTACATCCCTCCAGTTAAACAAATACAGCACTGGCATGGTTCACCTTCTCCTGCAGGTGACCATTGACGGC
AGGAATTACATTGTCGATGCTGGGTCTGGAAGCTCCTCCCAGATGTGGCAGCCTCTAGAATTAATTTCTGGGAA
GGATCAGCCTCAGGTGCCTTGCATTTTCTGCTTGACAGAAGAGAGAGGAATCTGGTACCTGGACCAAATCAGGA
GAGAGCAGTATATTACAAACAAAGAATTTCTTAATTCTCATCTCCTGCCAAAGAAGAAACACCAAAAAATATAC
TTATTTACGCTTGAACCTCGAACAATTGAAGATTTTGAGTCTATGAATACATACCTGCAGACGTCTCCAACATC
TTCATTTATAACCATCATTTTGTTCCTTGACAGACCCAGAGGGGTTTACTGTTTGGTGGGCTTCATCCTCA
CCTATAGAAAATTCAATTATAAAGACAATACAGATCTGGTTCGAGTTTAAAACTCTCACTGAGGAAGAGGTTGAA
GAAGTGC TGAAAAATATATTTAAGATTTTCTTGGGGAGAAATCTCGTGCCAAACCTGGTGATGGATCCCTTAC
TATTTAGAATAAGGAACAAAATAAACCCCTTGTGTATGTATCACCCAACCTACTAATTATCAACTTATGTGCTAT
CAGATAT CCTCTACCCCTACGGT
```

Figura 4 – Sequência do fragmento amplificado do gene *NAT2* e local de emparelhamento dos *primers forward* (azul) e *reverse* (laranja).

A região HVS1 do genoma mitocondrial foi amplificada da posição 15975 à 16515, num total de 357pb, com os *primers* seleccionados utilizando o programa OligoAnalyser, conforme indicado na figura 5.

```
CTCCACCATTAGCACCCAAAGC TAAGATTCTAATTTAAACTATTCTCTGTTCTTTTCATGGGGGAAGCAGA
TTTGGGTACCACCCAAGTATTGACTCACCCATCAACAACCGCTATGTATTTTCGTACATTACTGCCAGCC
ACCATGAATATTGTACGGTACCATAAATACTTGACCACCTGTAGTACATAAAAAACCAATCCACATCAA
AACCCCTCCCCATGCTTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCCTCAACTATCACACATCAACTGCAACTC
CAAAGCCACCCCTCACCCACTAGGATACCAACAAACCTACCCACCCCTAACAGTACATAGTACATAAAG
CCATTTACCGTACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAG
GGGTCCCTTGACCACCATCCTCCGTGAAATCAATATCCCGCACAAGAGTGCTACTCTCCTCGCTCCGGG
CCATAACACTTGGGGGTAGCTAAAGTGAAGTGTAT CCGACATCTGGTTCCTACTTCA
```

Figura 5 – Sequência do fragmento amplificado para a região HVS1 e local de emparelhamento dos *primers forward* (azul) e *reverse* (laranja).

O DNA genómico e o mtDNA foram amplificados por PCR a partir do DNA molde em 50µL de volume final de reacção. Tanto para os fragmentos de *NAT2* como de HVS1 a mistura de reacção contém para além de DNA, H₂O destilada autoclavada, tampão de amplificação 1x, 250µM de cada dNTP; 0,75U da enzima polimerase Taq (Invitrogen), 1,5mM de MgCl₂, BSA 1% (apenas na mistura para amplificação de *NAT2*) e 0,4µM de cada *primer*. O programa de PCR teve um ciclo inicial de desnaturação a 94°C durante 2min, seguido de um ciclo de extensão a 94°C durante 1min e um ciclo de emparelhamento a 59° durante 1min, continuando com 4 ciclos nos quais a temperatura de T_m decresce um grau cada ciclo (touchdown PCR), ao que se seguem 25 ciclos com passos de extensão a 94°C durante 1min, emparelhamento a 54°C durante 1min e extensão a 72°C durante 1min. O

programa termina com um passo de extensão final a 72°C durante 5min. As reacções de PCR foram realizadas nos termocicladores Biometra T Gradient, Biometra T1 Thermocycler e Biometra Personal Cycler (Whatman).

Para a detecção da presença, ou ausência, da deleção 4977pb, foi feito um PCR multiplex com três *primers*, dois *forward* e um *reverse* [24] que permitem amplificar fragmentos de diferentes dimensões (figura 6). Da amplificação com o par Fi/Rcx, só possível na ausência da deleção, resulta um fragmento de 331pb. Na presença da deleção apenas ocorre amplificação com par Fx/Rcx, que origina um fragmento de 380pb [24].

4977Fi - 5'-GCGCTATCACCCTCTGTTTCG -3'
 4977Fx - 5'-ACGACCGGGGGTATACTACGGTCAATGC-3'
 4977Rcx - 5'-GAGTAGAAACCTGTGAGGAAAGGTATTCCCT-3'

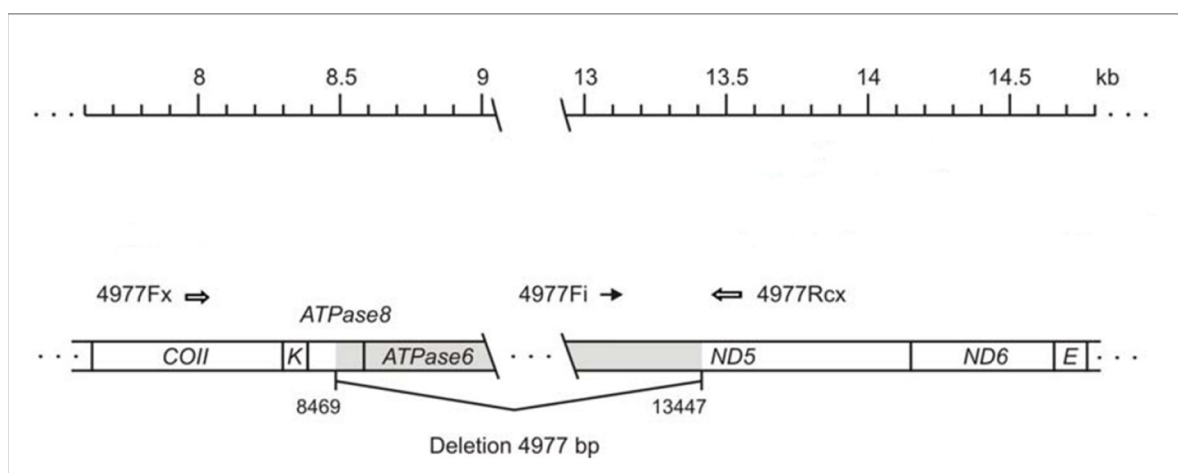


Figura 6 – Sequência dos *primers* utilizados para amplificação da região 4977pb, com e sem mutação. Na figura apresentam-se os locais de emparelhamento de cada *primer* [24].

Rcx emparelha fora da região que é deletada, Fi emparelha numa zona que sofre deleção e Fx emparelha fora da zona da deleção. Quando o genoma não está danificado Fi e Rcx são capazes de amplificar e Fx não amplifica porque se encontra demasiado longe de Rcx. Apenas quando ocorre deleção é que os *primers* Fx/Rcx ficam a uma distância que permite amplificação, e neste caso não ocorre amplificação com o par Fi/Rcx pois o local de emparelhamento de Fi é suprimido na deleção. Este PCR multiplex é possível pela especificidade de emparelhamento dos *primers* usados, conforme se verifica na figura 6 [24].

O mtDNA foi amplificado por PCR a partir do DNA molde em 25µL de volume final de reacção. A mistura de reacção contém para além de DNA, H₂O destilada autoclavada, tampão de amplificação 1x, 250µM de cada dNTP; 0,75U da enzima polimerase Taq (Invitrogen), 1,5mM de MgCl₂ e 0,4µM de cada *primer*. O programa de PCR teve um ciclo inicial de desnaturação a 94°C durante 2min, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30s, emparelhamento a 63°C durante 45s e extensão a 72°C durante 45s. O

programa termina com um passo de extensão final a 72°C durante 5min. As reacções de PCR foram realizadas nos termocicladores Biometra T Gradient e Biometra T1 Thermocycler (Whatman).

Para confirmar a presença de produto amplificado, bem como o seu tamanho esperado, os produtos das reacções de PCR foram corridos em gel de agarose 2%, numa tina Sunrise, com uma voltagem de 95V durante 2h; ou numa tina Pharmacia, com uma voltagem de 90V durante 3h, no caso dos fragmentos para detecção da deleção 4977pb. Foram aplicados 5 µL de produto de PCR das reacções HVS1 e NAT2 e 12,5 µL da reacção 4977pb nos poços. Os tamanhos dos fragmentos foram comparados com o marcador de pesos moleculares 1Kb Plus Ladder (Invitrogen). Após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio (2 µg/mL) e depois foi fotografado quando exposto a UV, utilizando o sistema EDAS 290 (Kodak Digital Science). As fotos foram manipuladas utilizando o software Kodak 1D (Scientific Imaging Systems).

2.4 Análise de Sequências

Os fragmentos a sequenciar, tanto da região HVS1 como do gene NAT2, foram primeiro purificados de maneira a remover impurezas e dímeros que poderiam mais tarde inibir a reacção de sequenciação. Seguiu-se o protocolo “Jet Quick Spin Column PCR purification”, segundo o qual se junta 400 µL de solução H1 e homogeneiza-se. Coloca-se a mistura numa coluna e centrifuga-se a 12000 rpm durante 1min. Rejeita-se o filtrado e adiciona-se 500µL de solução H2 reconstituída com etanol e volta-se a centrifugar a 12000 rpm durante 1min. Rejeita-se o filtrado e centrifuga-se de novo à velocidade máxima, neste caso 14000 rpm durante 1min. Coloca-se a coluna num tubo *ependorf* 1,5mL e junta-se 35µL de H₂O estéril pré-aquecida a 65°C. Centrifuga-se a 12000 rpm durante 2min e guarda-se os tubos a -20°C.

A sequenciação foi realizada comercialmente num sequenciador Abiprism 3700 (Applied Biosystems), as sequências obtidas foram analisadas usando o software Chromas Version 2.33 e comparadas com uma sequência de referência, NC_012920.1 (HVS1) e NG_012246.1 (NAT2), para a detecção das substituições nucleotídicas presentes.

Os génotipos de NAT2 foram identificados de acordo com a Consensus Human Arylamine N-Acetyltransferase Gene Nomenclature [25].

Os haplogrupos do mtDNA foram estimados com recurso ao software mtDNAmanager [26].

2.5 Análise de dados

As frequências dos genótipos, haplótipos e fenótipos de *NAT2* e dos haplogrupos do mtDNA na população amostrada foram calculadas utilizando o Excel Office 2007.

A amostra foi dividida em três grupos (34% nas caudas e 32% centrais). Considerou-se os indivíduos da amostra com melhor e com pior audição. A seleção destes grupos fez-se com base num *score*, calculado a partir das medianas da amostra para cada frequência, estimado por gênero e por idade. O *score* usado consiste na média das diferenças relativamente à mediana e, de acordo com o seu valor, escolheram-se os 34% melhores ouvintes e os 34% piores ouvintes da amostra. Estas duas caudas formam os extremos da amostra estudada e constituíram como grupos a ser comparados entre si. Os melhores ouvintes da amostra têm um *score* negativo e os piores têm um *score* positivo. Para cada indivíduo usou-se nos cálculos o melhor ouvido. Os indivíduos IND foram excluídos da análise estatística.

Foi aplicado o teste do Qui-Quadrado (χ^2) para comparar a frequência das características genéticas estudadas nos dois grupos considerados (melhores e piores ouvintes). Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos.

Foram ajustados modelos de regressão logística para tentar identificar possíveis associações entre a presbiacusia e as características genéticas, utilizando o software R 2.8.1.

3. Resultados

3.1 Caracterização da população em estudo

A amostra recolhida para este estudo piloto sobre a presbiacúsia na população portuguesa consiste em 100 indivíduos, com idades compreendidas entre os 65 e os 98 anos de idade (média de 77,7). Do total da amostra, 28 são homens (idades compreendidas entre os 67 e os 89, média de 76,7 anos) e 72 são mulheres (idades compreendidas entre os 65 e os 98, média de 78,6 anos). As medianas dos valores de perda auditiva obtidos para cada uma das frequências testadas, calculadas por classes de idade e género apresentam-se na tabela 1. As classes de idade foram constituídas do seguinte modo: 65-69 anos, 70-79 anos e > 80 anos.

Tabela 1 – Medianas dos valores de perda auditiva (dB) para cada frequência (Hz) por classes de género e idades.

		<i>Frequências (Hz)</i>						
		125	250	500	1000	2000	4000	8000
<i>Perdas de audição (dB)</i>	Homens 65-69	17,5	17,5	20	15	30	60	75
	Homens 70-79	20	25	25	35	50	65	72,5
	Homens >80	25	30	32,5	42,5	40	62,5	77,5
	Mulheres 65-69	15	15	25	25	30	30	42,5
	Mulheres 70-79	25	25	30	30	32,5	47,5	65
	Mulheres >80	30	30	35	35	45	55	80

A média das perdas auditivas obtida para os indivíduos da amostra (Figura 7), evidencia uma curva típica de presbiacúsia. Assim, as maiores perdas auditivas são nas frequências mais elevadas, tendo os homens maiores perdas nas altas frequências do que as mulheres. Na nossa amostra, não há diferenças nas perdas auditivas para as baixas frequências entre homens e mulheres.

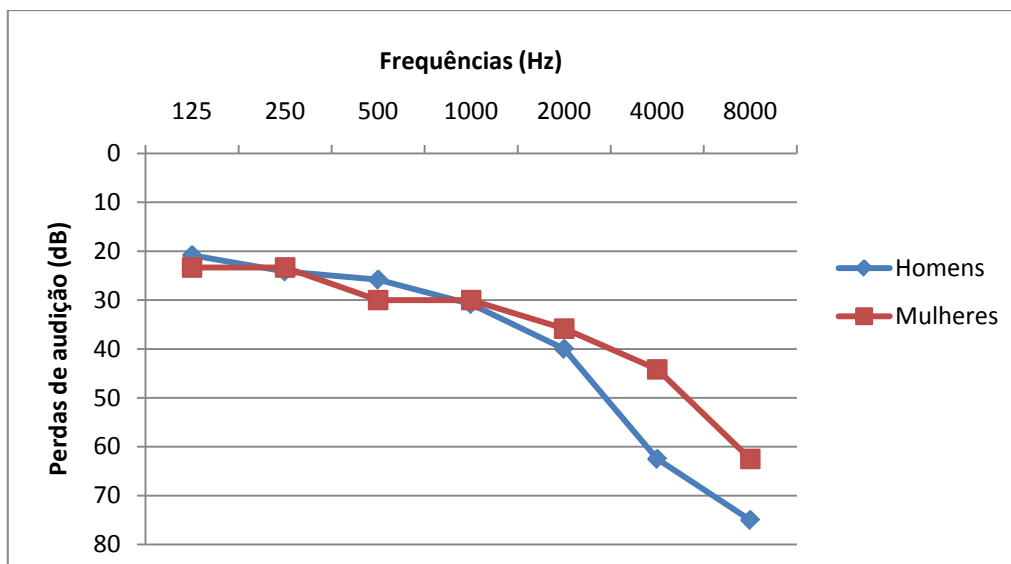


Figura 7 - Média dos valores de perda auditiva (dB) calculados para cada frequência (Hz) para os homens e para as mulheres da amostra em estudo.

3.2 Frequências para o gene *NAT2*

No que respeita ao estudo do gene *NAT2*, os haplótipos identificados na amostra, os polimorfismos distintivos de cada um e as suas frequências estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Frequências de cada haplótipo do gene *NAT2*, polimorfismos que os definem e efeito que têm no fenótipo da enzima *NAT2*. IND-haplótipo não determinado.

Haplótipo	SNPs	Fenótipo associado	Frequências (%)
<i>NAT2*4</i>	Referência	Rápido	23,7
<i>NAT2*5B</i>	341 T>C 481 C>T 803 A>G	Lento	44,4
<i>NAT2*6A</i>	282 C>T 590 G>A	Lento	23,2
<i>NAT2*5C</i>	341 T>C 803 A>G	Lento	1,0
<i>NAT2*6C</i>	282 C>T 590 G>A 803 A>G	Lento	3,0
<i>NAT2*12A</i>	803 A>G	Rápido	0,5
<i>NAT2*13A</i>	282 C>T	Rápido	1,0
<i>NAT2*14D</i>	191 G>A 282 C>T 590 G>A	Lento	0,5
<i>NAT2*5D</i>	341 T>C	Lento	0,5
IND	-	-	2,0

Os haplótipos *NAT2*5B* (44,4%) e *NAT2*6A* (23,2%) são os que se encontram mais bem representados na amostra. O haplótipo descrito como selvagem, *NAT2*4* (23,7%) também é comum, normalmente associado ao *NAT2*5B* ou ao *NAT2*6A*.

O genótipo mais frequente é o *NAT2*5B/5B*, correspondendo a 25,3% da população estudada (Tabela 3). Outros genótipos com boa representação na amostra estudada são o *NAT2*5B/6A* (16,2%), o *NAT2*4/5B* (15,2%), o *NAT2*4/6A* (10,1%) e o *NAT2*6A/6A* (10,1%). Os restantes genótipos apresentam baixas frequências (<10%). Não foi possível caracterizar dois indivíduos quanto ao seu genótipo de *NAT2*. Também não foi possível amplificar um indivíduo para *NAT2* daí que n seja igual a 99.

Tabela 3 – Frequências para os genótipos do gene *NAT2*. IND- genótipo não determinado.

Genótipo	n	Frequências (%)
<i>NAT2*4/4</i>	9	9,1
<i>NAT2*5B/5B</i>	25	25,3
<i>NAT2*6A/6A</i>	10	10,1
<i>NAT2*5B/6A</i>	16	16,2
<i>NAT2*4/6A</i>	10	10,1
<i>NAT2*4/5B</i>	15	15,2
<i>NAT2*5B/6C</i>	4	4,0
<i>NAT2*13A/14D</i>	1	1,0
<i>NAT2*5B/5C</i>	2	2,0
<i>NAT2*4/12A</i>	1	1,0
<i>NAT2*4/6C</i>	2	2,0
<i>NAT2*4/13A</i>	1	1,0
<i>NAT2*5B/5D</i>	1	1,0
IND	2	2,0
Total	99	100

Uma grande percentagem da amostra (58,6%) apresenta o fenótipo de acetilador lento, correspondendo aos genótipos *NAT2*5B/5B*, *NAT2*5B/6A*, *NAT2*5B/6C*, *NAT2*5B/5C*, *NAT2*5B/5D* ou *NAT2*6A/6A*, seja em homocigotia (dois haplótipos lentos iguais) seja em heterocigotia (dois haplótipos lentos diferentes). Cerca de 28,3% dos indivíduos exibem tanto um haplótipo rápido como um lento, podendo ser classificados como tendo um fenótipo de acetilador intermédio (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequências dos fenótipos de NAT2. Legenda: S- fenótipo lento, R- fenótipo rápido, I- fenótipo intermédio e IND- fenótipo não determinado.

Fenótipo n Frequências (%)		
S	58	58,6
R	11	11,1
I	28	28,3
IND	2	2,0
Total	99	100

3.3 Frequências de haplogrupos do mtDNA

Os haplogrupos encontrados nos indivíduos da amostra e as respectivas frequências encontram-se indicados na tabela 5. Dos 100 indivíduos da amostra, apenas para 96 indivíduos foi possível obter o haplogrupo a que pertenciam, para dois indivíduos não se conseguiu caracterizar o seu haplogrupo e para outros dois não foi possível amplificar a região HVS1, logo consideramos n=98.

Tabela 5 – Frequências dos haplogrupos do mtDNA. IND- haplogrupo não determinado.

Haplogrupos		n	Frequências (%)	
H (n=54)	H	44	44,9	55,1
	H1b	4	4,1	
	H1k	1	1,0	
	H5	5	5,1	
HV (n=8)	HV0	6	6,1	8,2
	HV6	1	1,0	
	HV7	1	1,0	
K (n=3)	K	2	2,0	3,1
	K1a	1	1,0	
L (n=2)	L2b1	1	1,0	2,0
	L3b	1	1,0	
M (n=1)	M1a1	1	1,0	1,0
T (n=10)	T1	2	2,0	10,2
	T2	1	1,0	
	T2b	6	6,1	
	T2e	1	1,0	
U (n=13)	U2e	1	1,0	13,3
	U4c1	1	1,0	
	U5	3	3,1	
	U5a	2	2,0	
	U5a1	1	1,0	
	U6a	2	2,0	
	U6b	2	2,0	
U8b	1	1,0		
X (n=3)	X	3	3,1	3,1
G (n=2)	G2b	2	2,0	2,0
IND (n=2)	IND	2	2,0	2,0
Total		98	100	100

Observa-se a predominância do haplogrupo H (presente em 44 dos 98 indivíduos testados). Para facilitar o tratamento dos dados, estes resultados foram agrupados nos haplogrupos mais gerais, conforme descritos na tabela 5, onde se indicam também as frequências obtidas. Mesmo depois de agrupados a proporção do haplogrupo H (n=54) não é muito aproximada à dos restantes haplogrupos.

3.4 Frequências da deleção 4977pb

Na amostra em estudo, a deleção 4977pb não foi encontrada em nenhum indivíduo da amostra. Após amplificação apenas se obteve o fragmento de 331pb, correspondente ao genoma sem deleção (figura 8).

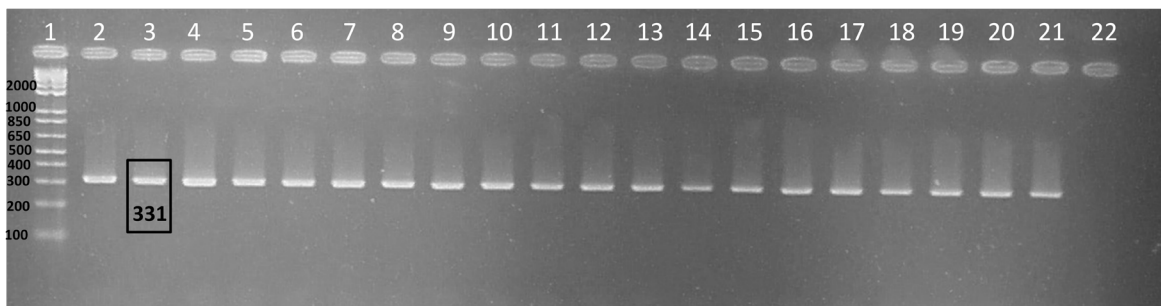


Figura 8 - Gel de agarose a 2% (p/v) corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV, para visualização dos DNAs amplificados por PCR multiplex para a deleção 4977pb (poços 2-21). A banda amplificada tem 331pb. No poço 22 está o controle negativo. No poço 1 encontra-se o marcador de massas moleculares 1Kb *plus ladder*. Os tamanhos das bandas indicadas estão em pb.

3.5 Comparação dos grupos dos melhores e dos piores ouvintes

Após o cálculo do *score* (definido no ponto 2.5) para cada indivíduo, escolheram-se os 34% melhores ouvintes e 34% piores ouvintes da amostra, o que corresponde a 32 indivíduos para cada um dos três grupos. Foram excluídos os 32% com os valores de *score* mais próximos ou iguais a zero. Toda a análise é feita pela comparação destes dois grupos entre si, não esquecendo que todos têm presbiacusia. Na figura 9 apresentam-se as frequências para os genótipos, haplótipos e fenótipos *NAT2* obtidos para cada grupo.

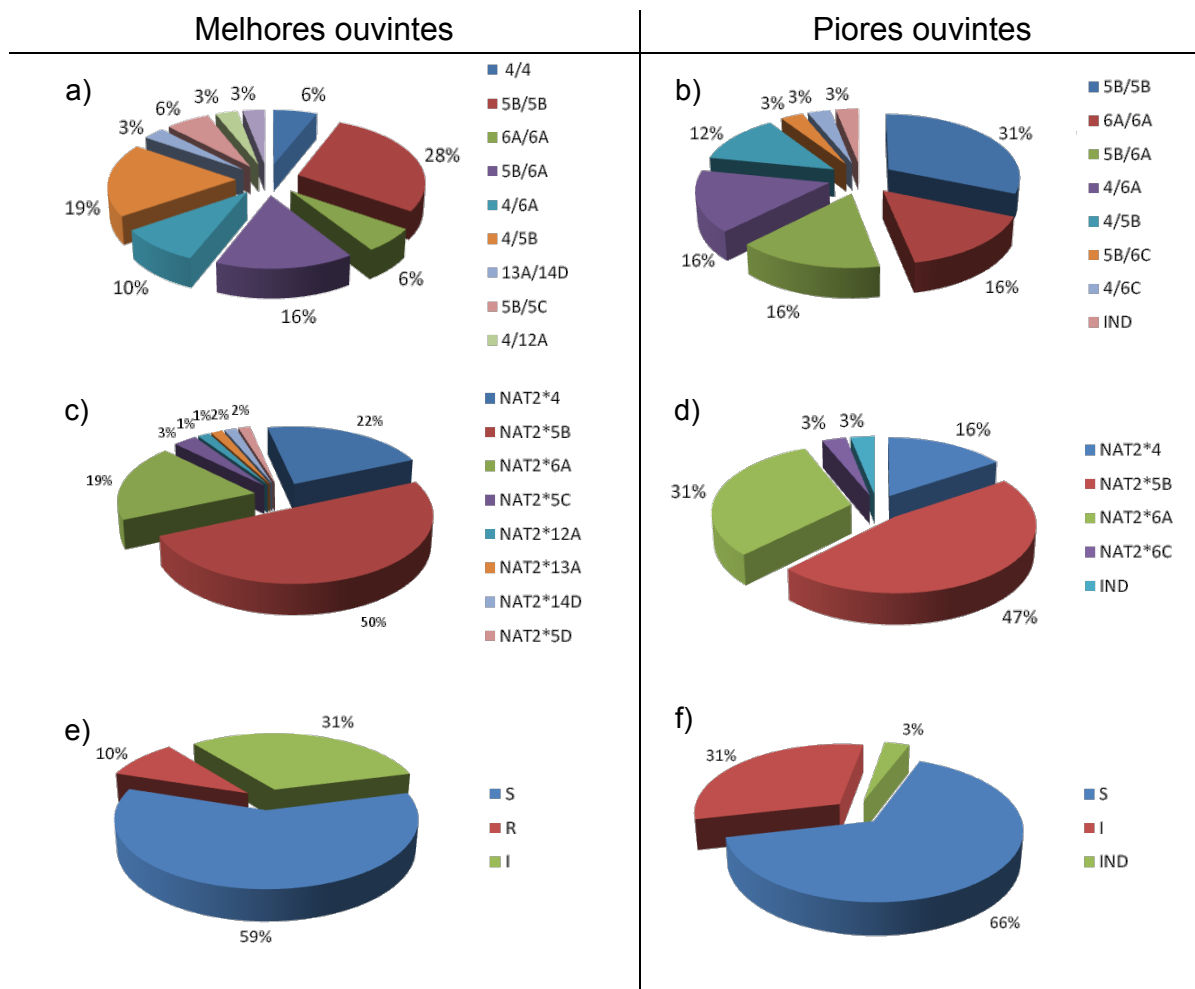


Figura 9 – Comparação das variantes obtidas para o gene *NAT2* nos grupos dos 34% melhores e 34% piores ouvintes. Apresentam-se as frequências para os genótipos no grupo melhor (a) e pior (b) ouvinte; para os haplótipos no grupo melhor (c) e pior (d); e para os fenótipos correspondentes no grupo melhor (e) e pior (f) ouvinte.

No grupo dos melhores ouvintes obtiveram-se 9 genótipos diferentes para o gene *NAT2* e no grupo dos piores ouvintes obtiveram-se 6 genótipos diferentes (figura 9a e 9b). Os vários genótipos obtidos correspondem a diferentes haplótipos (figura 9c e 9d) e fenótipos (figura 9e e 9f). Relativamente aos haplótipos, encontram-se 4 combinações no grupo dos piores ouvintes. Neste grupo há dois casos IND, porque estes indivíduos apresentavam uma combinação de SNPs no gene *NAT2* que não corresponde a nenhum dos haplótipos descritos. No grupo dos melhores ouvintes identificaram-se 7 haplótipos. Importa salientar que no grupo dos piores ouvintes há um maior número de indivíduos com o haplótipo *NAT2*6A* (n=20), em relação ao grupo dos melhores ouvintes (n=12). O haplótipo *NAT2*6C* só existe no grupo dos piores ouvintes. No grupo dos melhores ouvintes encontram-se também os haplótipos *NAT2*5C*, *NAT2*12A*, *NAT2*13A* e *NAT2*14B*. O fenótipo *NAT2* mais comum na amostra é o lento (S), correspondendo a 60% no grupo dos piores ouvintes e a 59% no grupo dos melhores ouvintes. No grupo dos piores ouvintes não se observou nenhum indivíduo com o fenótipo rápido (R), existindo 10% de casos no grupo

dos melhores ouvintes. Em ambos os grupos a proporção de fenótipos intermédios (I) é 31%. Os genótipos, haplótipos e fenótipos possuem valores de frequências semelhantes nos dois grupos considerados.

Relativamente à análise da região HVS1 (figura 10) verifica-se que o haplogrupo H é o mais comum nos dois grupos, estando presente em 59% dos casos no grupo dos piores ouvintes e em 66% dos indivíduos do grupo dos melhores ouvintes.

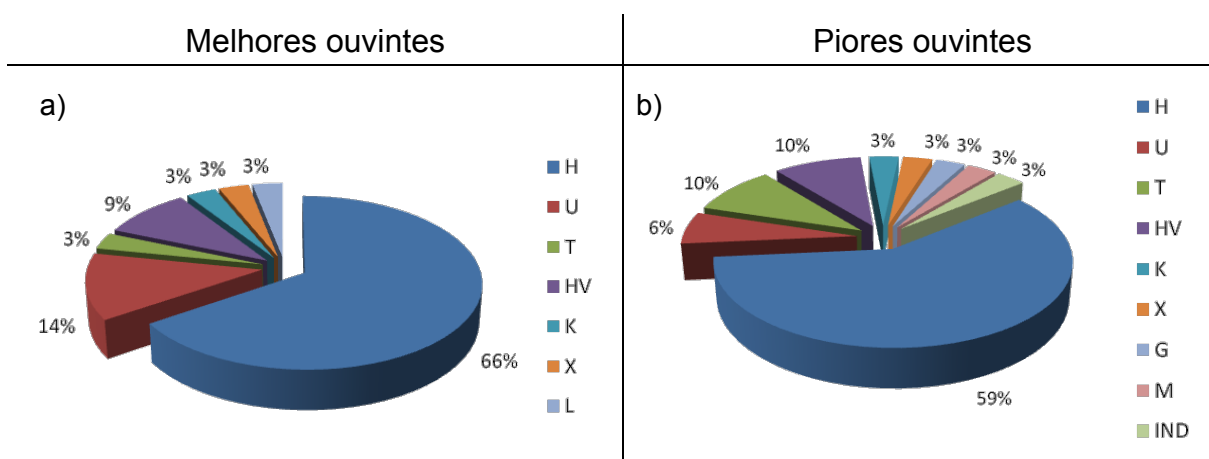


Figura 10 – Comparação das frequências de haplogrupos do mtDNA observadas nos grupos dos 34% melhores ouvintes (a) e 34% piores ouvintes (b).

No grupo dos piores ouvintes há 8 haplogrupos diferentes e um caso indeterminado (IND) pois apenas com os polimorfismos da região HVS1 não foi possível definir o haplogrupo deste indivíduo. No grupo dos melhores ouvintes há 7 haplogrupos diferentes. O haplogrupo L só aparece no grupo dos melhores ouvintes, os haplogrupos G e M só foram identificados no grupo dos piores ouvintes.

3.6 Testes de independência

Para verificar a existência de alguma associação estatisticamente significativa entre as variantes estudadas (genótipos, haplótipos e fenótipos do *NAT2*, e haplogrupos do mtDNA para a região HVS1) e a presença de presbiacusia grave, foi realizado o teste de independência do χ^2 . Cada variante estudada foi comparada entre os grupos de melhores e piores ouvintes, ou seja, a modelação foi feita considerando apenas as caudas (34% para cada lado). Não foram registadas diferenças significativas quanto aos genótipos, haplótipos e fenótipos entre os dois grupos comparados.

Não se encontrou qualquer diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos e os genótipos de *NAT2* mais representados na amostra, para um nível de significância $p < 0,05$: *NAT2*5B/5B* ($p=0,784396$); *NAT2*5B/6A* ($p=1$) e *NAT2*4/5B*

($p=0,491119$), Anexo B, tabela 6. Procurou-se também associar a presença dos haplótipos mais representados, *NAT2*5B* ($p=0,563305$), *NAT2*6A* ($p=0,341475$) e *NAT2*4* ($p=0,350772$) à pior audição, mas sem resultados significativamente diferentes, Anexo B, tabela 7. No teste de associação entre fenótipo lento e pior audição também não se registaram diferenças significativas ($p=0,605577$), Anexo B, tabela 8.

Fez-se a comparação do haplogrupo H, o mais frequente, com o conjunto de todos os outros haplogrupos (não H), que se encontram pouco representados nos dois grupos da amostra, e também não se encontrou qualquer diferença estatisticamente significativa ($p=0,605577$) entre os dois grupos, Anexo B, tabela 9.

Depois de feita a separação em grupos foi criada uma variável, que se designou por grave, e que tomou o valor 1 para os indivíduos com pior audição (os 34% com *score* mais elevado) e o valor 0 para os indivíduos com melhor audição (os 34% da amostra com valores mais baixos para o *score*). Esta é a variável desfecho considerada nos modelos de regressão logística. Para as mesmas características genéticas acima referidas não foi possível ajustar nenhum modelo, Anexo C.

4. Discussão

Este é o primeiro estudo sobre factores genéticos associados à presbiacúsia que se realiza em Portugal, tendo sido realizado no grupo de surdez hereditária do BioFIG (Centro para a Biodiversidade e Genómica Funcional e Integrativa), FCUL, no âmbito do Mestrado em Biologia Molecular Humana pretendendo ser um contributo para o estudo da etiologia genética da presbiacúsia em Portugal.

Os idosos são um grupo cada vez mais numeroso na população mundial, sendo o envelhecimento acompanhado por um conjunto de alterações fisiológicas como a presbiacúsia, que é a perda auditiva associada à idade. A amostra seleccionada para este estudo é composta por idosos com presbiacúsia e pode ser considerada como representativa da população idosa de Portugal pois apresenta a estrutura típica deste grupo [7], ou seja, tem mais mulheres relativamente a homens e tem uma média de idades mais elevada no grupo das mulheres. A idade máxima no grupo das mulheres (98 anos) também é superior à idade máxima no grupo dos homens (89 anos). Quanto às perdas auditivas observa-se que os homens têm maiores perdas nas altas frequências comparativamente às mulheres, ou seja, têm uma presbiacúsia mais acentuada, o que está de acordo com o descrito relativamente às perdas auditivas relacionadas com a idade [13].

Estão descritos vários factores que podem contribuir para o processo fisiológico do envelhecimento, sendo o stress oxidativo um dos mais relevantes [2]. O stress oxidativo causa uma acumulação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), o que aumenta a probabilidade da ocorrência de lesões no DNA mitocondrial. A enzima NAT2 tem um papel importante na defesa contra ROS, sendo que substituições nucleotídicas têm efeitos fenotípicos na actividade da enzima, aumentando ou reduzindo a sua função de acordo com a alteração do aminoácido. O haplótipo *NAT2*6A* já foi descrito como associado à presbiacúsia tendo sido descrito como um factor de susceptibilidade [2, 17] para esta condição. Também o haplogrupo mitocondrial tem sido associado à presbiacúsia como factor de risco [18]. Assim, a escolha dos marcadores genéticos estudados baseou-se em estudos similares que apontavam para a influência de determinados polimorfismos na presbiacúsia.

Ao comparar as medianas dos valores de perda auditiva obtidas para a amostra com as medianas da ISO 7029 verificou-se que na nossa amostra os valores de perda auditiva apresentavam-se sempre abaixo dos valores de perda auditiva da mediana considerada padrão para a população Europeia (Anexo D). Várias explicações podem ser consideradas para este facto, como por exemplo, o não ser possível saber quantos indivíduos portugueses foram incluídos na amostra Europeia que esteve na base da definição da ISO 7029. Do mesmo modo, não podemos excluir um possível efeito da dimensão da nossa amostra. Assim, e dado que a amostra seleccionada obedeceu aos mesmos critérios de inclusão que a amostra seleccionada para a ISO 7029 (sem perdas auditivas nem doenças

auditivas, sem cerúmen, sem historial familiar de perdas nem exposição a ruído profissional, por exemplo) considerámos que não podemos comparar os dados obtidos com os indicados na ISO 7029. Calculámos então, a mediana da nossa própria amostra, considerando as diferentes frequências, faixas etárias e géneros presentes na amostra deste estudo. Isto permitiu que se pudesse retirar o efeito da idade e do sexo subtraindo aos valores de perda auditiva de cada indivíduo da amostra os valores da respectiva mediana, para cada frequência medida. Deste modo, foi possível agrupar todos os indivíduos da amostra num só grupo independente das classes, e compará-los a todos, aumentando o número total de indivíduos a usar no tratamento de dados. A média das diferenças obtidas dá-nos um *score* único para cada indivíduo que permite dividir a amostra em três grupos: os 34% piores ouvintes, os 34% melhores e aqueles (32%) com valores de *score* próximos dos valores da mediana. Estes últimos foram excluídos e foi assim que ficámos com dois grupos comparáveis entre si, os que ouvem melhor e os que ouvem pior no total da amostra com presbiacúsia considerada neste estudo.

Os padrões das variantes observadas para o gene *NAT2* nesta amostra são consistentes com o que está descrito para a população Europeia, no geral [20]. Os haplótipos *NAT2*4* (23,7%), *NAT2*5B* (44,4%) e *NAT2*6A* (23,2%) são os mais comuns, na nossa amostra. O haplótipo *NAT2*7* (definido pela variante G857A) não foi encontrado na amostra, conforme esperado, pois este haplótipo encontra-se maioritariamente nas populações da Ásia e da América Central, tendo frequências muito baixas na Europa [20]. O haplótipo *NAT2*14* (definido pela variante G191A), apenas reportado nas populações Subsarianas, foi encontrado num indivíduo, em heterozigotia, o que pode ser explicado pela sua ancestralidade Africana (Angola) [20]. Nesta perspectiva, este é um dado novo que contribui para o melhor conhecimento genético da população portuguesa para estes locais do genoma.

A maioria ($\cong 58\%$) dos haplótipos identificados conferem um fenótipo de acetilação lenta, tendo sido verificados tanto em homozigotia como em heterozigotia, o que mais uma vez está em concordância com o descrito para a população Europeia [20]. No entanto, apesar de não existirem diferenças significativas ($p > 0,05$) é possível identificar diferentes distribuições nos fenótipos associados ao gene *NAT2*, entre o grupo dos melhores e dos piores ouvintes da amostra. Apenas no grupo dos piores ouvintes se encontra o fenótipo rápido (10%) estando os fenótipos intermédio e lento igualmente distribuídos entre os dois grupos. Como já referido, os haplótipos mais frequentes foram o *NAT2*5B* e o *NAT2*6A*, que dão origem a substituições aminoacídicas que levam a que a enzima tenha uma actividade mais reduzida, estando portanto associados a fenótipos lentos. Também os genótipos mais frequentes são constituídos por combinações de haplótipos lentos, ou de um haplótipo lento com um rápido [*NAT2*5B/5B* (25,3%), *NAT2*5B/6A* (16,2%), *NAT2*4/5B*

(15,2%), *NAT2*4/6A* (10,1%) e *NAT2*6A/6A* (10,1%). Igualmente comum é o haplótipo *NAT2*4* que corresponde à sequência de referência [20], e que no grupo dos piores ouvintes é encontrado apenas em heterozigotia existindo em homozigotia no grupo dos melhores ouvintes.

Os haplogrupos do DNA mitocondrial encontrados nos indivíduos da amostra estão de acordo com o previamente descrito tanto para a população Portuguesa como para a população Europeia, em geral. Os haplogrupos mais comuns na Europa (H, U, T, HV, K, X, G e M) [27] foram encontrados também na amostra do nosso estudo. Os haplogrupos L e U6, encontrados em oito indivíduos, justificam-se, possivelmente, pela forte influência Africana que existe em Portugal [27], à semelhança do observado para os genótipos de *NAT2*. Os haplogrupos U6 e L são característicos das populações Africanas, e o haplogrupo U6 nunca foi descrito no resto da Europa, sendo este resultado um dado original deste estudo piloto [27]. No grupo dos piores ouvintes há 8 haplogrupos diferentes enquanto no grupo dos melhores ouvintes há 7, evidenciando a grande semelhança entre estes dois grupos. No entanto, há que referir que o haplogrupo L só é observado no grupo dos melhores ouvintes enquanto os haplogrupos G e M só foram identificados no grupo dos piores ouvintes.

A deleção mitocondrial 4977pb não foi encontrada nesta amostra, ainda que esteja descrita como ocorrendo em pessoas com pior audição [5, 6]. No entanto, os nossos resultados estão de acordo com estudos realizados na população Brasileira em que também não foi identificada a presença desta deleção em indivíduos com presbiacúsia [28]. Várias explicações podem ser consideradas, a primeira das quais poderá ser a reduzida dimensão de ambas as amostras (n=100). Por outro lado, em ambos os estudos a técnica de extracção de DNA usada foi a mesma (a partir de sangue periférico) o que pode querer dizer que este não será o melhor método para pesquisar mutações no DNA mitocondrial relacionadas com a presbiacúsia. As mitocôndrias extraídas do sangue total poderão não pertencer à mesma população de mitocôndrias existente nos tecidos da cóclea, não estando expostas ao mesmo nível de agentes oxidativos e não apresentando por isso as mesmas mutações. De facto, a associação entre esta deleção e a presbiacúsia foi mostrada usando DNA extraído a partir de tecidos da cóclea de indivíduos já falecidos, com historial clínico de presbiacúsia [29].

Apesar das frequências encontradas para o gene *NAT2* e para os haplogrupos do mtDNA serem semelhantes às descritas para o resto da Europa, não se conseguiu demonstrar qualquer associação significativa com a presbiacúsia. Dado existirem muitas classes para cada variante estudada (13 para os genótipos de *NAT2* e 26 para os haplogrupos do mtDNA, que mesmo depois de agrupados nos grupos mais gerais continuam com 9 classes) e dado o tamanho da amostra, as classes menos representadas

ficam com dimensões muito reduzidas ($n=1$ ou 2), o que impede a realização de um teste estatístico com significância. Nos haplogrupos do mtDNA, mesmo quando se tentou agrupar as classes menos representadas numa só (não H) e comparando-a com a classe mais representada (H), continua a não haver associação com a melhor ou a pior audição dos indivíduos com presbiacúsia.

Gostaríamos de salientar o facto de, num único ano lectivo ter sido possível seleccionar (aplicando os critérios de inclusão e a avaliação audiológica) e avaliar geneticamente 100 indivíduos com presbiacúsia da população idosa Portuguesa. Isto envolveu um contacto directo com diferentes lares de idosos e centros de dia, e também o auxílio de Serviços de ORL de Hospitais de Lisboa e Coimbra. Os resultados preliminares obtidos neste estudo apontam algumas características próprias de cada grupo de indivíduos, melhores e piores ouvintes, no entanto, não é possível obter conclusões significativas sobre o efeito das variantes genéticas consideradas e a presbiacúsia.

Em estudos futuros deverá incluir-se uma amostra controlo da população idosa sem presbiacúsia, de modo a melhor verificar a existência ou não de possíveis associações entre as variantes encontradas e a presbiacúsia, ainda que seja muito difícil encontrar idosos sem presbiacúsia, dado tratar-se de uma condição fisiológica comum. Deverá também incluir-se um maior número de indivíduos para aumentar a dimensão da amostra estudada.

5. Referências bibliográficas

- [1] Viljanen, A., Kaprio, J., Pyykko, I., Sorri, M., Kauppinen, M., Koskenvuo, M. & Rantanen, T. (2007) Genetic and environmental influences on hearing at different frequencies separately for the better and worse hearing ear in older women. *International Journal of Audiology* 46:772-779
- [2] Eyken, E.V., Camp, G.V., Fransen, E., Topsakal, V., Hendrickx, J.J., Demeester, K., Heyning, P.V., Maäki-Torkko, E., Hannula, S., Sorri, M., Jensen, M., Parving, A., Bille, M., Baur, M., Pfister, M., Bonaconsa, A., Mazzoli, M., Orzan, E., Espeso, A., Stephens, D., Verbruggen, K., Huyghe, J., Dhooge, I., Huygen, P., Kremer, H., Cremers, C.W.R.J., Kunst, S., Manninen, M., Pyykko, I., Lacava, A., Steffens, M., Wienker, T.F. & Van Laer, L. (2007) Contribution of the N-acetyltransferase 2 polymorphism NAT2*6A to age-related hearing impairment. *J Med Genet* 44:570–578
- [3] Liu, X.Z. & Yan, D. (2007) Ageing and hearing loss. *Journal of Pathology* 211: 188–197
- [4] Veras, R. P. & Mattos, L. C. (2007) Audiology and Aging: literature review and current horizons. *Rev Bras Otorrinolaringol* 73(1): 128-34
- [5] Baraldi, G. S., Almeida, L. C. & Borges, A. C. C. (2007) Hearing loss in aging. *Rev Bras Otorrinolaringol* 73(1):64-70
- [6] Seidman, M.D., Ahmad, N., Joshi, D., Seidman, J., Thawani, S. & Quirk, W.S. (2004) Age-related Hearing Loss and its Association with Reactive Oxygen Species and Mitochondrial DNA damage. *Acta Otolaryngol Suppl* 552: 16-24
- [7] INE- 2007/2008- Estimativas de população residente
- [8] Friedman, T.B. & Griffith, A.J. (2003) Human Nonsyndromic Sensorineural Deafness. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 4:341–402
- [9] Willems, P. J. (2000) Genetic Causes Of Hearing Loss. *Mechanisms Of Disease* 342(15): 1101-1109
- [10] Petit, C., Levilliers, J. & Hardelin, J. (2001) Molecular genetics of hearing loss. *Annu. Rev. Genet.* 35:586-646
- [11] Tang, L.S., Montemayor, C. & Pereira, F.A. (2006) Sensorineural Hearing Loss: Potential Therapies and Gene Targets for Drug Development. *Life* 58(9): 525 – 530
- [12] Tsnosis, P.A. (2007) Regeneration via transdifferentiation: the lens and hair cells. *Hearing research* 227:28-31
- [13] Eyken, E.V., Camp, G.V. & Laer, L.V. (2007) The Complexity of Age-Related Hearing Impairment: Contributing Environmental and Genetic Factors. *Audiol Neurotol* 12: 345-358
- [14] Fischel-Ghodsian, N., Bykhovskaya, Y., Taylor, K., Kahen, T., Cantor, R., Ehrenman, K., Smith, R. & Keithley, E. (1997) Temporal bone analysis of patients with presbycusis reveals high frequency of mitochondrial mutations. *Hearing research* 110:147-154
- [15] Eyken, E. V., Laer, L. V., Fransen, E., Topsakal, V., Lemkens, N., Laureys, W., Nelissen, N., Vandeveld, A., Wienker, T., Heyning, P. V. D. & Camp, G. V. (2006) KCNQ4: A Gene for Age-Related Hearing Impairment? *HUMAN MUTATION* 27(10):1007-1016
- [16] Trincão, C., Rodrigues, A., Teixeira, H., Matos, T., Caria, H., Fialho, G. (2006) Contribution of *GJB2* to Hearing Loss in the Portuguese Population. *Proceedings 43rd Inner Ear Biology Workshop* Montpellier, France
- [17] Unal, M., Tamer, L., Dogruer, Z. N., Yildirim, H., Vayisoglu, Y., Camdeviren, H. (2005) N-Acetyltransferase 2 Gene Polymorphism and Presbycusis. *Laryngoscope* 115:2238–2241
- [18] Manwaring, N., Jones, M.M., Wang, J.J., Rochtchina, E., Howard, C., Newall, P., Mitchell, P. & Sue, C.M. (2007) Mitochondrial DNA haplogroups and age-related hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 133(9): 929-33
- [19] Hein, D.W., Doll, M.A., Fretland, A.J., Leff, M.A., Webb, S.J., Xiao, G.H., Devanaboyina, U., Nangju, N.A. & Feng, Y. (2000) Molecular Genetics and Epidemiology of the *NAT1*

- and *NAT2* Acetylation Polymorphisms. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9: 29–42
- [20] Sabbagh, A., Langaney, A., Darlu, P., Gérard, N., Krishnamoorthy, R., Poloni, E.S. (2008) Worldwide distribution of *NAT2* diversity: Implications for *NAT2* evolutionary history. *BMC Genet* 9:21
- [21] Raule, N., Sevini, F., Santoro, A., Altiglia, S., Franceschi, C. (2007) Association studies on human mitochondrial DNA: Methodological aspects and results in the most common age-related diseases. *Mitochondrion* 7:29–38
- [22] [http://www.worldfamilies.net/files/image/migration_map_wfn\(1\).gif](http://www.worldfamilies.net/files/image/migration_map_wfn(1).gif)
- [23] Oven, M. V. & Kayser, M. (2008) Updated Comprehensive Phylogenetic Tree of Global Human Mitochondrial DNA Variation. *HUMAN MUTATION* 29:E386-E394
- [24] Ieremiadou, F. & Rodakis, G. C. (2009) Correlation of the 4977 bp mitochondrial DNA deletion with human sperm dysfunction. *BMC Research Notes* 2:18
- [25] <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>
- [26] Lee, H. Y., Song, I., Ha, E., Cho, S., Yang, W. I. & Shin, K. (2008) mtDNAmanager: a Web-based tool for the management and quality analysis of mitochondrial DNA control-region sequences. *BMC Bioinformatics* 9:483
- [27] Pereira, L., Prata, M. J. & Amorim, A. (2000) Diversity of mtDNA lineages in Portugal: not a genetic edge of European variation. *Ann. Hum. Genet.* 64:491-506
- [28] Piatto, V. B., Pereira, M. C., da Silva, M. A. O. M. & Maniglia, J. V. (2009) Tracking of the genetic deafness associated to the aging in Brazilian patients. *Neurobiology of Aging* 30:1173–1174
- [29] Markaryan, A., Nelson, E. G., Hinojosa, R. (2009) Quantification of the Mitochondrial DNA Common Deletion in Presbycusis. *The Laryngoscope* 119:1184–1189

6. Anexos

ANEXO A

Inquérito realizado a todos os indivíduos que participaram no estudo de Presbiacúsia.

Estudo de Presbiacúsia em Portugal

Código dador: _____

Idade: _____ Data nascimento: _____

Estado civil: Solteiro Casado Divorciado Viúvo

Profissão: _____

1. **Portadores de Surdez** Sim Não

Excluir os indivíduos com:

- Síndrome de Menière (mesmo que seja só suspeita)
- Tumores no VIII nervo
- Síndrome de Ramsay Hunt
- Surdez pós-meningite
- Surdez súbita
- Surdez genética (otosclerose e outras)
- Surdez profissional
- Surdez pós-aminoglicósidos

Podem incluir-se os casos de surdez de condução, surdez unilateral, surdez assimétrica, desde que sejam devidas a factores não genéticos.

2. **Portadores de doenças Cardíacas** Sim Não

Excluir os indivíduos com:

- Transplante cardíaco
- Síndrome de QT Longo
- Cirurgias nas carótidas
- AVC

3. **Portadores de doenças Hormonais** Sim Não

Excluir todos os casos **excepto** diabetes (tipo I e II), hipo- ou hipertiroidismo, hiperparatiroidismo

4. **Portadores de doenças Metabólicas** Sim Não

Incluir todas, **excepto** insuficiência crónica renal

5. **Portadores de doenças Autoimunes** Sim Não

Excluir todas, **excepto** gota e artrite reumatóide (se não for tratada com citostáticos)

6. **Portadores de Neoplasias** Sim Não

Excluir todos os casos relacionados com cabeça e pescoço; excluir também os que tenham feito quimioterapia ou radioterapia na cabeça

7. **Portadores de doenças Neurológicas** Sim Não
Excluir todos os casos, excepto epilepsia e enxaquecas

8. **Portadores de doenças Psiquiátricas** Sim Não
Excluir só os casos severos em que tenha ocorrido hospitalização

9. **Portadores de doenças Pulmonares** Sim Não
Excluir os indivíduos com:

- Fibrose pulmonar idiopática
- Fibrose quística
- Sarcoidose (caso afecte os ouvidos)

10. **Portadores de doenças Hematológicas** Sim Não
Excluir apenas os casos em que tenha ocorrido tratamento com ototóxicos

11. **Portadores de doenças Infecciosas** Sim Não
Excluir os indivíduos com:

- SIDA
- Sífilis
- Tuberculose (quando tratada com estreptomina)
- Meningite
- Herpes Zoster (caso envolva o ouvido)

12. **Outros** Sim Não

Excluir os indivíduos com:

- Qualquer síndrome congénito (incluindo Trissomia 21, etc.)
- Qualquer doença grave considerada incapacitante

13. Características da Perda Auditiva

OE: Sim Não

OD: Sim Não

Nota: **Anexar cópia do audiograma e amostra de sangue (cartão FTA ou tubo seco com EDTA)**

ANEXO B

Resultados obtidos para o teste χ^2 . Comparação entre os genótipos (tabela 6), entre os haplótipos (tabela 7) e entre o fenótipo lento (S – tabela 8) para os dois grupos, melhores e piores ouvintes. O teste só foi realizado para as características genéticas mais frequentes na amostra.

Tabela 6 – Resultados do teste de independência do χ^2 para os genótipos de NAT2 e os dois grupos da amostra, melhores e piores ouvintes.

Genótipos	Valor Q	Graus de liberdade	<i>p-value</i>
NAT2*5B/5B	0,074854	1	0,784396
NAT2*5B/6A	0	1	1
NAT2*4*5B	0,474074	1	0,491119

Tabela 7 - Resultados do teste de independência do χ^2 para os haplótipos de NAT2 e os dois grupos da amostra, melhores e piores ouvintes.

Haplótipos	Valor Q	Graus de liberdade	<i>p-value</i>
NAT2*4	2,095238	2	0,350772
NAT2*5B	1,14787	2	0,563305
NAT2*6A	2,148962	2	0,341475

Tabela 8 - Resultados do teste de independência do χ^2 para o fenótipo NAT2 lento e os dois grupos da amostra, melhores e piores ouvintes.

Fenótipo	Valor Q	Graus de liberdade	<i>p-value</i>
S	0,266667	1	0,605577

Resultados obtidos para o teste χ^2 . Comparação entre o haplogrupo H (tabela 9) e os dois grupos, melhores e piores ouvintes.

Tabela 9 - Resultados do teste de independência do χ^2 para o haplogrupo H do mtDNA e os dois grupos da amostra, melhores e piores ouvintes.

Haplogrupo	Valor Q	Graus de liberdade	<i>p-value</i>
H	0,266667	1	0,605577

ANEXO C

Resultado dos modelos de regressão logística onde se procurou avaliar a associação entre a presença de alguns genótipos (tabela 10), haplótipos (tabela 11) e fenótipo lento (tabela 12) com o pertencer a um dos grupos de ouvintes (melhores e piores). Apenas se mostram os resultados para as características genéticas mais frequentes na amostra.

Tabela 10 - Resultado da análise de regressão logística para os genótipos de NAT2.

Genótipo	Coeficiente	Erro padrão	Valor Z	<i>p-value</i>
<i>NAT2*5B/5B</i>	0.8938	1.3046	0.685	0.493
<i>NAT2*5B/6A</i>	0.6931	1.3784	0.503	0.615
<i>NAT2*4/5B</i>	0.2877	1.3844	0.208	0.835

Tabela 11 - Resultado da análise de regressão logística para os haplótipos de NAT2.

Haplótipo	Coeficiente	Erro padrão	Valor Z	<i>p-value</i>
<i>NAT2*4</i>	-0.176950	0.601799	-0.294	0.769
<i>NAT2*5B</i>	-0.148605	0.697889	-0.213	0.831
<i>NAT2*6A</i>	0.466177	0.607895	0.767	0.443

Tabela 12 - Resultado da análise de regressão logística para o fenótipo NAT2 lento.

Fenótipo	Coeficiente	Erro padrão	Valor Z	<i>p-value</i>
S	1.001e-01	5.480e-01	0.183	0.855

Resultado do modelo de regressão logística onde se procurou avaliar a associação entre a presença do haplogrupo H do mtDNA (tabela 13) com o pertencer a um dos grupos de ouvintes (melhores e piores).

Tabela 13 - Resultado da análise de regressão logística para o haplogrupo H do mtDNA.

Haplogrupo	Coeficiente	Erro padrão	Valor Z	<i>p-value</i>
H	-1.657e+01	2.400e+03	-0.007	0.994

ANEXO D

Comparação das medianas de perdas auditivas calculadas para a nossa amostra com as medianas da ISO 7029.

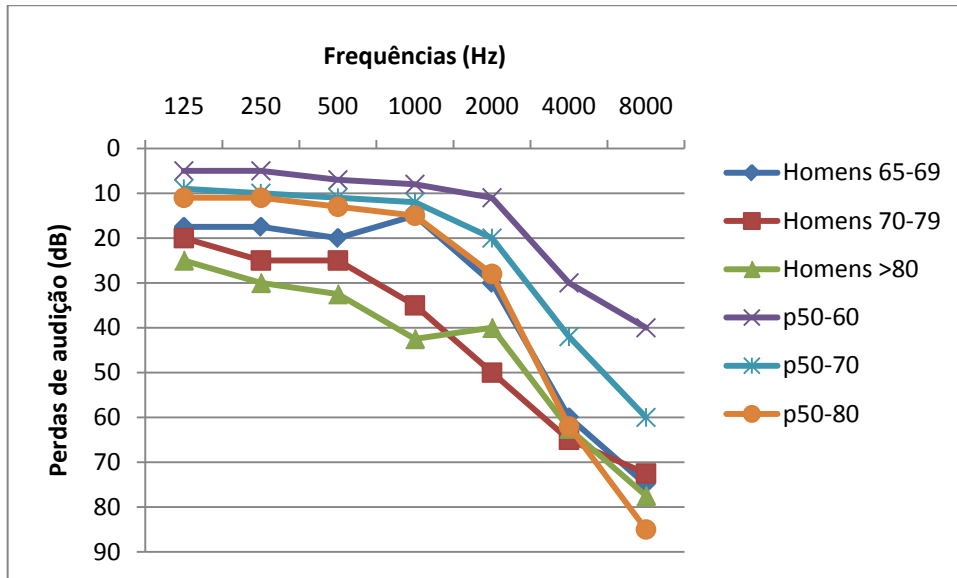


Figura 11 – Comparação das medianas de perdas auditivas da amostra com as medianas da ISO 7029, para os homens. Estão indicados os valores das medianas das perdas de audição da amostra para as classes: Homens (65-69 anos), Homens (70-79 anos) e Homens (>80 anos). Estão indicados os valores normais de audição de acordo com a ISO 7029 para homens dos 60-69 anos (p50-60), dos 70-79 anos (p50-70) e >80 anos (p50-80). No eixo das abcissas (OX) encontram-se as frequências (Hz) e no eixo das ordenadas (OY) os valores para o limiar de audição (dB).

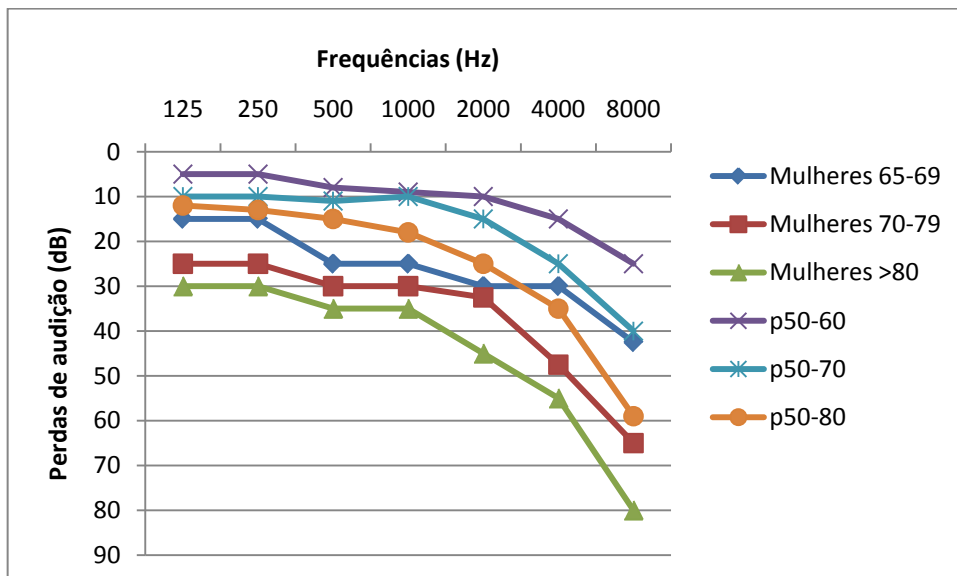


Figura 12 - Comparação das medianas de perdas auditivas da amostra com as medianas da ISO 7029, para as mulheres. Estão indicados os valores das medianas das perdas de audição da amostra para as classes: Mulheres (65-69 anos), Mulheres (70-79 anos) e Mulheres (>80 anos). Estão indicados os valores normais de audição de acordo com a ISO 7029 para mulheres dos 60-69 anos (p50-60), dos 70-79 anos (p50-70) e >80 anos (p50-80). No eixo das abcissas (OX) encontram-se as frequências (Hz) e no eixo das ordenadas (OY) os valores para o limiar de audição (dB).