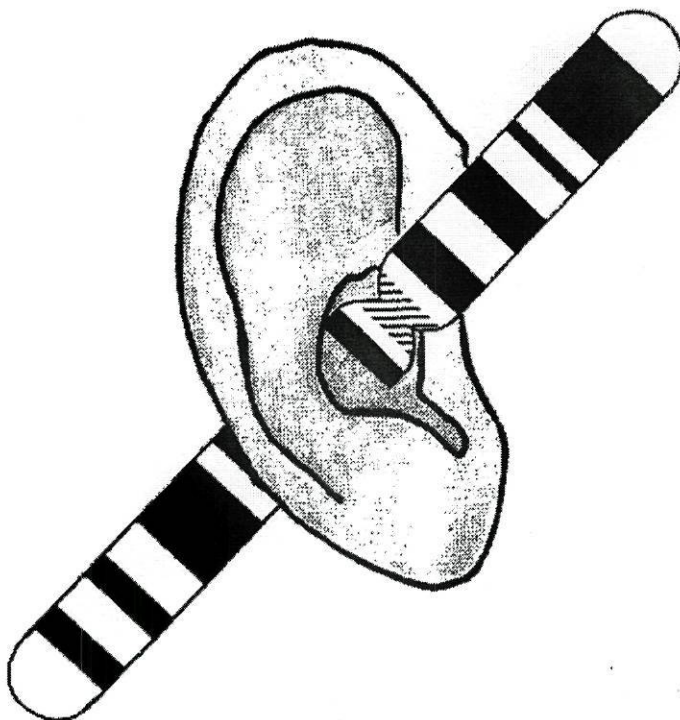


UNIVERSIDADE DO PORTO

FACULDADE DE MEDICINA

Mestrado em Medicina Molecular

**Caracterização Molecular de crianças com
Surdez Neurosensorial avaliadas no
Hospital Senhora da Oliveira – Guimarães**



**ANA PAULA DIAS FERNANDES
2004**

INDICE GERAL

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	SURDEZ	8
1.2	MECANISMOS NORMAIS DA AUDIÇÃO	9
1.3	CLASSIFICAÇÃO DA SURDEZ	13
1.4	DIAGNÓSTICO DA SURDEZ	15
1.5	CAUSAS DE SURDEZ	17
1.5.1	SURDEZ NÃO GENÉTICA	17
1.5.2	SURDEZ GENÉTICA	18
1.5.2.1	Genes implicados na surdez	18
1.5.2.1.1	Genes dos Canais Iónicos	19
1.5.2.1.2	Genes das Proteínas do Citoesqueleto	23
1.5.2.1.3	Genes das Proteínas Extracelulares	26
1.5.2.1.4	Genes de Factores de Transcrição	28
1.5.2.1.5	Genes de Proteínas Adicionais	29
1.5.2.1.6	Genes Mitocondriais	30
1.5.3	SURDEZ NÃO SINDRÓMICA	33
1.5.4	SURDEZ SINDRÓMICA	35
1.5.4.1	Autossómica Dominante	35
1.5.4.2	Autossómica Recessiva	38
1.5.4.3	Ligada ao X	40
1.5.4.4	Mitocondrial	43
2	OBJECTIVOS	44
3	MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1	DOENTES	45
3.2	ESTUDO	45
3.3	TÉCNICAS PARA ESTUDO MOLECULAR	46
3.3.1	EXTRACÇÃO DO DNA	46
3.3.2	PCR	46
3.3.3	SEQUENCIAÇÃO AUTOMÁTICA	47
3.4	PCR-RFLP PARA A DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES MITOCONDRIAIS ASSOCIADAS À SURDEZ NEUROSENSORIAL – A1555G E T1095C E A3243G	49
3.4.1	PCR	49
3.4.2	DIGESTÃO E ELECTROFORESE	50
3.4.3	COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	ASPECTOS CLÍNICOS	54
4.2	ASPECTOS LABORATORIAIS	56
4.3	DISCUSSÃO	56

5 CONCLUSÃO.....59

INDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Classificação da Surdez ²⁶	14
Tabela 1.2 Causas da Surdez	17
Tabela 1.3 Manifestações clínicas e genética molecular dos genes que causam Surdez Não Sindrômica Autossômica Dominante	33
Tabela 1.4 Manifestações clínicas e genética molecular dos genes que causam Surdez Não Sindrômica Autossômica Recessiva	34
Tabela 1.5 Manifestações clínicas e genética molecular dos genes que causam Surdez Não Sindrômica Ligada ao X	35
Tabela 1.6 Surdez Não Sindrômica Mitocondrial	35
Tabela 1.7 Síndrome de Waardenburg (SW)	36
Tabela 1.8 Síndrome Branqui-oto-renal (BOR) e Branquio-ótico (BOS)	37
Tabela 1.9 Síndrome Stickler (STL)	37
Tabela 1.10 Síndrome Usher (USH)	39
Tabela 1.11 Síndrome Jervell e Lange-Nielsen (SJLN)	40
Tabela 1.12 Síndrome Alport	41
Tabela 1.13 Surdez Sindrômica	42
Tabela 1.14 Surdez Sindrômica Mitocondrial	43
Tabela 3.1 Sequência nucleotídica dos primers utilizados na amplificação dos fragmentos do gene da Conexina 26 e do tRNA ^{Ser}	46
Tabela 3.2 Condições de PCR utilizadas na amplificação do fragmento que contém a mutação 35delG no gene da conexina 26	47
Tabela 3.3 Condições de PCR utilizadas na amplificação do fragmento que contém as mutações 7472insC, T7510C e T7511C no gene do tRNA ^{Ser}	47
Tabela 3.4 Sequência nucleotídica dos primers utilizados na amplificação dos fragmentos que contém os nucleótidos 1555, 1095 e 3243	49
Tabela 3.5 Condições de PCR utilizadas na amplificação do fragmento que contém o nucleótido 1555	49
Tabela 3.6 Condições de PCR utilizadas na amplificação do fragmento que contém o nucleótido 1095	50
Tabela 3.7 Condições de PCR utilizadas na amplificação do fragmento que contém o nucleótido 3243	50
Tabela 3.8 Apresentação das condições de digestão da PCR	51
Tabela 3.9 Preparação do Gel de Acrilamida a 12%	51
Tabela 3.10 Etapas para a coloração com Nitrato de Prata com agitação	52
Tabela 4.1 Caracterização Epidemiológica das Crianças estudadas	54
Tabela 4.2 Caracterização da Surdez Neurosensorial	54
Tabela 4.3 Antecedentes Pessoais das Crianças estudadas	55
Tabela 4.4 Antecedentes Familiares	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Esquema do Ouvido Externo, Médio e Interno. Retirado de N Eng J Med 2000; 342 (15): 1101.	10
Figura 1-2 A Cóclea. Retirado de N Eng J Med 2000; 342 (15): 1102	11
Figura 1-3 Célula Ciliada Externa com os estereocílios conectados por ligações nas extremidades. Retirado de N Eng J Med 2000; 342 (15): 1103.....	12
Figura 1-4 Causas de Surdez Pré – Lingual ²⁹	15
Figura 1-5 Genoma mitocondrial	31

RESUMO

Objectivos: Caracterização clínica da população pediátrica com surdez neurosensorial avaliada na Consulta de Otorrinolaringologia do Hospital Senhora da Oliveira – Guimarães até Janeiro de 2004; pesquisa, nos casos de surdez não síndrómica, das mutações mais comuns ligadas à surdez neurosensorial e pesquisa de infecção congénita por citomegalovirus. **Material e Métodos:** Observadas cinco entre os dois e 11 anos, sendo apenas uma do sexo feminino. Foi obtida uma história clínica completa e um exame objectivo cuidado para despiste de sinais sugestivos de surdez síndrómica. Os estudos complementares efectuados ajudaram na exclusão de uma causa síndrómica de surdez. Posteriormente, foi feita a pesquisa das mutações, associadas à surdez neurosensorial, mais frequentes, no DNA mitocondrial (rRNA12S – A1555G, T1095; tRNA^{Leu(UUR)} - A3243; tRNA^{Ser(UNC)} – A7445G, 7472insC, T7511C, T7510C) e nuclear (gene da conexina 26 35delG) por técnicas de Biologia Molecular. **Resultados:** As crianças apresentavam surdez pré-lingual, grave em dois casos e moderadamente grave nos restantes. Três crianças tinham risco perinatal para surdez. Uma criança com primo em primeiro grau surdo (ex-prematuro). Nenhuma criança apresentou estigmas de surdez síndrómica. A pesquisa das mutações mais frequentes foi negativa em todas as crianças. Em um caso foi identificada infecção congénita por citomegalovirus. **Conclusões:** Este estudo, apesar do número escasso de crianças, revela a contribuição na etiologia das surdez, das causas ambientais (um caso de infecção congénita por citomegalovirus). Contudo, a pesquisa sistemática das mutações no gene da conexina 26 assume um papel importante dada a sua associação a formas isoladas de surdez e a uma elevada prevalência em várias populações estudadas. As mutações no DNA mitocondrial, particularmente a A1555G no rRNA12S, estão igualmente associadas a formas isoladas de surdez e a associação desta mutação com surdez induzida por aminoglicosídeos, tem uma aplicação médica imediata na prevenção do uso futuro desses antibióticos.

SUMMARY

Purposes: Clinical characterization of pediatric population with neurosensorial deafness evaluated at Otorrhinolaringology Department of Senhora da Oliveira Hospital (Guimarães) until January 2004; search, in children with non-syndromic deafness, of most common mutations associated with neurosensorial deafness and search of cytomegalovirus congenital infection. **Material and Methods:** Five children examined, had ages between two and 11 years old and only one was female. A complete clinical history and physical examination was obtained to exclude syndromic deafness. Complementary laboratorial and imagiologic exams were done to exclude syndromic causes of deafness. Subsequently most frequent mutations, associated with neurosensorial deafness, were searched at mitochondrial DNA (rRNA12S – A1555G, T1095; tRNA^{Leu(UUR)} - A3243; tRNA^{Ser(UNC)} – A7445G, 7472insC, T7511C, T7510C) and nuclear DNA (connexin 26 gene mutation 35delG) using Molecular Biology Thecnics. **Results:** All children had pre-lingual deafness, severe in two cases and moderate-severe in the other cases. Three children had perinatal risk of deafness. A child had a deaf first cousin (ex-premature). No mutations were find. In one children was identified a cytomegalovirus congenital infection. **Conclusions:** This study has few number of cases, but it shows the importance of ambiencial causes in deafness etiology (one case of cytomegalovirus congenital infection). Although, systematic seach of connexin mutations have an important role, because are associated with isolated forms of deafness and they are very prevalent in many studied populations. Mutations at mithochondrial DNA, particularly A1555G on rRNA12S, are also linked to isolated forms of deafness and the association of this mutations with deafness caused by aminoglicosides, have a practical medical aplication in prevention of use of these antibiotics in future.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Surdez

A surdez é a alteração sensorial mais comum no ser humano. Estima-se que aproximadamente 4% de indivíduos com menos de 45 anos e 29% com 65 ou mais anos tenham défice auditivo¹. A surdez grave a profunda afecta cerca de 1:1000 recém-nascidos². Estudos efectuados demonstram que entre 2% e 4% dos neonatos internados na Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais têm défice auditivo³. Sabe-se, igualmente, que mais 1:1000 crianças ficam surdas antes da idade adulta, sendo estas formas de surdez menos graves e progressivas.

Os estudos genéticos realizados no âmbito da investigação básica e clínica têm possibilitado avanços importantes na área da surdez. Nos países desenvolvidos, estima-se que, actualmente, mais de 60% dos casos de surdez tenham uma causa genética, estando a haver um decréscimo das causas adquiridas, fruto da implementação de medidas preventivas^{4,5}. Sabe-se que a surdez não é, por si só, uma doença, mas uma sequela ou manifestação de doenças distintas. Só identificando, tratando e prevenindo as doenças será possível reduzir e diagnosticar a surdez precocemente⁶.

Durante muitos anos, a identificação das proteínas que constituem o ouvido interno não foi possível, dadas as células sensoriais estarem localizadas profundamente no osso temporal, e, por isso, não acessíveis aos métodos bioquímicos convencionais. Por outro lado, o elevado número de genes expressos dificultou, igualmente, a utilização desses métodos. Foi, apenas, em 1990 que o princípio da descoberta dos genes envolvidos na surdez se iniciou. Barker e colaboradores identificaram uma mutação no gene do colagénio COL4A5 como a responsável pela surdez existente no Síndrome de Alport⁷. Em 1992 foi identificada uma mutação num homólogo do gene Pax-3 responsável pelo Síndrome de Waardenburg tipo 1⁸. Prezant e colaboradores descrevem em 1993 e uma mutação no rRNA mitocondrial responsável relacionada com uma forma não síndromica de surdez induzida por aminoglicosídeos⁹. Em 1994 Robertson e colaboradores¹⁰ construíram a primeira biblioteca de cDNA coclear humano, que permite a identificação de genes do labirinto membranoso responsáveis por perturbações auditivas, possibilitando uma maior compreensão da surdez humana a um nível molecular. Deste modo, esta

biblioteca tornou-se uma fonte de estímulo e de estudo da surdez humana¹¹. Em 1995, foram identificados no rato, os primeiros genes nos quais as mutações resultaram em formas autossômicas recessivas de surdez^{12,13}. Em 1997 estudos de mutações no gene da conexina 26, uma proteína das Junções *Gap*, revelaram que mutações neste gene são responsáveis pela principal forma de surdez não síndrômica recessiva (DFNB1) e por formas mais limitadas de surdez autossômica dominante (DFNA3). Nesse mesmo ano, mutações no gene α -tectorin foram encontradas mostrando causar surdez não síndrômica dominante numa família Belga (DFNA12) e numa Austríaca (DFNA8)¹⁴. Em 1998 mutações no factor de transcrição POU4F3, expresso em elevado número nas células ciliadas do rato, foram responsáveis por uma forma não síndrômica dominante de surdez progressiva (DFNA15)¹⁵. Progressivamente outros genes têm sido descobertos e implicados na surdez.

Em Portugal a primeira revisão realizada versando os diferentes genes implicados na surdez data de 1998¹⁶.

O único estudo, de genética molecular, efectuado até à data foi realizado com 65 doentes portugueses, com surdez não síndrômica, tendo sido pesquisadas as mutações mais frequentes a nível do genoma nuclear e mitocondrial¹⁷.

1.2 Mecanismos normais da audição

O aparelho auditivo é composto por três compartimentos anatómicos distintos: os ouvidos externos, médios e interno (Fig.1.1). As ondas sonoras são captadas pelo ouvido externo (aurícula) e conduzidas ao longo do canal auditivo externo (ducto acústico) para a membrana timpânica. As vibrações da membrana timpânica, causadas pelas ondas sonoras aéreas, são transmitidas através do ouvido médio (cavidade timpânica) para o ouvido interno através de uma cadeia de três ossículos móveis. Esses ossículos são o martelo, que está conectado à membrana timpânica, o estribo que está ligado, na sua base, à janela oval do vestíbulo e a bigorna, que está situada entre o martelo e o estribo, articulando entre ambos. As vibrações sonoras da membrana timpânica são propagadas através dos ossículos até à base do estribo, que se move para o interior e exterior da janela oval do vestíbulo (cavidade central do ouvido interno) (Fig 1.1)^{18,19}.

O ouvido interno, localizado na porção petrosa do osso temporal, regula dois sistemas sensoriais: o sistema auditivo, para a audição, e o sistema vestibular para a orientação espacial e equilíbrio. O ouvido interno é formado pelo labirinto ósseo e membranoso. O labirinto ósseo está preenchido por fluido (perilinf) e contém três cavidades: o vestíbulo, a cóclea e os canais semicirculares, com o sáculo e o utrículo (Fig 1.1).

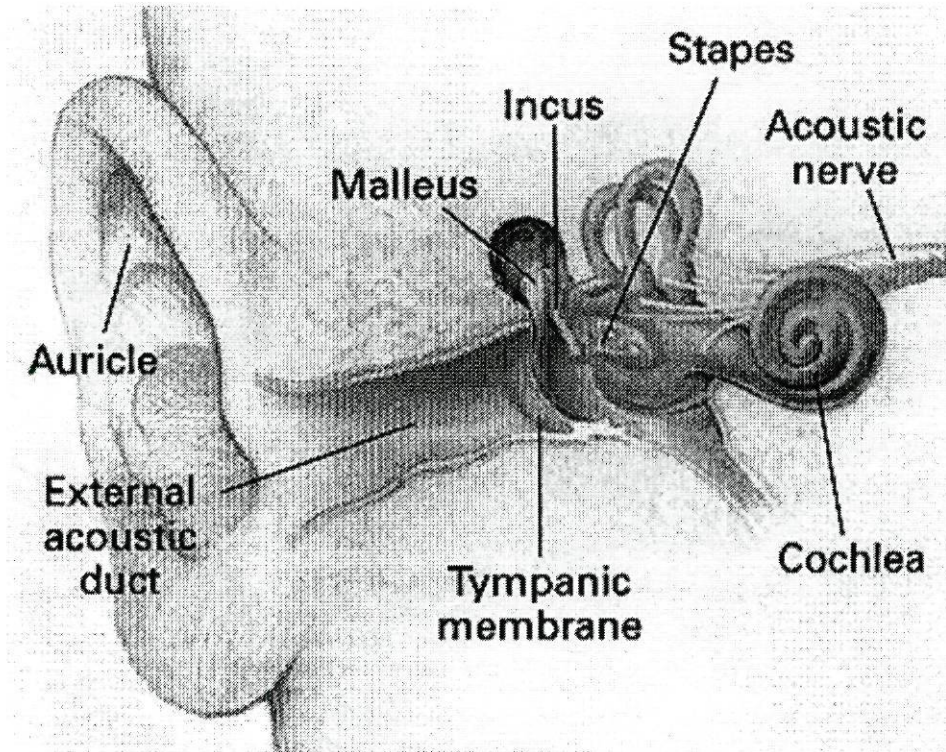


Figura 1-1 Esquema do Ouvido Externo, Médio e Interno. Retirado de N Eng J Med 2000; 342 (15): 1101

A cóclea processa os sinais auditivos, enquanto que o equilíbrio depende do aparelho vestibular, que é composto por três canais semicirculares (que respondem à aceleração rotatória) e o utrículo e sáculo (que respondem à aceleração linear). Toda a cóclea está dividida em três compartimentos por duas membranas (Fig 1.2). Os compartimentos superiores (*scala vestibuli*) e inferior (*scala timpani*) contêm perilinf e comunicam um com o outro no ápex da cóclea. Na base da cóclea a *scala vestibuli* termina na janela oval, encerrada pelo prato do estapêdio e a *scala timpani* termina na janela redonda, que está encerrada pela segunda membrana timpânica. A perilinf tem uma composição semelhante ao plasma, com uma elevada concentração de sódio e uma baixa concentração de potássio^{18,19,20,21}.

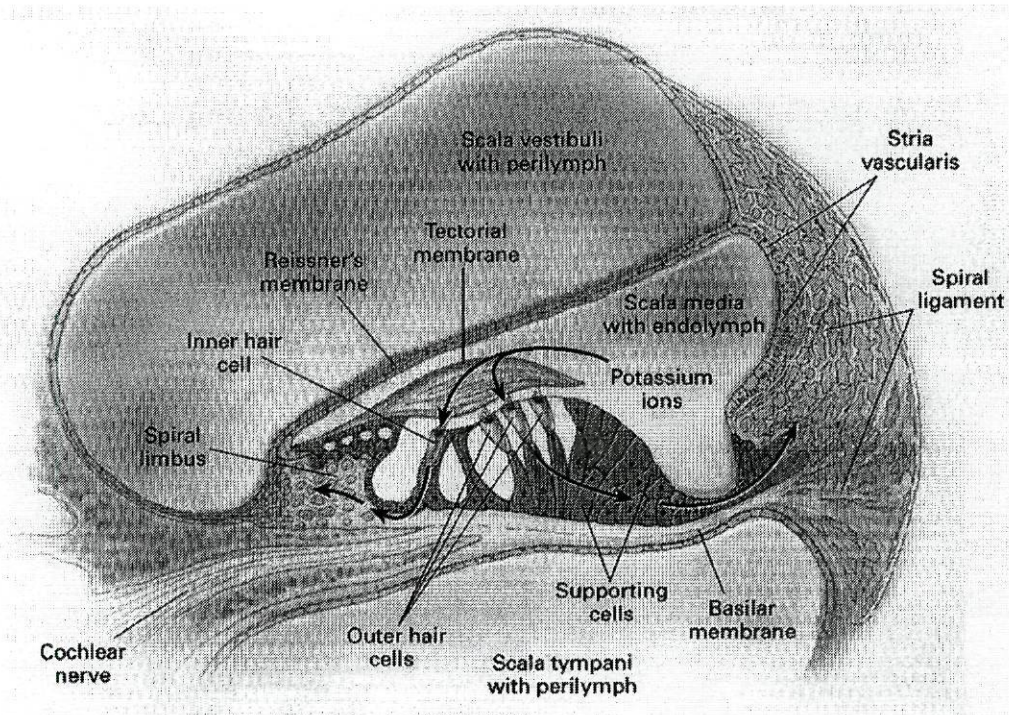


Figura 1-2 A Cóclea. Retirado de N Eng J Med 2000; 342 (15): 1102

O labirinto membranoso, que contém endolinfa (secretada pela estria vascularis na parede lateral da *scala media*, com uma elevada concentração de potássio e baixa concentração de sódio), consiste numa série elaborada de ductos comunicantes e sacos mergulhados na perilinfá do labirinto ósseo. Os três ductos semicirculares, o sáculo e o utrículo formam a parte membranosa do aparelho vestibular, enquanto que a porção membranosa da cóclea é formada pelo ducto coclear (*scala media*), que contém as células ciliadas do Órgão de Corti (Fig 1.2). Este último é o sistema de transdução sensorial do ouvido, que converte as ondas sonoras da endolinfa do ducto coclear em impulsos eléctricos. Estes impulsos são transportados pelas fibras nervosas ao longo do VIII par craniano para múltiplos núcleos do sistema auditivo central e, finalmente, para o córtex auditivo central. Em analogia, o aparelho vestibular converte a aceleração em impulsos eléctricos, que são combinados com a informação proveniente do sistema visual e proprioceptivo, definindo a nossa capacidade de equilíbrio^{18,19,21}.

O Órgão de Corti contém dois tipos de células sensoriais: uma fila de células ciliadas internas e três filas de células ciliadas externas (Fig 1.2). As células ciliadas internas são células receptoras puras, que transmitem sinais para o nervo acústico e córtex auditivo; são as células sensoriais primárias e contêm a maioria dos terminais dos neurónios

aferentes na sua superfície basal. As células ciliadas externas têm elementos motores e sensoriais, que contribuem para a sensibilidade auditiva e selectividade de frequências através da amplificação do som recebido (Fig 1.3). As células ciliadas externas contraem-se e distendem-se, quando são estimuladas acusticamente. Estas alterações no comprimento das células ciliadas externas são produzidas por uma acção concertada de motores moleculares ao longo da membrana plasmática e do citoesqueleto, que consistem em filamentos, como por exemplo de actina (Fig 1.3). As células ciliadas externas têm enervação aferente e eferente e a sua principal função é possibilitar a resolução de frequências e amplificação através da actividade motora e modular a função das células ciliadas internas^{18,19,20,21}.

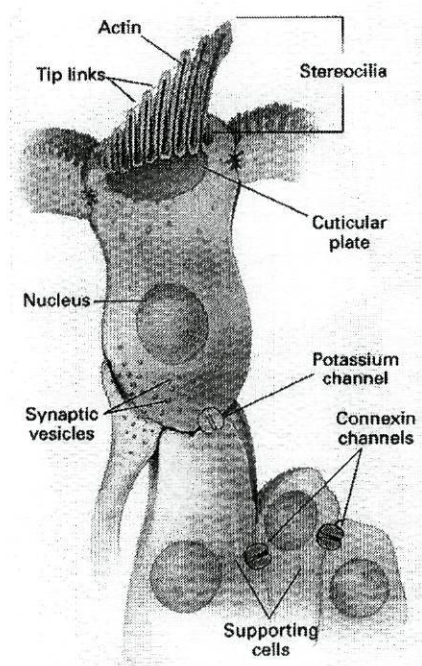


Figura 1-3 Célula Ciliada Externa com os estereocílios conectados por ligações nas extremidades. Retirado de N Eng J Med 2000; 342 (15): 1103

Cada célula ciliada tem no seu polo apical uma banda, com uma forma em V, que contém cerca de 100 estereocílios cilíndricos, em fila, com um aumento progressivo da altura (Fig 1.3). Cada estereocílio é uma projecção da célula ciliada consistindo numa porção central de actina, rodeada, perifericamente, pela membrana plasmática da célula. Os estereocílios são rijos devido a uma banda de filamentos de actina cruzados, que está inserida nos filamentos de actina do prato cuticular. As extremidades dos estereocílios estão unidas por ligações. As forças mecânicas das ondas sonoras provocam o contacto entre as células ciliadas e a membrana tectorial, o que causa a deflexão na base das

células ciliadas onde os estereocílios deslizam uns contra os outros (Fig 1.2). Os movimentos das ligações nas extremidades dos estereocílios, que são controlados pela miosina, juntam as pontas dos estereocílios adjacentes, funcionando provavelmente como adjuvantes da abertura de canais de potássio (Fig 1.3). Uma deflexão mínima de 1nm abre estes canais de potássio. O influxo dos iões potássio da endolinfa rica em potássio, que banha as células ciliadas, resulta numa alteração do potencial de membrana que é proporcional ao estímulo acústico. A despolarização das células ciliadas activa, então, os canais de cálcio na porção basolateral das células levando ao influxo de cálcio. Este influxo desencadeia a libertação de neurotransmissores que activam o nervo acústico (Fig 1.2 e 1.3). As células ciliadas são repolarizadas quando os iões potássio saem destas células através dos canais de potássio e entram nas células de suporte epiteliais. Esta etapa de reciclagem dos iões potássio é fundamental para manter uma audição normal. Após o influxo e o início do potencial de acção, os iões potássio primeiro passam através de um canal na porção basolateral da membrana das células ciliadas codificado pelo gene *KCNQ4*, para alcançar as células de suporte²². Aí os iões difundem-se passivamente de uma célula à outra através de *Junções Gap*, que são compostas maioritariamente por proteínas conexas multiméricas, que estão presentes nas células de suporte e nas células do limbus espiral e do ligamento espiral. À medida que os iões potássio atingem a estria vascular eles são activamente bombeados para a endolinfa através de canais de potássio dependentes da voltagem codificados pelos genes *KCNQ1* e *KCNE1*^{18,19,21,23,24}.

1.3 Classificação da Surdez

A surdez pode ser classificada como genética ou não genética, pré-lingual ou pós-lingual e síndrómica ou não síndrómica (Tabela 1.1). A surdez de causa genética pode ser síndrómica, quando associado a este défice existem outros achados clínicos, ou não síndrómica, constituindo esta mais de 70% dos casos desta surdez²⁵. A surdez genética pode iniciar-se antes do desenvolvimento da fala (pré-lingual) ou após (pós-lingual). A surdez pode resultar da mutação de um único gene (forma monogénica) ou da combinação de mutações em diferentes genes e de factores ambientais (formas multifactoriais). Em relação à gravidade, a surdez pode ser classificada em ligeira (perda de 21-40 dB), moderada (perda de 41-60 dB), moderadamente grave (perda de 61-80 dB), grave (perda de 81-100 dB) e profunda (perda > 100 dB); as frequências podem ser baixas (< 500Hz), médias (501-2000Hz) e altas (> 2000Hz)²⁶. Em relação ao tipo de surdez ela pode ser classificada em central (rara), quando há alterações do

processamento da informação de causa central (o sinal degrada-se quando o estímulo auditivo atinge o tronco cerebral e superiormente), e periférica (a mais frequente) quando há atingimento das restantes estruturas. A surdez periférica pode ainda subdividir-se em de condução, quando há envolvimento do ouvido externo e médio, sensorineural, quando há atingimento da cóclea ou do VIII par ou ainda mista quando há associação entre estes dois tipos de surdez periférica²⁷.

A maior parte das formas pré-linguais de surdez estão presentes ao nascimento (congénitas), mas algumas iniciam-se precocemente na infância, antes da aquisição da linguagem. Na maioria dos casos, a surdez pré-lingual é grave, mas estável. Cerca de 50% dos casos são devidos a formas monogénicas de surdez e, destas, aproximadamente 75% são herdadas de forma autossómica recessiva (DFNB), 20% de forma dominante (DFNA), 5% ligada ao X recessivo (DFN) e em <1% mitocondrial⁵ (Fig 1.4), sendo os diferentes loci dos genes designados de DFN (*deafness*).

Tabela 1.1 Classificação da Surdez²⁶

CRITÉRIOS	SUBCATEGORIAS
Causas	Genética (monogénica ou multifactorial) Não Genética
Associação	Sindrómica Não Sindrómica
Início	Pré-lingual Pós-lingual
Tipo	Central Periférica Neurosensorial Condução Mista
Progressão	Progressiva Não progressiva Flutuante
Gravidade	
Ligeira	Perda de 21-40 dB
Moderada	Perda de 41-60 dB
Moderadamente grave	Perda de 61-80 dB
Grave	Perda de 81-100 dB
Profunda	Perda de > 100 dB
Frequências	
Baixas	<500 Hz
Médias	501-2000 Hz
Altas	> 2000 Hz
Envolvimento vestibular	Presente Ausente

A surdez não síndrómica é muito heterogénea, tendo sido descritos mais de 100 loci (54 autossómicos dominantes, 53 autossómicos recessivos, 8 ligados ao X e um locus mitocondrial) e identificados, até ao momento, 36 genes²⁸.

Na surdez pré-lingual, maioritariamente autossómica recessiva e neurosensorial, devido a defeitos cocleares, foram descritos 31 loci diferentes e identificados 16 genes²⁸.

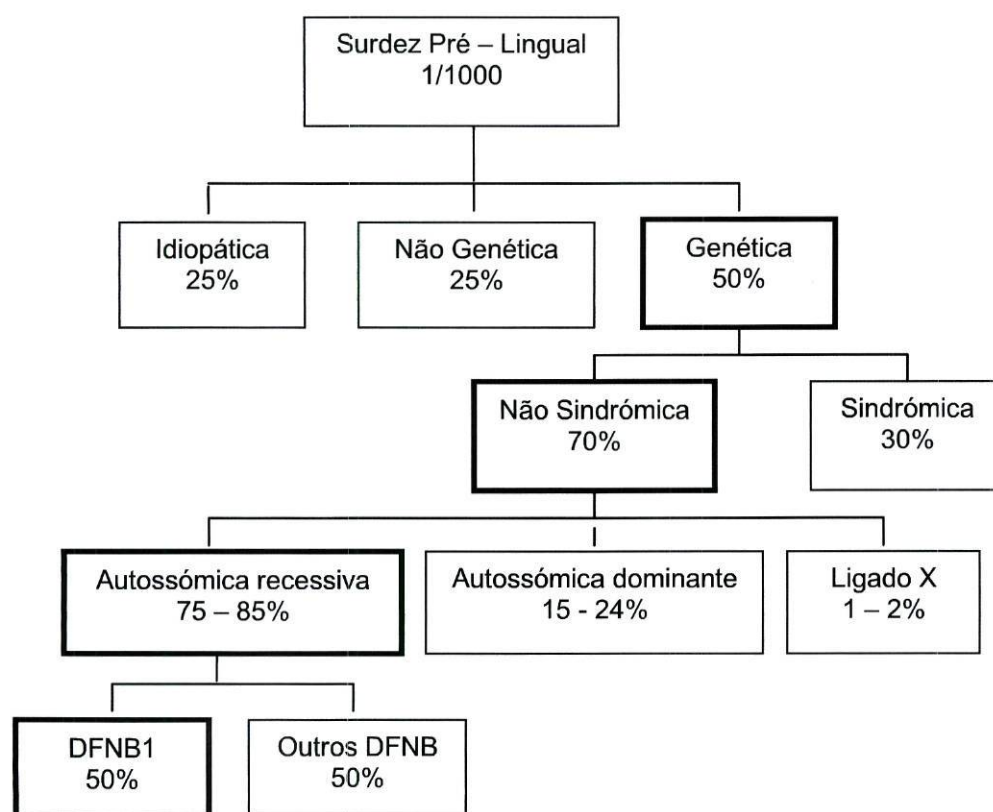


Figura 1-4 Causas de Surdez Pré – Lingual²⁹

1.4 Diagnóstico da surdez

Os testes fisiológicos determinam, objectivamente, o estado funcional do sistema auditivo e podem ser realizados em qualquer idade. Estes incluem os Potenciais Evocados Auditivos, as Emissões Otoacústicas e a Timpanometria. No primeiro exame utilizam-se estímulos (clicks) para provocar respostas electrofisiológicas, que se originam no VIII nervo craniano e no tronco cerebral e são registados nos eléctrodos superficiais; a detecção do limiar da onda V correlaciona-se melhor com a sensibilidade auditiva na região dos 1500 a 4000 Hz, em indivíduos neurologicamente normais; estes potenciais não têm sensibilidade para baixas frequências. Nas emissões otoacústicas os sons originados no interior da cóclea são medidos no canal auditivo externo utilizando um

aparelho com um microfone e um *transducer*. Estas emissões reflectem, primariamente, das células ciliadas externas, da cóclea, numa gama ampla de frequências e estão presentes em ouvidos com uma sensibilidade auditiva superior a 40 a 50 dB. Na Timpanometria é avaliado o sistema auditivo periférico, incluindo a pressão do ouvido médio, a mobilidade da membrana timpânica, a função da trompa de eustáquio e a motilidade dos ossículos do ouvido médio^{29,30}.

A audiometria determina, subjectivamente, como o indivíduo processa a informação auditiva. Este exame consiste em Testes Comportamentais e Audiometria Tonal. Os primeiros incluem a audiometria com observação do comportamento, utilizado em crianças desde o nascimento até aos seis meses de vida (altamente dependente das aptidões de quem realiza o exame e está sujeito a erro) e a audiometria com reforço visual, utilizada em crianças dos seis meses até aos dois anos e meio e proporciona um audiograma completo, fiável, mas está dependente do grau de desenvolvimento da criança e da capacidade de quem testa. A audiometria condicionada pelo jogo é, também, um teste utilizado para testar crianças entre os 2 anos e meio e os 5 anos; um audiograma específico para cada ouvido pode ser obtido, se a criança colaborar. A audiometria convencional é utilizada para testar crianças com cinco ou mais anos, sendo estas capazes de indicar quando um determinado som é audível. A audiometria tonal (Condução Aérea e Óssea) determina a intensidade mais baixa na qual o indivíduo é capaz de ouvir um tom puro. Frequências entre os 250 e os 8000 Hz são testados utilizando auscultadores; a intensidade é medida em decibels, definida como a razão entre duas pressões sonoras; zero decibels é o limiar médio para um adulto com audição normal; 120 dB é tão alto que é capaz de provocar dor. Neste exame o limiar de recepção da linguagem e da discriminação também é testados^{29,30}.

1.5 Causas de Surdez

A Surdez pode classificar-se como sendo Não Genética (40-50%) e Genética (50-60%) (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 Causas da Surdez

NÃO GENÉTICA	40 – 50%	
Teratológica (TORCH) Infecção Pós-natal Trauma craniano ou acústico Prematuridade Drogas ototóxicas		
GENÉTICA	50 – 60%	
Fenótipo	Sindrômica	30 – 40%
	Não sindrômica	60 – 70%
Hereditariedade	Autossômica recessiva	70 – 80%
	Autossômica dominante	10 – 20%
	Ligada ao X	1 – 2 %
	Mitocondrial	<1%
Multigénica Anomalias cromossômicas		

1.5.1 Surdez Não Genética

As causas de surdez não genética podem ser divididas mediante o período em que ocorrem: pré-natal, perinatal e pós-natal.

Nas causas pré-natais as infecções congénitas do grupo TORCH (Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovirus e Herpes simplex) continuam a ser uma importante causa de morbidade em idade pediátrica, podendo representar uma causa teratológica de surdez. A infecção congénita por citomegalovirus (CMV), que ocorre em 0.4 – 2.3% de todos os recém-nascidos é, frequentemente, assintomática ($\approx 80\%$ dos casos); esta é a infecção intra-uterina mais comum no ser humano^{31,32,33}.

Um estudo prospectivo, com 108 crianças com infecção congénita por CMV, concluiu que estas crianças representavam aproximadamente 12% de todas as crianças com surdez sensorineural congénita³⁴. Outras causas pré-natais de surdez incluem a Sífilis Congénita³⁵ e os Síndromes tóxicos pré-natais motivados pelo álcool (Síndrome alcoólico-fetal), pelo mercúrio (ingestão materna de peixe contaminado) e pela trimetadiona (mães com epilepsia medicadas com este fármaco)³⁶; a deficiência pré-natal de iodo pode

também ser responsável pelo aparecimento de surdez por interferir a nível do neurodesenvolvimento^{36,37,38}.

Nas causas perinatais de surdez a prematuridade assume, actualmente, particular importância dado o aumento da viabilidade dos recém-nascidos prematuros, o que os expõe a maior tendência para o aparecimento de sequelas neurológicas, nomeadamente auditivas. O baixo peso à nascença (inferior a 1500g), a grande prematuridade, a hipóxia, a hiperbilirrubinémia com necessidade de exsanguinotransusão, a necessidade de ventilação mecânica durante período de tempo prolongado (superior a 5 dias), a utilização de medicamentos ototóxicos (aminoglicosídeos, diuréticos de ansa), a hipertensão pulmonar persistente, bem como o ruído a que estão sujeitos, são alguns dos factores a considerar na etiologia da surdez nos prematuros^{30,36}.

Quando a surdez ocorre no período pós-natal há várias causas a considerar, nomeadamente infecciosas (meningite bacteriana, infecções víricas - sarampo, varicela, rubéola), ototóxicas (aminoglicosídeos, diuréticos de ansa), traumáticas (barotrauma, traumatismo craniano) e endócrinas, nomeadamente o hipotireoidismo^{30,36}.

Após o início da vacinação contra a rubéola e, posteriormente, contra o *Haemophilus influenzae*, a surdez motivada por estas causas foi radicalmente diminuída. Estes avanços resultaram numa aumento das causas hereditárias e das resultantes das complicações associadas à prematuridade^{30,36}.

1.5.2 Surdez Genética

1.5.2.1 Genes implicados na surdez

No início da década de 90 apenas genes implicados na surdez síndrómica foram localizados e identificados. Até 1996 apenas um gene nuclear (POU3F4) e dois genes mitocondriais (12S rRNA e tRNA para serina) foram identificados como responsáveis pela surdez não síndrómica. A partir dessa altura vários novos genes foram sendo descobertos. A identificação e a localização de novos genes tem aumentado progressivamente, à medida que o projecto do genoma humano vai avançando¹¹ e a biblioteca de DNA complementar (DNAC), específico da cóclea, vai sendo constituída.

1.5.2.1.1 Genes dos Canais Iônicos

I. Genes das Conexinas

O gene mais comumente mutado, que isoladamente causa a surdez não síndrômica autossômica recessiva, codifica uma das conexinas, a conexina 26 (Cx26)³⁹.

O locus *DFNB1* da surdez não síndrômica, pré-lingual, autossômica recessiva (MIM 220290), habitualmente não progressiva, moderada, grave ou profunda, foi localizado na região 13q12^{40,41}. Contudo, sabe-se que este fenótipo tem uma grande variabilidade quer intrafamiliar quer interfamiliar, no que diz respeito ao grau da surdez, bem como à progressão da mesma. Este locus contém o gene da *GJB2* (Gap Junction Protein β) (MIM 121011), que codifica a conexina 26 (Cx26), uma proteína transmembranar, que constitui uma subunidade das Junções Gap intercelulares, sendo esta uma das 13 conexinas identificadas nos mamíferos³⁹. Existem dois tipos de conexinas – alfa (*GJA Gap Junction α*) e beta (*GJB Gap Junction β*). As conexinas têm quatro domínios transmembranares (TM1 a TM4), dois domínios extracelulares (EC1-EC2), uma ansa citoplasmática (CL) e terminações N e C citoplasmáticas (NT-CT). O domínio NT e o TM originam o portão voltagem dependente⁴². Seis monómeros de conexinas unem-se para formar um hexômero (conexão), que, por seu turno, se liga a outro conexão, na superfície de uma célula adjacente, para, alinhados, formarem um canal intercelular da Junção Gap^{43,44}. Estas junções permitem uma comunicação intercelular possibilitando a passagem de íons, mensageiros secundários, metabólitos e outras pequenas moléculas. Pensa-se serem importantes para a proliferação e diferenciação celular, bem como na manutenção da homeostasia tecidual. Na cóclea há duas redes de Junções Gap, o sistema celular epitelial e o sistema do tecido conjuntivo, que se pensa estarem envolvidas na reciclagem dos íons potássio das células ciliadas internas para a endolinfa coclear, onde este tem um papel essencial na transdução do som^{45,46,47}. Experiências imunoquímicas demonstraram a expressão de *GJB2* na estria vascular, membrana basal, limbus e proeminência espiral da cóclea⁴⁸ (Fig 1.2).

Tem sido demonstrado que várias conexinas diferentes participam nestes sistemas de Junção Gap. Até à data, mutações nos genes que codificam cinco dessas conexinas (*GJB1* para Cx32, *GJB2* para a Cx26, *GJB6* para a Cx30, *GJB3* para a Cx31 e *GJA1* para a Cx43 [MIM 603324]) expressas a nível coclear, resultam em surdez^{39,49,50,51}. Entre

esses genes o *GJB2* evidencia-se, porque as mutações neste gene contribuem para cerca de 50% de todos os casos de surdez pré-lingual em várias populações⁵². Mais de 80 mutações diferentes no *GJB2* têm sido descritas em indivíduos surdos^{18,51}. A mutação mais comum, contribuindo para cerca de 70% das mutações no gene *GJB2*, é a 35delG. Esta é uma deleção de uma guanina numa série de seis guaninas consecutivas na região codificadora do gene *GJB2*; isso origina um frameshift e um codão stop na posição 13 no início da proteína^{53,54}. Adicionalmente, foi demonstrado em estudos efectuados em populações saudáveis de Espanha e Itália, que a prevalência de portadores heterozigóticos para 35delG foi de 2.5% a 4%, igualando a mutação $\Delta F508$ (a mais frequente até agora conhecida) do gene *CFTR*, que origina a Fibrose Quística⁵⁵. A taxa de portadores desta mutação será, pois, de cerca de 1:33. Por tudo isto, os testes moleculares para a identificação das mutações do *GJB2* rapidamente se tornaram um método padrão para o diagnóstico e aconselhamento de doentes com surdez não síndrómica de causa desconhecida.

Uma segunda mutação no gene da *Cx26*, 167delT, é reconhecida como sendo a mais comum nos Judeus Ashkenazi nos quais a frequência de portadores é de 3-4% e há evidência da existência de um efeito fundador⁵⁶. Entre as populações asiáticas a frequência de mutações do gene da *Cx26* é baixa, mas a mutação mais frequente em várias dessas populações é a 235delC^{57,58,59}. Outras mutações foram descritas, mas são encontradas num número restrito de pessoas.

A pesquisa das mutações do gene *GJB2* em doentes com surdez autossómica recessiva revelou, contudo, que um elevado número de doentes eram portadores de, apenas, um alelo mutado. Estes casos correspondiam a 10-50% dos indivíduos surdos com, pelo menos, uma mutação no *GJB2*. Suspeitou-se que outras mutações existissem no locus *DFNB1*, mas não no gene *GJB2*, explicando o elevado número de indivíduos heterozigóticos afectados. Esta hipótese recebeu apoio experimental com a descoberta de uma nova classe de mutações no locus *DFNB1*, deleções não afectando o *GJB2*, mas truncando o gene *GJB6* vizinho, que codifica a *Cx30*. Estas deleções acompanham em *trans* o único alelo mutado do *GJB2*, em indivíduos afectados heterozigóticos (heterozigotia composta)^{60,61,62}, tendo, igualmente, sido encontrada em homozigotia em indivíduos surdos^{61,62}. O local onde ocorreu o ponto de quebra que originou a deleção foi isolado e sequenciado revelando a perda de uma sequência de DNA de cerca de 342 Kb, com um ponto de quebra no interior da região codificadora do *GJB6*⁶¹. Esta deleção

designada de “del(*GJB6*-D13S1830)” foi a mutação acompanhante em 50% dos casos dos heterozigóticos *GJB2* surdos⁶¹.

Estes achados indicam uma forma digénica de hereditariedade da surdez resultante das mutações envolvendo os genes *GJB2* e *GJB6*^{50,63,64,65,66}. Contudo, os factos de mutações pontuais no *GJB6* não terem ainda sido encontrados em casos de surdez autossómica recessiva são contra esta hipótese. Uma explicação alternativa é que a deleção possa eliminar um elemento regulatório para o *GJB2* que é essencial para a expressão normal deste gene no ouvido interno. No entanto, esse elemento ainda não foi encontrado⁶⁷.

Mutações no gene da Cx26 também podem causar surdez não síndrómica autossómica dominante (DFNA3), que, apesar de rara, tem sido identificada em famílias com vários tipos de mutações (R184Q, W44C, W44S, C202F, M34T, R75W, D66H)^{68,69,70,71}. Outras mutações, mais raras, têm sido identificadas neste gene.

As mutações no gene da Cx26 podem, também, estar associadas a formas de surdez síndrómica como Queratoderma palmoplantar, Síndrome de Surdez-Queratite-Ictiose e Surdez-Ictiose e Síndrome de Vohwinkel (Queratoderma mutilante)^{72,73}.

Mutações no gene Cx 30 (*GJB6*) podem estar, raramente, associadas a formas autossómicas dominantes de surdez não síndrómica (DFNA3)⁵⁰, bem como a formas síndrómicas de surdez, como é o Síndrome de Crouston (displasia ectodérmica autossómica dominante, alopecia e hiperqueratose palmoplantar)⁷³.

Mutações na Cx31 (*GJB3*) foram detectadas em indivíduos com três patologias distintas: Surdez autossómica dominante (DFNA3)⁴⁹ ou recessiva⁷⁴, Eritroqueratodermia variabilis⁷⁵ e neuropatia sensorineural associada à surdez⁷⁶.

A existência de mutações no gene da Cx32 (*GJB1*) podem resultar na Doença de Charcot-Marie-Tooth, que está associada a surdez⁷⁷. Esta é uma doença neurodegenerativa periférica progressiva, que se apresenta com desmielinização dos neurónios periféricos levando à fraqueza das regiões distais e perda sensitiva. A Cx32 é expressa nas células de Schwann onde forma canais comunicantes na Junção Gap intracelular entre ansas adjacentes de mielina não compactada. A perda e disfunção desses canais podem levar à perda de uma importante via de sinalização intracelular.

II. Gene PDS

O Síndrome de Pendred, descrito há mais de 100 anos, em duas irmãs com surdez profunda congênita e bócio é, talvez, a causa mais comum de surdez sindrômica pré-lingual e estima-se uma prevalência de 10% nos indivíduos surdos⁷⁸. O gene do Síndrome de Pendred – gene PDS, que codifica a proteína pendrin - foi identificado em 1997. Mutações neste gene podem causar, igualmente, surdez congênita autossômica recessiva (DFNB4). A proteína pendrin funcionará como um transportador de aniões cloro e iodo, independente do sódio^{79,80}. O gene PDS é expresso na cóclea em regiões de reabsorção de endolinfa sugerindo que as mutações no gene PDS podem levar ao desequilíbrio homeostático do fluido endolinfático.

III. Gene KCNQ4

Mutações em dois genes dos canais de potássio, KCNE1 e KCNQ1 causam uma surdez sindrômica – Síndrome de Jervell and Lange-Nielsen – que combina surdez e arritmias cardíacas (QT longo)^{23,24}.

Foi identificado um novo membro da família dos genes dos canais de potássio, KCNQ4, que está mutado numa forma progressiva dominante de surdez (DFNA2); a proteína codificada por este gene é expressa no cóclea a nível das células sensoriais ciliadas externas⁸¹. Pensa-se, deste modo, que enquanto as mutações nos genes KCNQ1 e KCNE1 afectam a secreção da endolinfa, o mecanismo que leva à surdez mediada pelo KCNQ4 é intrínseco às células ciliadas externas.

Os canais de potássio codificados por estes três genes contribuem para a homeostasia do potássio na cóclea mediando a repolarização e o reinício do potencial eléctrico nas células em cabeleira. O produto do gene KCNQ4, provavelmente, forma um canal de potássio na face basolateral das células ciliadas externas, permitindo o fluxo de iões potássio das células ciliadas para as células de suporte. Os iões potássio vão, então, recircular através dos canais de conexinas entre as células de suporte e a estria vascular, onde são secretadas para a endolinfa através dos canais de potássio formados pelos produtos dos genes KCNQ1 e KCNE1⁸².

IV. Gene *CLDN14*

Para manter o potencial de repouso elevado a nível da endolinfa, as células que rodeiam a endolinfa estão seladas com várias junções apertadas entre elas. Estas junções apertadas também dão apoio estrutural ao neuroepitélio. O gene *CLDN14* codifica a proteína claudina-14, que pertence a um subtipo de junção apertada a nível do Órgão de Corti, que é essencial para a manutenção de um gradiente electroquímico entre a endolinfa e os tecidos circundantes. Mutações que codificam esta proteína levam a uma forma de surdez autossómica recessiva (DFNB29)⁸³.

1.5.2.1.2 Genes das Proteínas do Citoesqueleto

I. Miosinas

Os genes da miosina são membros de uma grande superfamília de genes que codificam proteínas que exercem forças mecânicas. As miosinas são motores moleculares que se unem aos filamentos de actina para se moverem ao longo deles. Têm diversas funções – transporte de organelos intracelulares, fagocitose, secreção, contracção muscular, movimento celular; no ouvido, usam os filamentos de actina como apoio para o transporte de vesículas intracelulares para as células ciliadas. As miosinas estão presentes nos estereocílios, que estão preenchidos com actina e no prato cuticular que é rico em actina. Deste modo, fornecem uma âncora para a actina, nas células ciliadas e nos estereocílios (Fig 1.3) e são responsáveis não apenas pela tensão na ligação de topo dos estereocílios e dos seus movimentos, mas também pela organização do citoesqueleto nas células ciliadas. Análises filogenéticas identificaram 18 classes distintas de miosinas: 17 representam miosinas não convencionais e a classe II inclui miosinas não musculares e musculares convencionais.

As miosinas não convencionais têm um motor de ligação à actina, semelhante às miosinas convencionais, mas variam nos domínios das suas caudas, presumivelmente para transportarem moléculas de carga diferente para o interior da célula. As miosinas não convencionais estão presentes em células não musculares e não formam filamentos bipolares.

Entre estas miosinas não convencionais mutações no gene *MYO7A* são responsáveis pelo Síndrome de Usher tipo 1B (MIM 276903), que é caracterizado por retinite

pigmentosa, sintomas vestibulares e surdez pré-lingual. Mutações neste grande gene foram subseqüentemente identificadas em doentes com surdez não sindrômica pós-lingual autossômica dominante (DFNA11)⁸⁴ e também pré-lingual autossômica recessiva (DFNB2)^{85,86}.

No gene MYO15 foram também encontradas três mutações distintas responsáveis por surdez autossômica recessiva (DFNB3)⁸⁷.

O gene MYO6 está mutado numa forma de surdez autossômica dominante (DFNA22)⁸⁸ e autossômica recessiva (DFNB37)⁸⁹.

Mais recentemente foi demonstrado que a audição normal no ser humano requer a miosina IIIA (MYO3A) e a miosina IA (MYO1A), que estão implicadas em duas formas de surdez não sindrômica, DFNB30⁹⁰ e DFNA 48⁹¹, respectivamente.

As miosinas da classe II consistem em 15 genes incluindo seis miosinas do músculo-esquelético de cadeia pesadas, duas miosinas cardíacas da cadeia pesada, uma miosina do músculo liso de cadeia pesada e três miosinas não musculares de cadeia pesada. As três miosinas não muscular são codificadas por MYH9, MYH10 e MYH14. Entre as miosinas não musculares o gene da MYH9 é responsável por quatro doenças autossômicas dominantes designadas por Anomalia de May Hegglin, Síndromes de Sebastian, Fechtner e Epstein⁹². Estes doentes apresentam macrotrombocitopenia congénita, agregados de miosinas não musculares de cadeia pesada a nível dos neutrófilos e durante a vida podem desenvolver surdez, nefrite e cataratas. Este mesmo gene aparece mutado numa família afectada por surdez não sindrômica autossômica dominante (DFNA17)⁹³. Recentemente foi descrita uma mutação no gene MYH14 que é responsável por uma forma de surdez não sindrômica autossômica dominante (DFNA4)⁹⁴. Todos estes achados confirmam o papel crucial da superfamília das miosinas nas funções auditivas.

II. Gene ACTG1

As mutações neste gene da γ -Actina estão associadas a formas dominantes de surdez (DFNA20/26). As células ciliadas auditivas requerem e estão muito dependentes do citoesqueleto de actina. Na região apical das células ciliadas, os estereocílios contêm bandas paralelas de actina com polaridade idêntica⁹⁵. No prato cuticular, imediatamente

abaixo da superfície apical, uma rede de consistência de gel, rica em filamentos de actina ancora os estereocílios e à volta das células ciliadas; perto da região apical, há junções aderentes, que contêm filamentos de actina anti-paralelos. A região basolateral das células ciliadas também contêm estruturas de actina, que apoiam a membrana celular e ajudam na passagem das vesículas sinápticas. A actina interage com outras proteínas do citoesqueleto, nomeadamente a miosina, a harmonina e a espina.

III. Gene *CDH23*

As mutações deste gene (*Cadherin like*) são responsáveis, para além do Síndrome de Usher 1D, por uma forma de surdez não sindrómica (DFNB12)⁹⁶. As caderinas são uma grande família de proteínas de adesão intercelular. As caderinas clássicas têm zonas extracelulares, homofílicas, repetidas que permitem uma adesão célula a célula através de interações dependentes do cálcio, enquanto que os domínios citoplasmáticos interagem com o citoesqueleto através da β catenina⁹⁷. Uma família extensa de caderinas atípicas, ou proteínas *cadherin-like*, partilham homologia nos domínios extracelulares e presumivelmente medeiam funções semelhantes envolvendo interações membranares célula a célula ou célula-extracelulares. A *CDH23* parece ser uma nova classe de proteínas *cadherin-like*; tem uma distribuição muito limitada à neuroretina e a nível coclear. Essa expressão é concistente com os fenótipos observados na surdez não sindrómica (DFNB12) e *USH1D*. Este é o segundo gene identificado capaz de originar quer surdez não sindrómica, que o Síndrome de Usher. O gene da *MYO7A* foi o outro identificado, cujas mutações podem causar *DFNA11*, *DFNB2* e Síndrome de Usher1B^{85,86}, apesar de não haver correlação clara entre o tipo de mutação e o fenótipo⁹⁸. Em contraste as seis mutações missense do gene *CDH23* foram encontradas em famílias *DFNB12* enquanto que as duas nonsense foram encontradas em famílias com Síndrome de Usher1D.

IV. Gene *STRC*

O gene *STRC* codifica a proteína estereocilina. Esta proteína é expressa apenas nas células ciliadas sensoriais do ouvido interno a nível dos estereocílios permitindo que as microvilosidades fiquem firmes na formação da estrutura para a mecanorecepção da estimulação sonora⁹⁹.

V. Gene *HDIA1*

Uma outra proteína, com função citoesquelética, responsável por surdez sensorineural progressiva quando mutada é o produto do gene humano homólogo ao gene *Drosophila diaphanous* (*HDIA1*)¹⁰⁰. Este gene é responsável por uma forma de surdez autossômica dominante (*DFNA1*) e a proteína que codifica parece estar envolvida na polimerização dos filamentos de actina necessárias para a citocinese e polaridade celular. A proteína diafanos (*HDIA1*) está presente em muitas células e no ouvido está envolvida na manutenção do citoesqueleto das células ciliadas através do recrutamento de porfilina para a membrana celular. A porfilina é uma proteína de ligação à actina que induz a polimerização da actina e regula a dinâmica da actina^{82,100}.

1.5.2.1.3 Genes das Proteínas Extracelulares

I. Gene *COCH*

Mutações no gene coclear *COCH* causam surdez sensorineural progressiva autossômica dominante com atingimento vestibular (*DFNA9*)¹⁰¹. O início da surdez ocorre entre a segunda e a quinta décadas de vida, com envolvimento inicial das altas-frequências. As mutações no gene *COCH* motivam a perda de celularidade no ligamento espiral e limbus e resultam na acumulação de depósitos acidofílicos nos canais nervosos e tecidos de suporte do Órgão de Corti, levando possivelmente à compressão ou bloqueio do nervo coclear; estas alterações estão também patentes a nível das fibras do nervo vestibular^{101,102}. Estudos histopatológicos e electromicroscópicos do osso temporal de indivíduos afectados mostraram a presença de substâncias microfibrilares com grânulos de glicosaminoglicanos e a ausência de colagénio tipo II sugerindo que o gene *COCH* é também importante para a manutenção de outras proteínas estruturais da cóclea. Quatro novas mutações foram encontradas em nove famílias^{101,103,104}. Algumas dessas famílias também têm doença de Menière¹⁰⁴ o que levanta a possibilidade de mutações do gene *COCH* também serem responsáveis por problemas vestibulares na Doença de Menière em alguns indivíduos.

II. Gene *TECTA*

A membrana tectorial é uma estrutura acelular, constituída por matriz extracelular, que se encontra sobre as células ciliadas da cóclea. O som ao induzir movimentos destas células

permite que elas contactem com a membrana tectorial causando deflecção das bandas de estereocílios no ápice das células ciliadas, permitindo a abertura de canais de potássio no seu topo. Mutações de um dos principais componentes da matriz extracelular da membrana tectorial – α -Tectorin (TECTA) pode causar surdez pré-lingual moderada a profunda autossômica dominante (DFNA8/12)^{14,105} ou recessiva (DFNB21)¹⁰⁶.

III. Gene COL11A2

Os colagêneos são uma família muito heterogênea composta por mais de 30 genes diferentes. As proteínas do colagêneo têm sequências repetitivas de G-X-Y, em que o G é glicina e o X e o Y são, respectivamente prolina e hidroxiprolina. Estas proteínas podem combinar-se em vários complexos proteicos triméricos, que estão agrupados em classes diferentes. Algumas formas de surdez sindrômica são causadas por mutações em diferentes genes do colagêneo, incluindo Osteogenesis imperfecta (COL1A1, COL1A2), Síndrome de Alport (COL4A3, COL4A4, COL4A5), Síndrome de Stickler (COL2A1, COL11A1, COL11A2) e Síndrome de Marshall (COL11A2). Estes colagêneos pertencem à membrana basal (tipo IV) e estrutura fibrilar (tipo I, tipo II e tipo IX). O tipo XI é essencial para a manutenção do colagêneo tipo II e contém três subunidades cadeias α polipeptídicas codificadas por diferentes genes. Mutações no gene do colagêneo 11 (COL11A2), que codifica a subunidade $\alpha 2$ do colagêneo 11, foi identificada em famílias com surdez neurosensorial autossômica dominante, não progressiva afectando frequências médias (DFNA13)¹⁰⁷.

IV. Gene PCDH15

Este gene codifica a proteína protocaderina 15 e as suas mutações causam surdez e retinite pigmentosa no Síndrome de Usher tipo 1F e surdez não sindrômica recessiva (DFNB23). Esta proteína, identificada por técnicas de imunocitoquímica, localiza-se a nível dos estereocílios das células ciliadas do ouvido interno e nos fotorreceptores retinianos. Os resultados obtidos em diversos estudos apoiaram a importância desta proteína na morfogênese e coesão das bandas de estereocílios e manutenção da função das células fotorreceptoras retinianas¹⁰⁸.

V. Gene *WHRN*

O gene *WHRN* codifica uma proteína, designada de Whirlin, envolvida no alongamento e manutenção dos estereocílios das células ciliadas externas e internas. Esta proteína actua como organizadora dos complexos moleculares submembranares, que controlam a polimerização coordenada da actina e o crescimento dos estereocílios. As mutações no gene que codifica esta proteína são responsáveis por surdez autossómica recessiva (DFNB31)¹⁰⁹.

VI. Gene *ESPN*

O gene *ESPN* codifica uma proteína de ligação à actina insensível ao cálcio, chamada espina. Esta proteína é essencial para a audição e função vestibular nos seres humanos. Uma mutação recessiva no gene *ESPN* causa surdez e disfunção vestibular (DFNB36)¹¹⁰.

VII. Gene *OTOA*

A otoancorina é uma proteína codificada pelo gene *OTOA*. Esta proteína tem como função a ligação aos géis acelulares do ouvido interno às superfícies apicais das células neurosensoriais adjacentes¹¹¹.

1.5.2.1.4 Genes de Factores de Transcrição

I. Gene *POU3F4*

Uma forma de surdez mista ligada ao X (DFN3) é uma combinação de surdez de condução, motivada pela fixação do estapédio, com surdez sensorioneural progressiva. Esta é a forma de surdez mais frequente ligada ao cromossoma X. Esta surdez é motivada por mutações pontuais ou deleções no factor transcricional *POU3F4* no Xq21¹¹²; microdeleções de material cromossómico proximal ao gene *POU3F4* também podem causar DFN3¹¹³, significando que há uma região deletada nessa área ou que existe um segundo gene ligado ao X na vizinhança. Mutações num outro domínio *POU*, *POU4F3*, mapeado a 5q31 também está associado a surdez progressiva dominante (DFNA15)¹⁵.

II. Gene *TFCP2L3*

O gene *TFCP2L3* codifica a proteína *Transcription Factor Cellular Promoter2-like3*. Este é um gene da família dos factores de transcrição cujo arquetipo é o *TFCP2* um homólogo nos mamíferos ao gene da *Drosophila* *Grainyhead*. Esta proteína é expressa em muitos tecidos epiteliais incluindo as células que estão a delimitar o ducto coclear durante a embriogénese¹¹⁴.

III. Gene *EYA4*

O gene *EYA4* (*Eyes Absent Homolog – Drosophila*) é um membro da família dos factores de transcrição *Eya4* e codifica um activador transcricional que interage com membros de outras famílias proteicas para regular o desenvolvimento precoce das células envolvidas na audição¹¹⁵.

1.5.2.1.5 Genes de Proteínas Adicionais

I. Gene *OTOF*

O gene *OTOF* codifica uma proteína designada otoferlina que interfere no tráfego e fusão das vesículas sinápticas¹¹⁶. Esta mutação causa uma surdez pré-lingual, autossómica recessiva (*DFNB9*).

II. Gene *DFNA5*

O gene *DFNA5* é um gene com função desconhecida, por este motivo tem esta designação. Uma inserção/ deleção neste gene causa uma forma de surdez autossómica dominante (*DFNA5*)¹¹⁷.

III. Gene *TMC1*

Os genes *TMC1* e *TMC2* são membros de uma família de genes que codifica proteínas transmembranares, que são fundamentais para o bom funcionamento das células ciliadas do ouvido interno. Mutações no gene *TMC1* são responsáveis por surdez autossómica dominante (*DFNA36*) e recessiva (*DFNB7/DFNB11*)¹¹⁸. Foram encontradas oito mutações associadas ao *DFNA36* e onze ao *DFNB7/11*¹¹⁸.

IV. Gene *TMPRSS3*

Alterações na proteína codificada pelo gene *TMPRSS3* (referida também como *ECHOS1*), que é uma protease serina transmembranar foram identificada como sendo a responsável por surdez congênita autossômica recessiva (*DFNB8/DFNB10*). Essa protease é expressa em muitos tecidos, incluindo a cóclea fetal¹¹⁹.

V. Gene *WFS1*

A wolframina é uma proteína transmembranar codificada pelo gene *WFS1*. Mutações neste gene são responsáveis por pelo Síndrome de Wolfram tipo 1, também designado de *DIDMOAD* mostrando a associação entre diabetes insipidus, diabetes mellitus, atrofia óptica e surdez¹²⁰. Esta proteína é também responsável por formas de surdez neurosensorial autossômica dominante (*DFNA6/14/38*)¹²¹.

VI. Gene *TMIE*

Uma proteína transmembranar expressa a nível do ouvido interno é codificada por este gene¹²².

VII. Gene *USH1C*

O gene *USH1C* codifica a harmonina. Este gene, quando mutado, é responsável pelo Síndrome de Usher tipo 1C, caracterizado por surdez profunda, retinite pigmentosa e disfunção vestibular., bem como por uma forma de surdez autossômica recessiva não sindrômica (*DFNB18*). A harmonina é uma proteína, que parece participar na organização dos complexos de macromoléculas associados a domínios específicos da membrana plasmática. Esta proteína é expressa quer a nível do olho, quer a nível coclear¹²³.

1.5.2.1.6 Genes Mitocondriais

Mutações no genoma mitocondrial, molécula circular de 16 569 pares de bases codifica 13 proteínas mitocondriais, 22 tipos de tRNA e 2 tipos de rRNA são responsáveis por múltiplas anomalias clínicas incluindo várias formas de neuropatias, miopatias, cardiomiopatias, degenerescência retiniana, diabetes mellitus e surdez (Fig 1.5).

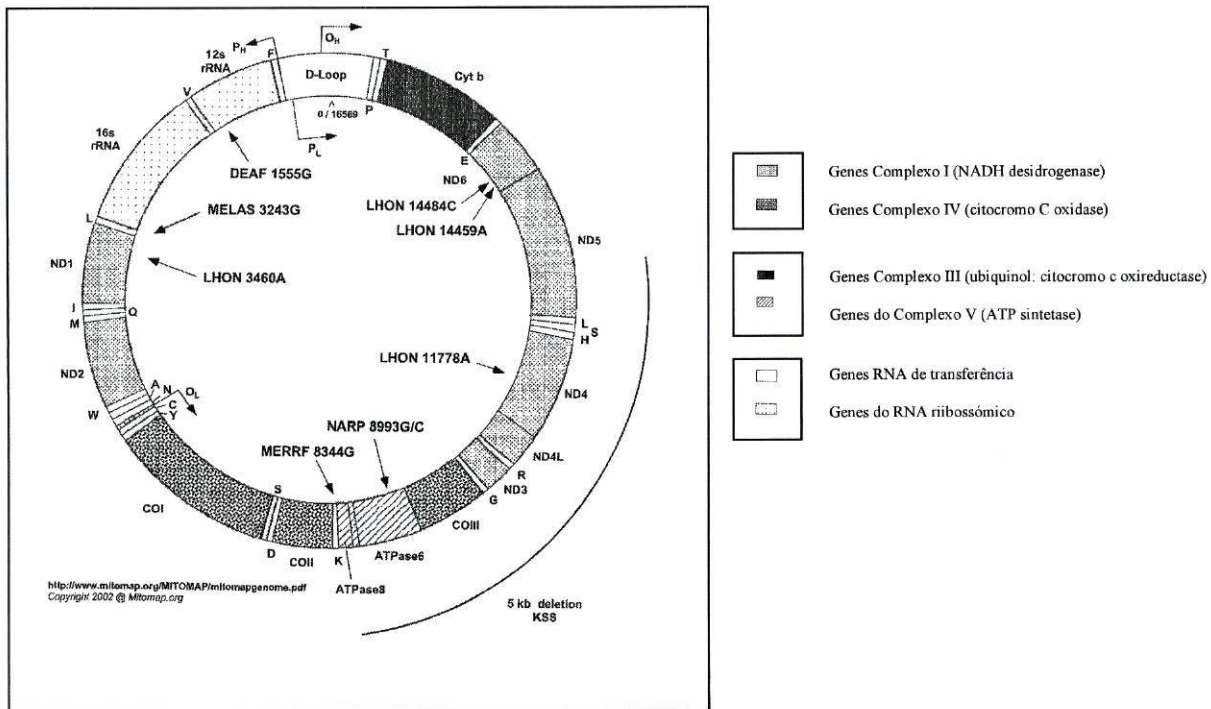


Figura 1-5 Genoma mitocondrial

A surdez progressiva ocorre em muitos doentes com doenças mitocondriais clássicas, como o Síndrome de MERRF (epilepsia e presença de fibras rotas vermelhas no exame histopatológico do músculo), o Síndrome de MELAS (Encefalopatia mitocondrial, acidose láctica e episódio semelhante a acidentes vasculares cerebrais), o Síndrome de Kearns-Sayre (KSS) com a tríade obrigatória de idade de início abaixo dos 20 anos, retinopatia pigmentar, oftalmoplegia externa progressiva e a Diabetes mellitus herdada por via materna associada a surdez (MIDD)^{124,125}. Em algumas famílias a surdez é o único sintoma de doença mitocondrial, sugerindo que a audição está dependente da função mitocondrial. Contudo, a surdez não sindrômica devida a mutações mitocondriais não é comum. Dois genes mitocondriais, o gene rRNA12S e o gene tRNA^{ser(UNC)} têm sido associados a surdez não sindrômica.

A mutação A1555G no gene rRNA12S causa surdez herdada por via materna com ou sem exposição prévia a aminoglicosídeos⁹. A existência desta mutação é uma causa frequente de surdez na Ásia e Espanha^{126,127}. A mutação A1555G é uma alteração homoplásmica (presente em todas as mitocôndrias) e altera o rRNA12S, assemelhando-o mais ao genoma ribossômico bacteriano, facilitando a ligação dos aminoglicosídeos e,

deste modo, os seus efeitos tóxicos no ouvido. Em famílias com surdez sem exposição aos aminoglicosídeos, a surdez parece estar associada a um gene modificador nuclear, que foi mapeado a nível do cromossoma 8¹²⁸.

A mutação A7445G no gene tRNA^{ser(UNC)} é a segunda mutação mais frequente no genoma mitocondrial para a surdez. Esta mutação pode ser a responsável por surdez não síndrómica, apesar da maioria dos doentes também terem queratoderma palmoplantar^{129,130}. Uma outra mutação no mesmo gene, inserção de uma citosina na posição 7472 (7472insC) pode também causar surdez não síndrómica progressiva e, numa minoria de doentes, pode originar surdez com manifestações neurológicas associadas incluindo ataxia, disartria e, noutros, mioclónus¹³¹. Outras mutações no gene tRNA^{ser}, substituição da timina por citosina na posição 7510 (T7510C) ou 7511 (T7511C) também podem originar surdez não síndrómica progressiva^{102,132}.

1.5.3 Surdez Não Síndrômica

Em seguida resume-se sob a forma de tabela os diferentes genes clonados para a Surdez Sensorioneural Não Síndrômica (Tabela 1.3, 1.4, 1.5 e 1.6), alguns deles previamente referidos com algum pormenor.

Tabela 1.3 Manifestações clínicas e genética molecular dos genes que causam Surdez Não Síndrômica Autossômica Dominante

DFNA	Locus	Gene	Início/ Década	Tipo	Frequência	Fenótipo	Referência
1	5q31	HDIA1	Pós-lingual/1 ^a	Progressiva	Baixa		100
2	1p35.1	GBJ3	Pós-lingual/2 ^a	Progressiva	Alta	Neuropatia sensorial com surdez; Eritroqueratodermia variabilis sem surdez	49
	1p34	KCNQ4					71
3	13q11-q12	GJB2	Pré-lingual	Estável	Alta	Queratoderma palmoplantar	68,69,70,71
	13q12	GJB6	Pós-lingual/1 ^a	Progressiva	Alta		50
5	7p15	DFNA5	Pré-lingual	Progressiva	Baixa		117
6/14/38	4p16.1	WFS1					121
8/12	11q22-q24	TECTA	Pré-lingual	Estável	Alta	-	14,105
9	14q12-q13	COCH	Pós-lingual/2 ^a	Progressiva	Média/ Todas	Doença de Menière	101,104
10	6q23	EYA4	Pós-lingual/3 ^a -4 ^a	Progressiva	Média/ Todas	-	115
11	11q13.5	MYO7A	Pós-lingual/1 ^a	Progressiva	Média/ Todas	Síndrome de Usher Tipo IB	86
13	6p21.3	COL11A2	Pós-lingual/2 ^a	Progressiva	Média/ Todas	Sdr. de Stickler; Sdr. Marshall	107
15	5q31	POU4F3	Pós-lingual	Progressiva	Baixa/ Todas	-	15
17	22q11.2	MYH9	Pós-lingual	Progressiva	Alta/ Todas	-	93
20/26	17q25	ACTG1	-	-	-	-	133
22	6q13	MYO6	Pós-lingual	Progressiva	Todas	-	88
28	8q22	TFCP2L3	Pós-lingual	Progressiva	Média/ Alta	-	114
36	9q13-q21	TMC1	Pós-lingual	Progressiva	Todas	-	118
48	12q13-q14	MYO1A	Pós-lingual	Progressiva	Todas	-	91

Tabela 1.4 Manifestações clínicas e genética molecular dos genes que causam Surdez Não Síndrômica Autossômica Recessiva

DFNB	Locus	Gene	Início	Tipo	Fenótipo	Referências
1	13q11-112	GJB2	Pré-lingual	Estável		39,40
	13q12	GJB6				61
2	11q13.5	MYO7A	Pré-lingual	Não específico	Síndrome de Usher Tipo IB	85,86
			Pós-lingual			
3	17p11.2	MYO15	Pré-lingual	Estável		87
4	7q31	PDS	Pré-lingual	Estável	Síndrome de Pendred	80
			Pós-lingual	Progressiva		
6	3p14-p21	TMIE	-	Estável		122
7/ 11	9q13-q21	TMC1	-	Estável		118
8/10	21q22.3	TMPRSS3	-	Estável Progressiva		119
9	2p22-p23	OTOF	Pré-lingual	Estável		116
12	10q21-q22	CDH23	Pré-lingual	Estável	Síndrome de Usher tipo ID	96
16	15q15	STRC	Pré-lingual	Estável		99
18	11p14-15.1	USH1C	Pré-lingual	Estável		123
21	11q	TECTA	Pré-lingual	Estável		106
22	16p12.2	OTOA	Pré-lingual	Estável		111
23	10p11.2-q21	PCDH15	-	-		108
29	21q22	CLDN14	Pré-lingual	Estável		83
30	10p11.1	MYO3A	Pré-lingual	Estável		90
31	9q32-q34	WHRN	-	-		109
36	1p36.3	ESPN	-	-		110
37	6q13	MYO6	-	-		89

Tabela 1.5 Manifestações clínicas e genética molecular dos genes que causam Surdez Não Síndrômica Ligada ao X

DFN	Locus	Gene	Início	Tipo	Frequência	Referências
1	Xq22	DDP	-	-	-	
2	Xq22	-	Pré-lingual	Estável	Todas	
3	Xq21.1	POU3F4	Pré-lingual	Estável	Todas	113
4	Xp21	-	Pré-lingual	Estável	Todas	
6	Xp22	-	Pós-lingual	Progressiva	Alta	
DFN	Locus	Gene	Início	Tipo	Frequência	Referências

Tabela 1.6 Surdez Não Síndrômica Mitocondrial

Gene	Mutação	Gravidade	Penetrância	Referências
12S rRNA	1555 A>G	Variável	Variável	9
	1494C>T	Variável	Variável	134
	961	Variável	Variável	135
tRNA ^{Ser} (UNC)	7445 A>G	Variável	Muito variável	129,130
	7472 ins C	Variável	Variável	131
	7510 T>C	Variável	Variável	136
	7511 T>C	Variável	Variável	132

1.5.4 Surdez Síndrômica

Mais de 400 Síndromes incluem surdez como uma das suas características^{137,138}. A Surdez Síndrômica pode contribuir para cerca de 30% das formas pré-linguais de surdez, mas a sua contribuição relativa para todas as formas de surdez é pequena (Tabela 1.13).

1.5.4.1 Autossômica Dominante

I. Síndrome de Waardenburg

O Síndrome de Waardenburg (SW) é a forma mais frequente de Surdez Síndrômica Autossômica Dominante. Foi descrito pela primeira vez em 1951 por um oftalmologista alemão.

Este síndrome consiste em vários graus de surdez sensorineural e anomalias pigmentares da pele, cabelo e olhos (heterocromia da íris). Há quatro tipos, actualmente reconhecidos: SW1, SW2, SW3 e SW4 (Tabela 1.7)

O SW1 e SW2 partilham muitas das características mas têm diferenças fenotípicas importantes: o SW1 é caracterizado pela presença de *distopia canthorum* (deslocação lateral do canto interno do olho), enquanto que o SW2 caracteriza-se pela sua ausência. O SW3 (Síndrome de Klein Waardenburg) é idêntico ao SW1 associando-se anomalias dos membros superiores; no SW4 (Síndrome de Waardenburg Shah) as alterações são semelhantes ao SW2 associando-se à existência da doença de Hirschsprung. Foram identificadas mutações no gene PAX3 no SW1 e SW3; mutações no gene MITF (*microphthalmia associated transcription factor*) causam alguns dos casos de SW2, enquanto que outros são causados por mutações no gene SNAI₂; mutações nos genes da endotelina 3 (EDN₃) e do seu receptor (EDNRB), bem como do SOX10 causam SW4.

Todos estes genes estão envolvidos no desenvolvimento embrionário. O gene PAX3 é membro de uma família de genes que codifica proteínas com uma estrutura semelhante aos factores de transcrição, os quais controlam a expressão de outros genes.

Tabela 1.7 Síndrome de Waardenburg (SW)

SW	Locus	Gene	Referências
1	2q35	PAX3	8
2	3p14.1-p12.3	MITF	139
2		SNAI ₂	140
3	2q35	PAX3	141
4	13q22	EDNRB	142
4	20q13.2-q13.3	EDN3	143
4	22q13	SOX10	144

II. Síndrome Branqui-oto-renal

Este é o segundo tipo mais frequente de Surdez Não síndrômica Autossômica Dominante (Tabela 1.8). Neste síndrome existe surdez de condução, sensorineural ou mista em associação com cistos das fendas branquiais, malformações do ouvido externo, incluindo fossetas pré-auriculares, e anomalias renais¹⁴⁵. A penetrância é elevada, mas a expressão é muito variável. Aproximadamente 40% das pessoas com um fenótipo branqui-oto-renal (BOR) têm mutações no gene EYA1, sugerindo que mutações noutros loci também possam causar este síndrome¹⁴⁶. O gene EYA1 é um gene homólogo ao gene *Drosophila eyes absent* (*eya*), de onde o seu nome deriva. Estudos efectuados sugerem o papel deste gene no desenvolvimento embrionário de todos os componentes do ouvido interno¹⁴⁶.

Tabela 1.8 Síndrome Branqui-oto-renal (BOR) e Branquio-ótico (BOS)

	Locus	Gene	Referências
BOR1	8q13.3	EYA1	146
BOR2	1q31	?	147
SBO3	14q21.3-q24.3	SIX1	148

III. Síndrome de Stickler

Este síndrome (STL) existe Surdez Neurosensorial Progressiva, fenda palatina, displasia espondiloepifisária, que resulta em osteoartrite. Este síndrome é relativamente comum e três tipos são reconhecidos baseados nos defeitos de genética molecular: STL1 (COL2A1)¹⁴⁹, STL2 (COL11A2)¹⁵⁰ e STL3 (COL11A1)¹⁵¹. O STL1 e STL3 têm miopia grave, que predispõe a descolamento retiniano, o que não acontece no tipo 2 dado o COL11A2 não ser expresso no olho (Tabela 1.9).

Tabela 1.9 Síndrome Stickler (STL)

STL	Locus	Gene	Referências
1	12q13.11-q13.2	COL2A1	149
2	6p21.3	COL11A2	150
3	1p21	COL11A1	151

IV. Neurofibromatose tipo 2

Esta forma de surdez é rara e quando surge é secundária a existência de schwannomas vestibulares bilaterais. A perda auditiva usualmente inicia-se na terceira década concomitantemente com o aumento do schwannoma vestibular, que é habitualmente unilateral e gradual, mas pode ser bilateral e súbito. Uma lesão retrococlear pode ser diagnosticada na avaliação audiológica, contudo o diagnóstico definitivo requer Ressonância Magnética Nuclear com gadolínio. Os indivíduos afectados têm risco acrescido de outros tumores, nomeadamente meningiomas, astrocitomas, epêndimomas e meningioangiomas. Mutações no gene NF2 são responsáveis por esta patologia²⁹.

1.5.4.2 Autossómica Recessiva

I. Síndrome de Usher

Esta é a forma mais comum de Surdez Síndrómica Autossómica Recessiva. Esta doença consiste em dois tipos de alterações sensoriais: surdez sensorineural e retinite pigmentar. As alterações visuais não são aparentes na primeira década de vida, fazendo com que o exame fundoscópico tenha utilidade limitada antes dos dez anos de idade. Contudo, o electroretinograma pode identificar alterações da função fotorreceptora em crianças entre os dois e quatro anos. Durante a segunda década a cegueira nocturna e a perda de visão periférica tornam-se evidentes e progridem inexoravelmente.

Três tipos distintos de Síndrome de Usher são definidos baseados no grau do défice auditivo, bem como nos resultados dos testes vestibulares.

O Síndrome de Usher tipo 1 é caracterizado por uma Surdez Congénita Sensorineural grave a profunda e disfunção vestibular. Nos indivíduos afectados a amplificação é ineficaz e habitualmente comunicam com as mãos. O défice vestibular faz com que haja atraso na aquisição de algumas das funções motoras, nomeadamente sentar e andar.

O Síndrome de Usher tipo 2 é caracterizado por Surdez Sensorineural ligeira a grave e função vestibular normal. Os aparelhos auditivos ajudam na amplificação e habitualmente estes doentes têm uma comunicação oral.

O Síndrome de Usher tipo 3 é caracterizado por Surdez progressiva e deterioração progressiva da função vestibular.

Existem vários genes identificados e envolvidos neste síndrome; na Tabela 1.10 pode-se observar os diversos tipos deste síndrome mediante o gene envolvido.

Tabela 1.10 Síndrome Usher (USH)

USH	Locus	Gene	Referências
1A	14q32	?	152
1B	11q13.1	MYO7A	85,153
1C	11p15.1	USH1C	154
1D	10q22.1	CDH23	96
1E	21q21	?	155
1F	10q21-2	PCDH15	156
1G	17q24-25	SANS	157, 158
2A	1q41	USH2A	159
2B	3p23-24.2	?	160
2C	5q14.3-q21.3	VLGR1	161
3	3q21q-25	USH3	162

II. Síndrome de Pendred

O Síndrome de Pendred é o segundo tipo mais comum de Surdez Autossômica Recessiva e caracteriza-se por uma surdez sensorioneural grave a profunda e bócio eutiroideu. O bócio não está presente na infância e desenvolve-se precocemente na puberdade (40%) e idade adulta (60%). A organificação atrasada do iodo na tiróide pode ser detectada pelo teste de descarga do perclorato. A surdez está associada a uma alteração a nível do labirinto ósseo (displasia de Mondini ou aqueduto vestibular dilatado), que pode ser detectada através da TAC dos ossos temporais. A função vestibular é anormal na maioria dos doentes. Podem ser pesquisadas mutações no gene PDS (SLC26A4)¹⁶³; apenas 50% de mutações são encontradas em múltiplas famílias.

III. Síndrome de Jervell e Lange-Nielsen

Este é o terceiro síndrome mais comum (Tabela 1.11). Este consiste em surdez congénita e intervalo QT prolongado detectado no electrocardiograma. Os doentes têm episódios de síncope e podem ter morte súbita. As crianças com elevado risco (história familiar de morte súbita, episódios de síncope, síndrome do QT longo) devem ser avaliadas sob o ponto de vista cardíaco. Foram detectadas mutações em dois genes.

Tabela 1.11 Síndrome Jervell e Lange-Nielsen (SJLN)

SJLN	Locus	Gene	Referências
1	11p15.5	KCNQ1	24
2	21q22.1-q22-2	KCNE1	164

1.5.4.3 Ligada ao X

I. Síndrome de Alport

Este síndrome é caracterizado por surdez sensorineural progressiva de vários graus, glomerulonefrite levando a doença renal terminal e achados oftalmológicos variáveis (lenticonus anterior). Usualmente a surdez não se manifesta antes dos dez anos de idade. Formas autossómicas dominantes, autossómicas recessivas e ligadas ao x são descritas, contudo esta última contribui com 85% dos casos e a autossómica recessiva cerca de 15% dos casos²⁹ (Tabela 1.12).

Neste síndrome há mutações nos genes dos colagénios COL4A3, COL4A4 e COL4A5, que são encontrados na membrana basal, ligamento apical e estria vascularis. A nível renal o adelgaçamento da membrana basal é responsável pelo quadro clínico. No ouvido, a nível do sulco apical, a perda da integridade da membrana basal pode afectar a adesão da membrana tectorial; a nível da membrna basilar e nas suas junções com o ligamento espiral existem também alterações, que perturbam a translacção da energia mecânica¹⁶⁵.

Tabela 1.12 Síndrome Alport

Síndrome Alport	Locus	Gene	Referências
1	Xq22	COL4A5	166
2	2q36-q37	COL4A3 COL4A4	167

II. Síndrome de Mohr-Tranebjaerg

Este síndrome também designado de Síndrome de surdez-distonia-atrofia óptica é uma doença caracterizada por surdez não sindrômica, pré ou pós-lingual, progressiva, alterações visuais, com diminuição progressiva da acuidade visual de início aos 20 anos, distonia progressiva ou ataxia nos adolescentes, fracturas e atraso mental e demência com instalação cerca dos 40 anos. O gene associado a este síndrome, TIMM8A (*mitochondrial import innermembrane translocase subunit TIM8A*) localizado em Xq22 está envolvido na translocação das proteínas do citosol ao longo da membrana mitocondrial e matriz mitocondrial¹⁶⁸.

III. Síndrome de Norrie

O diagnóstico desta doença pode ser difícil. As características clássicas incluem sintomas oculares específicos (pseudotumor da retina, hiperplasia da retina, hipoplasia e necrose da camada interna da retina, cataratas), surdez sensorioneural progressiva e atraso mental. Esta doença é causada por uma mutação no gene Norrie (NDP), localizado em Xp11.3, que codifica a proteína norrina, que parece estar envolvida na vascularização da cóclea e retina^{169,170}.

Tabela 1.13 Surdez Síndromica

Sdr.	Hereditar.	%	Clínica	Loci	Gene/Locus/Proteína	Função Gene
Pendred	AR	4-8	Surdez (100%), teste de descarga perclorido+ (95%), alterações radiológicas da cóclea (aqueduto vestibular aumentado, displasia de Mondini (85%)), bócio (80%), hipotireoidismo (40%)	1	PDS/ 7q22-31.1/ Pendrin	Transporte Cloro-Iodo
Usher	AR	3-6	Tipo1 (USH1AF): Surdez congénita grave a profunda, disfunção vestibular, retinite pigmentar com início dos sintomas na infância Tipo2 (USH2AC): Surdez moderada a grave, função vestibular normal, retinite pigmentosa de início tardio Tipo3 (USH3): Surdez progressiva, início variável de retinite pigmentar	10	(USH1B) MYO7A/ 11q13.5/ miosinaVIIa Harmonin (USH1D)CDH2 3/10q21-q22 USH2A/1q41	Miosina não convencional – Proteína semelhante à caderina
Branquio-oto-renal	AD	2	Surdez (90%), fossetas pré-auriculares (80%), anomalias renais (65%), , fistulas branquiais (50%), deformidades da pinnae (35%), estenose do canal auditivo externo (30%)	2	EYA/8q13.3	Factor transcricional envolvido do desenvolvimento do ouvido interno/ células metanéfricas do rim
Waardenburg	AD	1	Tipo I. Surdez (bilateral 20%, unilateral 15%), distopia canthorum (100%), ponte nasal alta e larga (90%), heterocromia da íris (35%), madeixa branca (30%), cinzento precoce (20%) Tipo II: Idêntico ao tipo I, mas sem distopia canthorum Tipo III (Klein-Waardenburg): Camptodactilia e outros defeitos dos membros superiores associadamente aos achados do tipo I Tipo IV (Shah-Waardenburg): Surdez, distúrbios pigmentares e doença de Hirschsprung	5	WSI e III: PAX3/2q35 WSII:MITF/3q14.1-p12.3 WSIV:EDNRB/13q22/receptor B da endotelina (mutações homocigóticas) SOX10/22q13/ (mutações heterocigóticas)	PAX3, SOX10 e MITF são factores transcricionais e são parte de uma cascata de proteínas responsáveis pelo desenvolvimento da pele, olho, ouvido interno, face, membros e crista neural A endotelina 3 e o receptor B da endotelina pertencem às vias de sinalização da endotelina
Alport	AR/ LXR	1	Hematúria que progride para insuficiência renal, achados electromicroscópicos do glomérulo típicos, anomalias oclares (lenticonus anterior, manchas maculares), elevada frequência de surdez neurosensorial	3	COL4A5/Xq22/ Colagénio IV alfa-5 (80%) COL4A3 e COL4A4/2q36q37/colagénioIV alfa 3 e 4 (AR)	Formação da membrana basal na cóclea, olho e rim
Fixação do Estapédio (DFN3)	LXR	0.5	Surdez mista com início na infância precocemente, anomalias vestibulares, fistula perilinfática após estapedotomia	1	POU3F4/Xq21	Factor transcricional
Jervell e Lange-Nielsen	AR	0.25	Surdez, intervalo QT prolongado no electrocardiograma, síncope, convulsões, morte súbita	2	KVLQT1/11p15.5 KCNE1/21q22.1-q22.2	Formação de um rectificador de potássio no ouvido interno

1.5.4.4 Mitocondrial

As mutações do DNA mitocondrial têm sido implicadas numa série de síndromes entre os quais Kearns-Sayre (KSS), MELAS, MERRF (Tabela 1.14) e a situações mais comuns como Diabetes mellitus, Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer.

Tabela 1.14 Surdez Sindrómica Mitocondrial

Gene	Mutação	Fenótipo	Referências
tRNA ^{Ser} (UNC)	7512T>C	Epilepsia mioclónica progressiva, ataxia e surdez	171
tRNA ^{Leu} (UUR)	3243A>G	MELAS e Sudez/ Diabetes herdada via materna (MIDD)	172
tRNA ^{Lys}	8344A>G	MERFF	173
	8356T>C	MERFF	174
	8296A>G	Sudez e Diabetes herdada por via materna (MIDD)	175
tRNA ^{Glu}	14709T>C	Sudez e Diabetes herdada por via materna (MIDD)	176
Vários	Grandes deleções	Síndrome de KSS	177
Vários	Deleções/ Duplicações	Sudez e Diabetes herdada por via materna (MIDD)	178

Estes dados dão-nos uma perspectiva global da grande diversidade de genes envolvidos na etiologia da surdez e do esforço actual da comunidade científica em identificar mais genes, assim como a localização das proteínas codificadas por esses genes a nível do ouvido interno, por forma a uma melhor compreensão da surdez e dos fenómenos que a motivam.

De tudo o que se referiu poder-se-ia dizer, uma forma simplificada, que na surdez não sindrómica, as formas autossómicas dominantes são pós-linguais e progressivas, as formas autossómicas recessivas são pré-linguais e estáveis e a surdez mitocondrial é progressiva, tendo uma idade de início muito variável.

2 OBJECTIVOS

Os objectivos deste trabalho foram: a caracterização clínica da população pediátrica com surdez neurosensorial, avaliada em consulta de otorrinolaringologia no Hospital Senhora da Oliveira em Guimarães; a aprendizagem das técnicas básicas de Genética Molecular (extracção do DNA, electroforese em géis de Acrilamida e de Agarose, PCR, RFLP e sequenciação automática); pesquisa no DNA mitocondrial (mtDNA) e no DNA nuclear, nas crianças com Surdez Não Sindrómica, das mutações mais comuns associadas à Surdez Neurosensorial; no mtDNA pesquisar as mutações no rRNA12S (A1555G, T1095C), no tRNA^{Leu(UUR)} (A3243G) e no tRNA^{Ser(UNC)} (A7445G, 7472insC, T7511C, T7510C); no DNA nuclear pesquisar a mutação 35delG no gene da conexina 26 (GJB2); em caso de positividade pesquisar a mutação del(GJB6-D13S1830) no gene da conexina 30 (GJB6). Paralelamente pesquisar a existência de infecção congénita por CMV através da pesquisa do DNA vírico no cartão do teste de Guthrie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Doentes

As crianças registadas, até Janeiro de 2004, com surdez neurosensorial na Consulta de Otorrinolaringologia do Hospital de Nossa Senhora da Oliveira em Guimarães foram convocadas para observação em Consulta de Genética no Instituto de Genética Médica Jacinto Magalhães, no Porto. O protocolo empregue foi aceite pela Comissão Consultiva do Instituto de Genética Médica, de acordo com a Legislação vigente. O Consentimento informado foi obtido dos pais das crianças envolvidas neste estudo.

Foram investigadas cinco das sete crianças convocadas, com idades compreendidas entre os dois e os onze anos, sendo uma do sexo feminino e as restantes do sexo masculino.

3.2 Estudo

Em cada criança foi obtida uma história clínica completa com registo da idade de início da doença. A pesquisa de possíveis causas ambientais de surdez (infecção maternofetal, parto pré-termo, complicações perinatais, meningite, parotidite ou outras infecções víricas pós-natais, drogas ototóxicas pré ou pós natais e trauma acústico) foi, igualmente, realizada. As crianças foram submetidas a um exame físico cuidado, com avaliação otoscópica e pesquisa sistemática de sinais sugestivos de surdez sindrómica (especialmente dismorfias, alterações cutâneas ou da coloração do cabelo, anomalias de coloração da íris e alterações tiroideias, cardíacas ou branquiais). Foram, também, submetidas a uma avaliação oftalmológica (incluindo fundoscopia), feita pesquisa de hematuria e proteinúria e realizado electrocardiograma. Todas as crianças haviam sido previamente avaliadas por otorrinolaringologista, com determinação do tipo de surdez e do défice auditivo presente.

3.3 Técnicas para Estudo Molecular

3.3.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído do sangue venoso colhido com anticoagulante (heparina de lítio). Foi utilizado o Kit QIAmp DNA Blood (QUIAGEN). A extração do DNA iniciou-se pela aplicação de Proteinase K, que permite a lise celular; a amostra digerida foi depois introduzida numa coluna com membranas de sílica que adsorvem o DNA.

Realizaram-se várias lavagens com soluções de características adequadas (concentração salina, pH) para remoção das proteínas e outros contaminantes, bem como a eluição final do DNA adsorvido. Este foi recolhido em tubo estéril e congelado (-20°C) até posterior utilização.

3.3.2 PCR

As sequências dos primers utilizados na amplificação dos fragmentos, que contêm a mutação 35delG no gene da Conexina 26 e as mutações 7472insC, T7510C, T7511C e A7445G no gene mitocondrial tRNA^{Ser} estão representadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Sequência nucleotídica dos primers utilizados na amplificação dos fragmentos do gene da Conexina 26 e do tRNA^{Ser}

Conexina 26	5' - 3'
Primer SN 26-F	TCTGTCCTAGCTATGTTCCCTGTG
Primer SN26-B2	CTCCTCGATGTCCTTAAATTC
Primer SN26-F1	GAGGAGAGAAGAGGAAGTTCAT
Primer SN26-B	CTCTCATGCTGTCTATTTCTTAATC
tRNA^{Ser}	5' - 3'
Primer F	TAATAGTAGAAGAACCCTCC
Primer B	GAGGGCGTGATCATGAAAGG

As condições usadas nestas amplificações estão descritas nas Tabelas.3.2 e Tabelas.3.3.

Tabela 3.2 Condições de PCR utilizadas na amplificação do fragmento que contém a mutação 35delG no gene da conexina 26

Reagentes Utilizados	Quantidade/ μL	Volume DNA/ μL	Volume Final/ μL	Programa Termociclador*
H ₂ O	18			
Tampão 10mM	2.5			T = 94°C 5'
DNTPs 2mM	2.5			T = 94°C 30'' ⁽¹⁾
MgCl ₂ 50mM	0.75	0.5	25	T = 60°C 30'' ⁽¹⁾
PrimerB 100pmol	0.25			T = 72°C 30'' ⁽¹⁾
PrimerF 100pmol	0.25			T = 72°C 5'
Taq polimerase	0.25			

(1) 30 ciclos

Tabela 3.3 Condições de PCR utilizadas na amplificação do fragmento que contém as mutações 7472insC, T7510C e T7511C no gene do tRNA^{Ser}

Reagentes Utilizados	Quantidade/ μL	Volume ADN/ μL	Volume Final/ μL	Programa Termociclador*
H ₂ O	18			
Tampão 10mM	2.5			T = 94°C 5'
DNTPs 2mM	2.5			T = 94°C 1'' ⁽¹⁾
MgCl ₂ 50mM	0.75	0.5	25	T = 55°C 1'' ⁽¹⁾
PrimerB 100pmol	0.25			T = 72°C 1'' ⁽¹⁾
PrimerF 100pmol	0.25			T = 72°C 5'
Taq polimerase	0.15			

(1) 25 ciclos

3.3.3 Sequenciação Automática

A sequenciação automática foi realizada num aparelho – ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Este tipo de sequenciação baseia-se no método desenvolvido por Sanger *et al* (1977) e recorre a nucleótidos terminadores da cadeia que são didesoxinucleótidos trifosfatados marcados com um fluorocromo na extremidade

3'(ddNTP [F]). O sequenciador detecta a fluorescência dos quatro didesoxinucleótidos, distinguindo os diferentes comprimentos de onda de luz emitida por radiação da amostra.

A análise das sequências foi feita com base na sequência do gene do tRNA^{Ser} disponível na base de dados www.mitomap.org e da Conexina 26 na base de dados <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc>.

A preparação das amostras (fragmentos de DNA amplificados por PCR) para sequenciação envolveu várias etapas:

1) Purificação da banda de DNA amplificado que começou por ser excisada e transferida para um *ependorf* com filtro (Quantum PrepTM Freeze Squeeze DNA Gel extraction Spin Columns), posteriormente colocada 5 minutos a -20°C e centrifugada a 10000 rpm durante 10 minutos.

2) PCR de sequenciação a partir da banda purificada. Os primers usados estão referidos na Tabela 3.1. As condições usadas neste PCR estão representadas nas Tabelas 3.2. e 3.3.

3) Purificação do produto amplificado, com remoção de dNTPs e oligonucleótidos excedentes. Para tal, precipitou-se o DNA com etanol (Riedel-de Háen) a 96% e MgCl₂ 2 mM (*Applied Biosystems*), seguindo-se uma centrifugação de 30 minutos a 14000 rpm, numa centrífuga refrigerada. Posteriormente, os pellets foram lavados com etanol a 70% e centrifugou-se novamente a 14000 rpm durante 15 minutos. No final o sobrenadante foi decantado e as amostras secas à temperatura ambiente, após o que foram conservadas a -20°C até se proceder à análise.

4) Preparação final da amostra para a injeção no sequenciador, que é dissolvida numa solução de características desnaturantes e de elevada viscosidade (*Applied Biosystems*).

3.4 PCR-RFLP para a detecção das mutações mitocondriais associadas à Surdez Neurosensorial – A1555G e T1095C e A3243G

3.4.1 PCR

As sequências dos primers utilizados na amplificação dos fragmentos que contêm os nucleótidos 1555, 1095 e 3243 estão representados na Tabela 3.4. As condições de PCR usadas nesta amplificação estão descritas nas Tabelas 3.5, 3.6 e 3.7.

Tabela 3.4 Sequência nucleotídica dos primers utilizados na amplificação dos fragmentos que contêm os nucleótidos 1555, 1095 e 3243

1555	5' - 3'
Primer F (1555 F)	CACAAAATAGACTACGAAAGTGGC
Primer B (1555 B)	ACTTACCATGTTACGACTGG
Enzima de Restrição (<i>Hae</i> III)	GC↓CC
1095	5' - 3'
Primer F (1095 F)	CCCAAGTCAATAGAAGCCGG
Primer B (1095 B)	AACTGTTGAGGTTTAGGGGT
Enzima de Restrição (<i>Hph</i> I)	GGTGA(N)₈↓
3243	5' - 3'
Primer F (Rsa 3123 F)	CCTCCCTGTACCAAAGGAC
Primer B (Rsa 3337 B)	GCGATTAGAATGGGTACAATG
Enzima de Restrição (<i>Hae</i> III)	GG↓CC

Tabela 3.5 Condições de PCR utilizadas na amplificação do fragmento que contém o nucleótido 1555

Reagentes Utilizados	Quantidade/ mL	Volume ADN/ mL	Volume Final/ mL	Programa Termociclador*
H2O	18			
Tampão 10mM	2.5			T = 94°C 5'
DNTPs 2mM	2.5	0.5	25	T = 94°C 30'' ⁽¹⁾
MgCl ₂ 50mM	0.75			T = 60°C 30'' ⁽¹⁾
PrimerB 100pmol	0.25			T = 72°C 30'' ⁽¹⁾
PrimerF 100pmol	0.25			T = 72°C 5'
Taq polimerase	0.25			

(1) 30 ciclos

Tabela 3.6 Condições de PCR utilizadas na amplificação do fragmento que contém o nucleótido 1095

Reagentes Utilizados	Quantidade/ mL	Volume ADN/ mL	Volume Final/ mL	Programa Termociclador*
H ₂ O	18			
Tampão 10mM	2.5			T = 94°C 5'
DNTPs 2mM	2.5	0.5	25	T = 94°C 1' ⁽¹⁾
MgCl ₂ 50mM	0.75			T = 55°C 1' ⁽¹⁾
PrimerB 100pmol	0.25			T = 72°C 1' ⁽¹⁾
PrimerF 100pmol	0.25			T = 72°C 5'
Taq polimerase	0.15			

(1) 25 ciclos

Tabela 3.7 Condições de PCR utilizadas na amplificação do fragmento que contém o nucleótido 3243

Reagentes Utilizados	Quantidade/ mL	Volume ADN/ mL	Volume Final/ mL	Programa Termociclador*
H ₂ O	18			
Tampão 10mM	2.5			T = 94°C 5'
DNTPs 2mM	2.5	0.5	25	T = 94°C 1' ⁽¹⁾
MgCl ₂ 50mM	0.75			T = 55°C 1' ⁽¹⁾
PrimerB 100pmol	0.25			T = 72°C 45''
PrimerF 100pmol	0.25			T = 72°C 5'
Taq polimerase	0.15			

(1) 25 ciclos

Para confirmar a amplificação efectuou-se uma electroforese das amostras num gel de agarose a 1% com brometo de etídio (*Merck*) em tampão TAE 1X a 115V durante 10 minutos.

3.4.2 Digestão e Electroforese

As condições em que foi feita a digestão dos produtos de PCR encontram-se descritas na Tabela 3.8.

As enzimas de restrição utilizadas são a *Hae* III (*Roche*) no caso das mutações A1555G e A3243G. Na mutação A1555G a enzima reconhece a sequência GG[^]CC criada pela

introdução de uma guanina na posição 1557. A enzima de restrição utilizada para pesquisa da mutação T1095C é a *Hph* I (*BioLabs*); nesta mutação a enzima reconhece a sequência GGTGA(N)₈, criada pela introdução de uma guanina na posição 1097 que corresponde à sequência normal.

Tabela 3.8 Apresentação das condições de digestão da PCR

Reagentes utilizados	Quantidade/ μ l	Período de Incubação/ h	Temperatura de incubação/ °C
Produto de PCR	8		
Tampão 10x	1	2	37
Enzima <i>Mvn</i> I 10U/ μ	1		

Após a incubação das amostras procedeu-se à preparação do gel de acrilamida. O procedimento encontra-se a seguir resumido:

Preparação do suporte do gel:

1. Colocar a parte hidrofílica do Gelbond® PAG Film (*Cambrex*) em contacto com a placa de vidro que contém os marcadores dos poços
2. Colocar \cong 20 μ l de SigmaCoat (*Sigma*) no vidro com poços
3. Juntar os vidros formando uma cassete.

Preparação do gel:

O conjunto de reagentes utilizado para a formação do gel de acrilamida a 12% encontra-se representado na Tabela 3.9. Esta mistura é pipetada para o suporte preparado anteriormente. Depois de ocorrer a polimerização, o gel é retirado da cassete.

Tabela 3.9 Preparação do Gel de Acrilamida a 12%

Reagentes para o gel de acrilamida	Quantidade
Tampão do gel	7 ml
Acrilamida 40%	3ml
Glicerol 87%	750 μ l
APS 10%	160 μ l
TEMED	24 μ l

Electroforese:

1. Pipetar 2 µl de amostra digerida, de amostra não digerida e de marcador de pesos moleculares nos respectivos poços;
2. Programar a temperatura do aparelho de electroforese (*Multiphor*) para 12°C;
3. Transferir o gel para a placa de electroforese;
4. Colocar tiras de papel de filtro *Whatman 17 Chr* embebidas em tampão (Tris-glicina 125mM; pH 8.8) com corante (Azul bromofenol – *Applied Biosystems*) na linha anterior aos poços e no extremo oposto as tiras com tampão sem corante;
5. A voltagem é 195V até o corante passar os poços e depois é alterada para 250V.

3.4.3 Coloração com Nitrato de Prata

Esta coloração foi preparada segundo o referido na Tabela 3.10.

Tabela 3.10 Etapas para a coloração com Nitrato de Prata com agitação

Reagente Utilizado	Tempo de Reacção	Função
Etanol 10%	10´	Fixação
Ácido nítrico 1%	5´	Ácidificação
Lavar com água destilada	Lavar com água destilada	Lavagem
AgNO ₃ 0.2%	20´ (escuro)	Exposição à Prata (Ag ⁺)
Lavar com água destilada	Lavar com água destilada	Lavagem
Carbonato de Sódio 0.28M+	Até aparecerem bandas	Precipitação do Ag sobre as bandas
Formaldeído 0.02%		Paragem da reacção
Ácido acético 10%	2´	Lavagem
Lavar com água corrente	Lavar com água corrente	

Esta coloração torna possível a visualização das bandas, cujo padrão se encontra referido em seguida.

Mutação Surdez A1555G:

- Sem corte: 339pb
- Normal: 216pb+**123pb**
- Mutado: 216pb+**93pb+30pb**

Mutação Surdez T1095C:

- Sem corte: 201pb
- Normal: 143pb+31pb+27pb
- Mutado: 114pb+29pb+31pb+27pb

Mutação MELAS A3243G:

- Sem corte: 238pb
- Normal: 169pb+37pb+32pb
- Mutado: 97pb+72pb+37pb+32pb

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Aspectos Clínicos

As crianças estudadas foram cinco, uma do sexo feminino e quatro do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 2 e os 11 anos (Tabela 4.1). Dois dos doentes convocados não compareceram à consulta por motivos desconhecidos. Todas as crianças apresentavam surdez neurosensorial diagnosticada por otorrinolaringologista (Tabela 4.2).

Tabela 4.1 Caracterização Epidemiológica das Crianças estudadas

Doentes	Sexo	Idade	Naturalidade
A	Masculino	2 Anos	Fafe
B	Masculino	10 Anos	Fafe
C	Feminino	6 Anos	Guimarães
D	Masculino	11 Anos	Guimarães
E	Masculino	3 Anos	Guimarães

Tabela 4.2 Caracterização da Surdez Neurosensorial

Doentes	Surdez	Ouvido direito/esquerdo	Apoio auditivo
A	Neurosensorial, Pré-lingual	100dB/ 100 dB	Amplificador
B	Neurosensorial, Pré-lingual	40 dB/ 80 dB	Amplificador
C	Neurosensorial, Pré-lingual	70 dB/ 90 dB	Amplificador
D	Neurosensorial, Pré-lingual	70 dB/ 80 dB	Amplificador
E	Neurosensorial, Pré-lingual	100 dB/ 90 dB	Transplante Cóclear

Em relação aos antecedentes pessoais de realçar o caso A de uma criança prematura, que foi também a que teve maiores complicações perinatais (suspeita clínica de sépsis com necessidade de recurso à antibioterapia com aminoglicosídeos e hiperbilirrubinemia com necessidade de fototerapia, além de complicações pulmonares inerentes à prematuridade). Uma outra criança (caso B) teve um atraso do crescimento intra-uterino de causa não esclarecida. O sofrimento fetal relatado como uma bradicardia fetal ocorreu numa das crianças (caso E). Em nenhuma das mães houve relato de consumo abusivo de

álcool e drogas ou necessidade de ingestão de fármacos; em apenas uma das mães havia registo das serologias para o CMV durante os dois primeiros trimestres da gravidez (caso E) (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 Antecedentes Pessoais das Crianças estudadas

Doentes	Antecedentes Pessoais
A	Prénatais: Serologias maternas sem alterações; sem serologia para CMV Peri e Neonatais: Pre-termo de 29 semanas (Peso<1500); Apgar 7/9, Hiperbilirrubinemia, Gentamicina. Pós-natais: Atraso do desenvolvimento motor e da linguagem
B	Prénatais: Serologias maternas desconhecidas. Peri e Neonatais: Parto de termo. Leve para Idade Gestacional (1990g) Apgar? Pós-natais: Atraso do desenvolvimento psico-motor
C	Prénatais: Serologias maternas sem alterações; sem serologia para CMV Peri e Neonatais: Parto de termo. Adequado à Idade Gestacional. Apgar 9/10 Pós-natais: Atraso da linguagem
D	Prénatais: Serologias maternas desconhecidas. Peri e Neonatais: Parto de termo. Adequado à Idade Gestacional. Apgar ? Pós-natais: Atraso da linguagem
E	Prénatais: Serologias maternas sem alterações; Não Imune ao CMV Peri e Neonatais: Parto de termo. Adequado à Idade Gestacional. Apgar 6/8/10 Pós-natais: Atraso do desenvolvimento psicomotor

Tabela 4.4 Antecedentes Familiares

Doentes	Antecedentes Familiares
A	Pais jovens, não consanguíneos Primo em 1º Grau ex-prematuro com surdez
B	Pais jovens, não consanguíneos Mãe com depressão e miopia Irmã com epilepsia controlada e miopia
C	Pais jovens, não consanguíneos
D	Pais jovens, não consanguíneos
E	Pais jovens, não consanguíneos

De entre as crianças estudadas, nenhuma apresentava estigmas de surdez síndrómica. Todas as crianças foram avaliadas por um oftalmologista, que não detectou alterações, excepto na criança referida no caso C, que apresentava miopia.

4.2 Aspectos Laboratoriais

Os estudos laboratoriais e imagiológicos efectuados revelaram-se todos eles negativos. Foi, então, efectuada a pesquisa das mutações mais frequentes associadas à surdez, quer no DNA nuclear, quer a nível do mtDNA. Paralelamente, foi efectuada a pesquisa de infecção congénita por CMV no cartão do teste de Guthrie realizada no Hospital da Cova da Beira, na Covilhã.

As mutações pesquisadas no mtDNA e nuclear foram todas elas negativas. Em relação à pesquisa do CMV por PCR, houve apenas um caso de positividade (doente E); a infecção congénita por este agente foi responsável pela surdez profunda detectada neste doente.

4.3 Discussão

Este trabalho dá-nos uma perspectiva global da importância de uma avaliação clínica individualizada face a uma criança com surdez, apesar do número de casos relatados ser muito escasso. Apesar das mutações pesquisadas nestas crianças terem sido negativas, é actualmente consensual a importância de um investimento na pesquisa das mutações mais frequentes associadas à surdez. O único estudo efectuado em Portugal, até à data, com a determinação das mutações mais frequentes associadas à surdez neurosensorial foi efectuado em 2003 e os resultados relatados em 2004¹⁷. Nesse estudo, realizado com 65 doentes portugueses com surdez neurosensorial detectou-se a existência da mutação 35delG localizada no gene GJB2 em 25% dos doentes, seguida de mutações encontradas no mtDNA¹⁷. Em estudos efectuados em populações saudáveis de Espanha e Itália, a prevalência de portadores heterozigóticos para 35delG é de 2.5% a 4%, igualando a mutação $\Delta F508$ do gene CFTR, que origina a Fibrose Quística⁵⁵. Este dado explica a elevada prevalência nos doentes com surdez neurosensorial, não sindrómica pré-lingual, de mutações no gene GJB2, que pode atingir os 50% em várias populações⁵², e a mutação 35delG representa 70% de todas as mutações da conexina 26⁵².

A infecção congénita por CMV, detectada num dos casos, sabe-se ser, actualmente, a causa vírica mais comum de malformações congénitas em países desenvolvidos³¹. Desde o ano 2000 a possibilidade do diagnóstico de infecção congénita por CMV a partir da pesquisa desde virus, por PCR, no Cartão de Guthrie permitiu um avanço significativo na

detecção, à posteriori, desta infecção ocorrida in utero¹⁷⁹. Este teste tem uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 99%, o que o torna um teste de eleição na detecção da infecção congénita por este agente¹⁷⁹.

Todos os estudos efectuados demonstram que, pela primeira vez, no campo da surdez existe a preocupação com o reconhecimento da gravidade desta alteração, com o diagnóstico clínico e com a investigação básica, estando unidos para responder às questões de como e porquê um indivíduo se torna surdo.

Dada a elevada prevalência de surdez nos humanos, a identificação de genes relacionados com esta alteração, através da pesquisa laboratorial dos mesmos, assim como através do diagnóstico de causas particulares de surdez a nível clínico, são necessários para a compreensão completa da complexidade do órgão auditivo, bem como para a sua preservação e restituição da sua funcionalidade¹⁸⁰. Deste modo, existe a possibilidade da divisão dos vários defeitos sensorineurais em várias entidades nosológicas. Incluída nessa caracterização deve estar a idade de início, o grau de gravidade, a forma das curvas audiométricas, a progressão da doença e as variações fenotípicas inter e intrafamiliares. Em adição, informação respeitante à associação possível com disfunção vestibular, bem como a presença/ausência de anomalias cocleares detectáveis por Tomografia Computorizada devem estar disponíveis. A detecção de défices auditivos ligeiros em possíveis portadores é importante face à possibilidade da existência de uma surdez autossómica recessiva¹⁸¹.

Até à data a maioria da informação disponível diz respeito a formas autossómicas dominantes de surdez, vivendo as famílias estudadas em países desenvolvidos. Em contraste, dados mais escassos existem, respeitantes a formas autossómicas recessivas, na medida em que as famílias consanguíneas vivem, principalmente nos países subdesenvolvidos. A escassez de dados é de lamentar, na medida em que, uma descrição clínica detalhada é um pré-requisito para guiar a investigação futura de mutações num determinado gene em causa e permitir subsequentemente o aconselhamento genético. Pelos mesmos motivos dados epidemiológicos respeitantes a formas hereditárias de surdez são raros. No entanto, grandes avanços no campo médico permitiram uma rápida determinação da origem genética da surdez num grande número de casos. Isto ocorreu pela identificação de dois genes, que frequentemente originam surdez, apesar da grande heterogeneidade destas formas.

O gene da conexina 26, com um simples exão codificador, o que facilita a pesquisa de mutações. Dada a elevada prevalência de mutações neste gene, o aconselhamento genético dos surdos é, provavelmente, o maior benefício na pesquisa da surdez. Em contraste com outros defeitos sensoriais, nomeadamente deficiências da retina, as causas ambientais frequentemente estão por detrás de formas de surdez. Deste modo, quando confrontados com um caso único de surdez isolada numa família que interroga acerca do risco de recorrência do defeito, apenas o diagnóstico molecular pode confirmar a origem genética. A descoberta que as mutações no gene da conexina 26 são responsáveis por uma proporção elevada de formas isoladas de surdez é de considerável ajuda no aconselhamento genético, uma vez que a etiologia genética pode, actualmente, ser detectada em famílias com uma única criança afectada. Em relação à discussão ética ela deve tomar em consideração, por um lado, a qualidade de vida que uma criança surda pode ter com uma educação apropriada, apoio auditivo e implantes cocleares e, por outro lado, a gravidade do defeito auditivo.

O segundo gene *rRNA12S*, tem a mutação A1555G, que é responsável quer por formas isoladas de surdez sensorineural, quer por surdez induzida pelo tratamento com aminoglicosídeos. Do mesmo modo, grande parte da informação respeitante a esta mutação é derivada da população europeia, nomeadamente espanhola. Assumindo que a mutação A1555G também é frequente noutras populações, a sua descoberta deverá ter aplicação médica imediata na prevenção do uso futuro dos aminoglicosídeos. Este trabalho realça a importância da pesquisa na história clínica de todos os membros da família da criança, que são candidatos a tratamento com estes antibióticos.

Desta forma, esta investigação poderá resultar num futuro próximo, no desenvolvimento de novos tratamentos. Os tratamentos disponíveis, até à data, são a amplificação do som ou a estimulação do núcleo ou nervo coclear através de implantes auditivos no tronco cerebral ou coclear, respectivamente.

5 CONCLUSÃO

Actualmente conhece-se através do isolamento de alguns genes causadores de surdez as anomalias celulares, fisiológicas e do desenvolvimento que estão na origem da surdez hereditária. Consequentemente o desenvolvimento de novos tratamentos apenas será possível quando a mínima quantidade de conhecimento respeitante a cada um destes processos alterados se acumular.

Esforços paralelos para induzir a regeneração das células do ouvido interno e para introduzir genes de substituição através de vectores virais¹⁸², poderão ser uma via de investigação.

Agradecimentos

Agradeço às famílias que aceitaram participar neste estudo. Agradeço à minha orientadora Doutora Laura Vilarinho, pois sem o seu dinamismo e disponibilidade este trabalho não existiria. Agradeço à Dra Margarida Reis Lima, Dra Ana Fortuna, Dra Márcia Martins, Dra Gabriela Soares e Dr Jorge Pinto-Basto pela sua colaboração clínica. Agradeço às Técnicas de Biologia Clínica Dra Cristina Pereira pela disponibilidade no ensino das técnicas de Biologia Molecular, bem como na ajuda fulcral, que me proporcionou, juntamente com a Dra Célia Nogueira na obtenção dos resultados. Este trabalho foi exequível pelos dados que me foram, inicialmente, fornecidos pelo Dr Rui Fonseca do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Senhora da Oliveira - Guimarães. O encorajamento das minhas orientadoras de internato Dra Delfina Coelho e Dra Maria José Costeira foi muito importante. Sem dúvida, que o partilhar experiências e dificuldades com a minha colega Micaela Guardiano, até à finalização desta tese, foi um reforço positivo em todos os momentos. Ao José Nunes agradeço a sua presença, o seu tempo e a ajuda técnica preciosa. Termino por agradecer aos meus pais e irmãos por todo o tempo, carinho e compreensão.

BIBLIOGRAFIA

1. National Center for Health Statistics. Current estimates from the National Health Interview Survey, 1989. Vital and Health Statistics. Series 10. No. 176. Washington, D.C.: Government Printing Office, 1990. (DHHS publication no. (OHS) 90-1504)
2. Cohen MM Jr, Gorlin RJ. Epidemiology, etiology and genetic patterns. In Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM Jr, eds. Hereditary hearing loss and its syndromes. Oxford monographs on medical genetics. No. 28. New York: Oxford University Press, 1995: 9-21
3. Stein LK. Factors influencing the efficacy of universal newborn hearing screening. *Pediatr Clin North Am* 1999, 46: 95-105
4. Petit C, Levilliers J, Hardelin JP. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Ver Genet* 2001, 35: 589-646
5. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS and Nance WE. Genetic Epidemiological Studies of early-onset deafness in the US school age population. *Am J Med Genet* 1993; 46: 486-491
6. Coutinho MB. Surdez Infantil – Etiologia e seguimento. *Nascer e Crescer* 2002; 11(4): 254-260
7. Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow L, Oliphant AR, Gerken SC et al. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 1990; 248: 1224-1227
8. Tassabehji M, Read AP, Newton VE, Harri R, Balling R, Gruss P, Strachan T. Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of Pax-3 paired box gene. *Nature* 1992; 355(6361): 590-591
9. Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 1993; 4: 289-294

10. Robertson NG, Kheterpal U, Gutierrez-Espelata GA, Bieber FR, Morton CC. Isolation of novel and known genes from a human fetal cochlear cDNA library using subtractive hybridization and differential screening. *Genomics* 1994; 23: 42-50
11. Skvorak AB, Weng Z, Yee AJ, Robertson NG, Morton CC. Human cochlear expressed sequence tags provide insight into cochlear gene expression and identify candidate genes for deafness. *Hum Mol Genet* 1999; 8(3): 439-452
12. Avraham KB, Hasson T, Steel KP, Kingsle DM, Russell LB, Mooseker MS, Copeland NG, Jenkins NA. The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat Genet* 1995; 11: 369-375
13. Gibson F, Walsh J, Mburu P, Varela A, Bro KA, Antonio M et al. A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. *Nature (London)* 1995; 374: 62-64
14. Verhoeven K, Van Lear L, Kirschhofer K, Legan PK, Hughes DC, Schatteman I et al. Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet* 1998; 19: 60-62
15. Vahava O, Morell R, Lynch ED, Weiss S, Kagan ME, Ahituv N et al. Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Scien* 1998; 279: 1950-1954
16. Mota VL. *Genética da Surdez Hereditária*. Janeiro 1998
17. Nogueira C, Pereira C, Coutinho M, Barbot C, Santorelli FM, et al. Surdez Neurosensorial não síndrômica – Estudo de 65 doentes portugueses (Póster). XL Conferências de Genética: Novas perspectivas de Rastreio, Diagnóstico e Tratamento das Doenças Hereditárias do Metabolismo. Janeiro 2004 (Porto).
18. Willems PJ. Mechanisms of Disease. Genetic Causes of Hearing Loss. *N Engl J Med* 2000, 342: 1101-1109
19. Hudspeth AJ. How the ear's works work. *Nature* 1989, 341: 397-404
20. Tekin M, Arnos KS, Pandya ^a Advances in Hereditary deafness. *Lancet* 2001; 358: 1082-1090

21. Nobili R, Mammano F, Ashmore J. How well do we understand the cochlea? Trends Neurosci 1998, 21 :159-167
22. Coucke PJ, Van Hauwe P, Kelley PM, et al. Mutations in the KCNQ4 gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families. Hum Mol Genet 1999; 8: 1321-1328
23. Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H et al. KCNE1 mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. Nat Genet 1997 ; 17 :267-268
24. Neyroud N, Tesson F, Denjoy I et al. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. Nat Genet 1997; 15:186–189
25. Skvorak GAB, Morton CC. Genetic causes of nonsyndromic hearing loss. Curr Opin Pediatr 1999; 11: 5551-557
26. Parving A, Newton V. Guidelines for description of inherited hearing loss. J Audiol Med 1995, 4: 2-5
27. Gregg RB, Wlorek LS, Arvedson JC. Pediatric Audiology – Review. Pediatr Ver 2004; 25 (7): 224-233
28. Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Home page. World Wide Web URL: <http://www.uia.ac.be/dnalab/hhh>
29. Smith RJD, Green GE, Camp GV. Hereditary Hearing Loss and Deafness Overview. Gene Reviews 2003. World Wide Web URL: <http://www.geneclinics.org>
30. Coutinho MB, Santos MR, Matos C. Métodos de Avaliação da Audição em Pediatria. Nascer e Crescer 2001; 10 (1): 35-41
31. Demmler GJ. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. Rev Infect Dis 1991; 13:315–329.
32. Fowler KB, Dahle AJ, Boppana SB, Pass RF. Newborn hearing screening: Will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? J Pediatr 1999; 135: 60-64

33. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Eng J Med* 1992; 326: 663-667
34. Peckham CS, Stark O, Dudgeon JÁ et al: Congenital Cytomegalovirus Infection: A cause of sensorineural hearing loss. *Arch Dis Child* 1985; 62: 1233
35. Roizen NJ, Johnson D: Congenital infections. In Capute AJ, Accardo PJ (eds): *Developmental Disabilities in Infancy and Childhood*, ed2. Baltimore, Paul H Brookes, 1996; p 175
36. Roizen NJ. Etiology of Hearing Loss in Children – Non Genetic Causes. *Pediatr Clin North Am* 1999; 46(1): 49-64
37. Escobar GM, Obregon MJ, del Rey FE. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia? *J Clin End Metab* 2000; 85: 3975-3987
38. Lavado-Antric R, Anso E, Garcia-Velasco JV, Arufe MC, del Rey FE, Escobar GM. Early maternal hypothyroxinemia alters histogenesis and cerebral cortex cytoarchitecture of the progeny. *J Clin Invest* 2003; 222 (7): 1073-1082
39. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997, 394 (6694): 80-83
40. Denoyelle F, Marlin S, Weil D, Moatti L, Chauvin P, Garabédian E, et al. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, *DFNB1*, due to a connexin 26 gene defect: implications for genetic counselling. *The Lancet* 1999, 353: 1298-1303
41. Guilford P, Bem Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahia A et al. A non-syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet* 1994, 6: 24-28
42. Falk MM, Kumar NM, Gilula NB. Membrane insertion of gap-junction connexins: polytopic channel-forming membrane proteins. *J Cell Biol* 1994, 127: 343-355

43. Goodenough DA, Goliger JÁ, Paul DL. Connexins, connexons and intercellular communication. *Ann Ver Biochem* 1996, 65: 475-502
44. Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell* 1996, 84: 381-388
45. Kikuchi T, Adam JC, Miyabe Y, So E, Kobayashi T. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc* 2000, 33: 51-56
46. Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Takasaka T, Adams JC. Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Brain Res Ver* 2000, 32: 163-166
47. Lefebvre PP, Van De Water TR. *Brain Res Brain Res Ver* 2000, 32: 159-162
48. Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Adams JC. Gap junction system in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol (Berl)* 1995, 191:101-118
49. Xia JH, Liu CY, Tang BS, Pan Q, Huang L, Daí HP, et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein β -3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat Genet* 1998, 20: 370-373
50. Grifa A, Wagner C, Dámbrósio L, Melchionda S, Bernardi F, López-Bigas N, et al. Mutations in *GJB6* cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet* 1999, 23: 16-18
51. Connexin-Deafness Homepage. World Wide Web URL: <http://www.crg.es/deafness/>
52. Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum Mutat* 2000, 16: 190-202
53. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, et al. Prelingual deafness : high prevalence of a 30delG mutation in th connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 1997, 6 : 2173-77
54. Zellante L, Gasparini P, Estivill X, et al. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (*DFNB1*) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 1997, 6: 1605-1609

55. Worldwide Survey of the $\Delta F508$ mutation. Report from the cystic fibrosis genetic analysis consortium. *Am J Hum Genet* 1990, 47: 354-59
56. Morel RJ, Kim HJ, Hood LJ, et al. Mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) among Ashkenazi Jews with non-syndromic recessive deafness. *N Engl J Med* 1998; 339: 1500-1505
57. Fuse Y, Doi K, Hasegawa T, Sugii A, Hibino H, et al. *Neuroreport* 1999; 10(9): 1853-7
58. Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. Prevalent connexin 26 gene (*GJB2*) mutations in Japanese. *J Med Genet* 2000; 37: 41-43
59. Kudo T, Ikeda K, Kure S, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) responsible for childhood deafness in Japanese population. *Am J Med Genet* 2000; 90: 141-145
60. Lerer I, Sagi M, Bem-Neriah Z, Wang T, Levi H, Abeliovich D. A deletion mutation in *GJB6* cooperating with a *GJB2* mutation in trans in non-syndromic deafness: a novel founder mutation in Ashkenazi jews. *Hum Mutat* 2001, 16: 460
61. del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Álvarez A, Tellería D, et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 2002, 346 (4) : 243-249
62. Pallares-Ruiz N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M, Roux AF. A large deletion including most of *GJB6* in recessive nonsyndromic deafness: a digenic defect? *Eur J Hum Genet* 2002, 10: 72-76
63. Lautermann J, Frank HG, Jahnke K, Traub O, Winterhager E. Developmental expression patterns of connexin 26 and 30 in the rat cochlea. *Dev Genet* 1999, 25:306-311
64. Lautermann J, Cate WJ, Altenhoff P, Grummer R, Traub O, Frank HG, et al. Expression of the gap junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea. *Cell Tissue Res* 1998, 294: 415-420

65. Dahl E, Manthey D, Chen Y, Schwarz HJ, Chang YS, Lalley PA, et al. Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *J Biol Chem* 1996, 271: 17903-17910
66. Teubner B, Michel V, Pesch J, Lautermann J, Cohen-Salmon M, Sohl G, et al. Connexin 30 (GJB6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum Mol Genet* 2003, 12: 13-21
67. del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Brownstein Z, Marlin S, Adina Q, et al. Report – Prevalence and Evolutionary Origins of the del (*GJB6*-D13S1830) Mutation in the *DFNB1* Locus in Hearing-Impaired Subjects: a Multicenter Study. *Am J Hum Genet* 2003, 73: 1452-1458
68. Denoyelle F, Lina-Granade G, Plauchu H, Bruzzone R, Chaib H, Levi-Acobas F, et al. Connexin 26 gene linked to dominant deafness. *Nature* 1998; 393: 319-320
69. Hamelmann C, Amedofu GK, Albrecht K, Muntau B, Gelhaus A, Brobby GW et al. Pattern of connexin 26 (GJB2) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana. *Hum Mutat* 2001 ; 18 : 84-85
70. Chaib H, Place C, Salem N, Chardenoux S, Vincent C, et al. A gene responsible for a sensorineural nonsyndromic recessive deafness maps to chromosome 2p22-23. *Hum Mol Genet* 1996; 5(1): 155-8
71. Richard G, White TW, Smith LE, Bailey RA, Compton JG, et al. Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. *Hum Genet* 1998; 103(4): 393-9
72. Tekin M, Arnos KS, Xia XJ, et al. W44C mutation in the connexin 26 gene associated with dominant non-syndromic deafness. *Clin Genet* 2001; 59: 269-273
73. Kelsell DP, Di W, Houseman MJ. Connexin Mutations in Skin Disease and Hearing Loss. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 559-568
74. Liu XZ, Xia XJ, Xu LR, Pandya A, Liang CY, et al. Mutations in connexin 31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 63-67

75. Richard G, Smith LE, Bailey RA, Itin P, Hohl D, et al. Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis. *Nat Genet* 1998; 20(4): 366-9
76. López-Bigas N, Olivé M, Rabionet R, Bem-David O, Martínez-Matos JÁ, et al. Connexin 31 (GJB3) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment. *Hum Molec Genet* 2001; 10(9): 947-952
77. Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, et al.. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 1993; 262:2039-42
78. Reardon W, Coffey R, Phelps PD, et al. Pendred Syndrome – 100 years of underascertainment? *QJM* 1997; 90: 443-447
79. Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karnishki LP. The Pendred Syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* 1999 ; 21 :440-443
80. Li XC, Everett LA, Lalwani AK, et al. A mutation in PDS, the gene responsible for Pendred Syndrome, also causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 1998; 18: 215-217
81. Kubisch C, Schroedes BC, Friedrich T, et al. KNCQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 1999; 96: 437-446
82. Epstein FH. Genetic Causes of Hearing Loss. *N Eng J Med* 2000; 342 (15): 1101-1109
83. Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, et al. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 2001; 104 (1): 165-172
84. Lui XZ, Walsh J, Tamagawa Y, et al: Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nat Genet* 1997; 17: 268-269
85. Weil D, Polonca K, Blanchard S, et al. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and Usher 1B Syndrome are allelic defects of the myosin VIIA gene. *Nat Genet* 1997 ; 16 : 191-193
86. Liu XZ, Walsh J, Mburu P, et al. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 1997; 16: 188-190

87. Wang A, Liang Y, Frieddell RA, Probst FJ, Wilcox ER, Touchman JW, et al. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human non-syndromic deafness DFNB3. *Science* 1998; 280: 1447-1451
88. Avraham KB, Hasson T, Steel KP, Kingsley DM, Russel LB, et al. The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes na unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cell. *Nat Genet* 11: 369-375
89. Ahmed ZM, Morell RJ, Riazuddin S, Gropman A, Shaukat S, et al. Mutations of MYO6 are associated with Recessive Deafness, DFNB37. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1315-1322
90. Walsh T, Walsh V, Vreugde S, Hertzano R, Shahin H, et al. From flies' eyes to our ears: mutations in a humam classe III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7518-7523
91. Donaudy F, Ferrara A, Esposito L, Hertzano R, Bem-David O, et al. Multiple Mutations of MYO1A, a Cochlear-Expressed Gene, in Sensorineural Hearing Loss. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1571-1577
92. Seri M, Pecci A, Di Bari F, Cusano M, Savino M, et al. MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine* 2003; 82; 203-215
93. Lalwani AK, Goldstein JÁ, Kelley MJ, Luxford W, Castelein CM, et al. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1121-1128
94. Donaudy F, Snoeckx R, Pfister M, Zenner HP, Blin N, et al. Nonmuscle Myosin Heavy-Chain Gene MYH14 is Expressed in Cochlea and Mutated in Patients Affected by Autosomal Dominant Hearin Impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet* 2004; 74: 770-776
95. Tilney LG, Egelman ED, Delosier DJ and Saunder JC. Actin filaments, stereocilia, and hair cells of the bird cochlea. Packing of actin filaments in the stereocilia and in the cuticular plate and what happens to the organization when the stereocilia are bent. *J Cell Biol* 96: 822-834

96. Bork JM, Peters LM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed ZM, et al. Usher Syndrome ID and Nonsyndromic Autosomal Recessive Deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the Novel Cadherin-like gene CDH23. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 26-37
97. Nollet F, Kool P, Van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Molec Biol* 2000; 299: 551-572
98. Keats BJ, Corey DP. The Usher Syndromes. *Am J Med Genet* 1999; 89: 158-166
99. Verpy E, Masmoudi S, Zwaenepoel I, Leibovic M, Hutchin TP, et al. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nat Genet* 2001; 29(3): 345-349
100. Lynch ED, Lee MK, Morrow JE, Welch PL, Leon PE, King MC. Non-syndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the Drosophila gene diaphanous. *Science* 1997; 278: 1315-1318
101. Robertson NG, Lu L, Heller S, et al. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human non-syndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet* 1998 ; 20 : 299-303
102. Van Camp G, Smith RJ. Maternally inherited hearing impairment. *Clin Genet* 2000; 57: 409-414
103. de Kok YJ, Bom SJ, Brunt TM, et al. A Pro51Ser mutation in the COCH gene is associated with late onset autosomal dominant progressive sensorineural hearing loss with vestibular defects. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 361-366
104. Fransen E, Verstreken M, Verhagen WI et al. High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with a mutation in COCH gene. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1425-1429
105. Alloisio N, Morle L, Bozon M et al: Mutation in the zonadhesin-like domain of alpha-tectorin associated with autosomal dominant non-syndromic hearing loss. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 255-258

106. Mustapha M, Weil D, Chardenaux S et al: Na alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 409-412
107. McGuirt WT, Prasad SD, Griffith AJ et al. Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nat Genet* 1999; 23: 413-419
108. Ahmed ZM, Riazuddin S, Ahmad J, Bernstein SL, Guo Y, et al. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USHF1 and DFNB23. *Hum Mol Genet* 2003; 12 (24): 3215-3223
109. Mburu P, Mustapha M, Varela A, Weil D, El-Amraoui A, et al. Defects in Whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirle mouse and families with DFNB31. *Nat Genet* 2003; 34(4): 421-8
110. Naz S, Griffith AJ, Riazuddin S, Hampton LL, Battey JF Jr, et al. Mutations of ESPN cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction. *J Med Genet* 2004; 41(8): 591-5
111. Zwaenepoel I, Mustapha M, Leibovici M, Verpy E, Goodyear R, et al. Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(9): 6240-5
112. de Kok YJM, Van der Maarel SM, Bitner-Glindzicz M, Huber I, Monaco Malcolm S. Association between X-linked mixed deafness and mutation in the POU domain gene POU3F4. *Science* 1995; 267: 685-688
113. de Kok YJ, Vossenaar ER, Cremers CW, et al. Identification of a hot spot for microdeletions in patients with X-linked deafness type 3 (DFN3) 900 kb proximal to the DFN3 gene POU3F4. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1229-1235
114. Peters LM, Anderson DW, Griffith AJ, Grundfast KM, San Agustin TB, et al. Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28. *Hum Molec Genet* 2002; 11(23): 2877-2885

115. Wayne S, Robertson NG, Declau F, Chen N, Verhoeven K, et al. Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Molec Genet* 2001; 10(3): 195-200
116. Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, et al. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a non-syndromic form of deafness. *Nat Genet* 1999; 21: 363-369
117. Van laer L, Huizing EH, Verstreken M, et al. Non-syndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5. *Nat Genet* 1998; 20: 194-197
118. Kurima K, Peters LM, Yang Y, Riazuddin S, Ahmed ZM, et al. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novo gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. *Nat Genet* 2002; 30(3): 277-84
119. Scott HS, Kudoh J, Wattenhofer M, Shibuya K, Berry A, et al: Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nat Genet* 2001; 27(1): 59-63
120. Fraser FC and GunnT. Diabetes mellitus, diabetes insipidus and optic atrophy: na autosomal recessive syndrome? *J Med Genet* 1997; 14:190-193
121. Bernalova IN, Camp GV, Bom SJH, Brown DJ, Cryns K, et al. Mutations in the Wolfram Syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Hum Molec genet* 2001; 10 (22): 2501-2508
122. Naz S, Guiguere CM, Kohrman DC, Mitchem KL, Riazuddin S, et al. Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to DFNB6 locus. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 632-636
123. Ouyang XM, Xia XJ, Verpy E, DuLL, Pandya A, et al. Mutations in the alternatively spliced exons of USH1c cause non-syndromic recessive deafness. *Hum Genet* 2002; 111: 26-30
124. Reardon W, Harding AE. Mitochondrial genetics and deafness. *J Audiol Med* 1995; 4: 40-51
125. Jacobs HT. Mitochondrial deafness. *Ann Med* 1997; 29: 483-491

126. Estivill X, Govea N, Barcelo E, et al. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 27-35
127. Pandya A, Xia XJ, Erdenetungalag R, et al. Heterogenous point mutations in the mitochondrial tRNA^{Ser} (UNC) precursor coexisting with the A1555G mutation in deaf student from Mongolia. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1803-1806
128. Bykhovskaya Y, Estivill X, Taylor K, et al. Candidate locua for a nuclear modifier gene for maternally inherited deafness. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1905-1910
129. Reid FM, Vernham GA, Jacobs HT. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Hum Mutat* 1994; 3: 243-247
130. Seviour KB, Hatamochi A, Stewart IA, et al. Mitochondrial A7445G mutation in two pedigrees with palmoplantar keratoderma and deafness. *Am J Med Genet* 1998; 75: 179-185
131. Verhoeven K, Ensink RJH, Tiranti V et al. Hearing impairment and neurological disfunction associated with a mutation in the mitochondrial tRNA^{Ser} (UNC) gene. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 45-51
132. Sue CM, Tanji K, Hadjigeorgiou G et al. Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA^{Ser} (UCN) gene. *Neurology* 1999; 52: 1905-1908
133. Zhu M, Yang T, Wei S, Dewan AT, Morell RJ, et al. Mutations in the γ -Actin Gene (ACTG1) are associated with Dominant Progressive Deafness (DFNA20/26). *Am J Hum Genet* 2003; 73:1082-1091
134. Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng JH, Han D et al. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. *Am J Hum Genet* 2004; 74(1): 139-52
135. Casano RA, Johnson DF, Bykhovskaya Y, Torricelli F, Bigozzi M, Fischel-Ghodsian N. Inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: genetic heterogeneity and clinical implications. *Am J Otolaryngol* 1999;20(3): 151-6

136. Hutchin TP, Parker MJ, Young ID, Davis AC, Pulleyn LJ, Deeble J, et al. A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene in a family with non-syndromic sensorineural hearing impairment. *J Med Genet* 2000;37(9): 692-4
137. Online Mendelian inheritance in man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
138. Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM. Hereditary Hearing Loss and Its syndromes. New York: Oxford University Press, 1995
139. Tassabehji M, Newton VE, Read AP. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat Genet* 1994;8(3):251-5
140. Sanchez-Martin M, Rodriguez-Garcia A, Perez-Losada J, Sagrera A, Read AP et al. SLUG (SNAI₂) deletions in patients with Waardenburg disease. *Hum Mole Genet* 2002 ; 11 (25) : 3231-6
141. Hoth CF, Milunsky A, Lipsky N, Sheffer R, Clarren SK, et al. Mutations in the paired domain of the human PAX-3 gene cause Klein-Waardenburg Syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome type I (WS-I). *Am J Hum Genet* 1993; 52(3): 455-62
142. Attie T, Till M, Pelet A, Amiel J, Ederly P, et al. Mutation of the endothelin-receptor B gene in Waardenburg-Hirsprung disease. *Hum Mol Genet* 1995; 4(12): 2407-9
143. Ederly P, Attie T, Amiel J, Pelet A, Eng C, et al. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 1996; 12(4): 442-4
144. Pingault V, Bondurant N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Prehu MO, et al. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirsprung disease. *Nat Genet* 1998; 18(2): 171-3
145. Cohen MM, Gorlin RJ (1995). Epidemiology, etiology, and genetic patterns. In: Gorlin RJ, Torriello HV, Cohen MM: Hereditary hearing loss and it's syndromes. Oxford University Press, NY, pp 9-21

146. Adelhaks S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, et al. A human homologue of the *Drosophila* eye absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat Genet* 1997; 15(2): 157-64
147. Kumar S, Deffenbacher K, Marres HÁ, Cremers CW, Kimberling WJ. Genomewide search and genetic localization of a second gene associated with autosomal dominant branchio-oto-renal syndrome: clinical and genetic implications. *Am J Hum Genet* 2000; 66(5): 1715-20
148. Ruf RG, Fu P, Silvius D, Otto AE, Beekmann F, et al. Six1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1_DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 (21) : 8090-5
149. Williams CJ, Ganguly A, Considine E, McCarron S, Prockop DJ, et al. A-2→G Transition at 3'acceptor splicesite of IVS17 characterizes the COL2A1 gene mutation in the original Stickler Syndrome Kindred. *Am J Med Genet* 1996; 63(3): 461-7
150. Vikkula M, Mariman EC, Lui VC, Zhidkova NI, Tiller GE et al. Autosomal dominant and recessive osteochondrodysplasias associated with COL11A2 locus. *Cell* 1995; 89(3): 431-7
151. Richards AJ, Yates JR, Williams R, Payne SJ, Pope FM, et al. A family with Stickler Syndrome type 2 has a mutation in the COL11A1 gene resulting in substitution of glycine 97 by valine in alpha1 (XI) collagen. *Hum Mole Genet* 1996; 5(9): 1339-43
152. Kaplan J, Gerber S, Bonneau D, Rozet JM, Delrieu O, et al. A gene for Usher syndrome type I (USH1A) maps to chromosome 14q. *Genomics*, 1992;14(4):979-87
153. Weil D, Blanchard S, Kaplan J, Guilford P, Gibson F, Walsh J, et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature*, 1995;374(6517): 60-1
154. Verpy E, Leibovici M, Zwaenepoel I, Liu XZ, Gal A, et al. A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nat Genet* 2000;26(1): 51-5

155. Chaib H, Kaplan J, Gerber S, Vincent C, Ayadi H, Slim R, Munnich A, Weissenbach J, Petit C. A newly identified locus for Usher syndrome type I, USH1E, maps to chromosome 21q21. *Hum Mol Genet* 1997;6(1):27-31
156. Ahmed ZM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed Z, Khan S, Griffith AJ, Morell RJ, Friedman TB, Riazuddin S, Wilcox ER. Mutations of the protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Am J Hum Genet* 2001; 69(1): 25-34
157. Mustapha M, Chouery E, Torchard-Pagnez D, Nouaille S, Khrais A, et al. A novel locus for Usher syndrome type I, USH1G, maps to chromosome 17q24-25. *Hum Genet.* 2002 Apr;110(4):348-50
158. Weil D, El-Amraoui A, Masmoudi S, Mustapha M, Kikkawa Y, Laine S, et al. Usher syndrome type I G (USH1G) is caused by mutations in the gene encoding SANS, a protein that associates with the USH1C protein, harmonin. *Hum Mol Genet* 2003; 12(5):463-71
159. Eudy JD, Weston MD, Yao S, Hoover DM, Rehm HL, et al. Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type Iia. *Science.* 1998; 280(5370): 1753-7
160. Hmani M, Ghorbel A, Boulila-Elgaied A, Bem Zina Z, Kammoun W, et al. A novel locus for Usher syndrome type II, USH2B, maps to chromosome 3 at p23-24.2. *Eur J Hum Genet* 1999;7(3): 363-7
161. Weston MD, Luijendijk MW, Humphrey KD, Moller C, Kimberling WJ. Mutations in the VLGR1 gene implicate G-protein signaling in the pathogenesis of Usher syndrome type II. *Am J Hum Genet* 2004; 74(2): 357-66
162. Joensuu T, Hamalainen R, Yuan B, Johnson C, Tegelberg S, Gasparini P, et al. Mutations in a novel gene with transmembrane domains underlie Usher syndrome type 3. *Am J Hum Genet.* 2001; 69(4):673-84
163. Everett LA, Gaser B, Beck JC, Idol JR, Bush AS, et al. Pendred Syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 1997; 17(4): 411-22

164. Tyson J, Tranebjaerg L, Bellman S, Wren C, Taylor JF, Bathen J, et al. Isk and KvLQT1: mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; 6(12): 2179-85
165. Cosgrove D, Samuelson C, Pinnt J. Immunohistochemical localization of basement membrane collagens and associated proteins in the murine cochlea. *Hear Res* 1996; 97(1-2): 54-65
166. Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC, et al. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science*. 1990; 248(4960): 1224-7
167. Mochizuki T, Lemmink HH, Mariyama M, Antignac C, Gubler MC, Pirson Y, et al. Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet*. 1994; 8(1):77-81
168. Koehler CM, Leuenberger D, Merchant S, Renold A, Junne T, et al. Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2141-6
169. Berger W, Meindl A, van de Pol TJ, Cremers FP, Ropers HH, Doerner C, et al. Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning. *Nat Genet* 1992;1(3):199-203
170. Chen ZY, Hendriks RW, Jobling MA, Powell JF, Breakefield XO, Sims KB, et al. Isolation and characterization of a candidate gene for Norrie disease. *Nat Genet* 1992;1(3):204-8
171. Jaksch M, Klopstock T, Kurlemann G, Dorner M, Hofmann S, Kleinle S, et al. Progressive myoclonus epilepsy and mitochondrial myopathy associated with mutations in the tRNA(Ser(UCN)) gene. *Ann Neurol* 1998;44(4):635-40
172. Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990; 348(6302):651-3

173. Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 1990; 61(6):931-7
174. Zeviani M, Muntoni F, Savarese N, Serra G, Tiranti V, Carrara F, et al. A MERRF/MELAS overlap syndrome associated with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Lys) gene. *Eur J Hum Genet* 1993;1(2):124
175. Kameoka K, Isotani H, Tanaka K, Azukari K, Fujimura Y, Shiota Y, et al. Novel mitochondrial DNA mutation in tRNA(Lys) (8296^A→G) associated with diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245(2):523-7
176. Hao H, Bonilla E, Manfredi G, DiMauro S, Moraes CT. Segregation patterns of a novel mutation in the mitochondrial tRNA glutamic acid gene associated with myopathy and diabetes mellitus. *Am J Hum Genet.* 1995; 56(5):1017-25
177. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, et al. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 1989;320(20):1293-9
178. Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV, Trounce I, Polak MA, et al. Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion.
179. Barbi M, Binda S, Primache V, Caroppo S, Didò P, Guidotti P, et al. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. *J Clin Vir* 2000; 17:159-165
180. Giersch ABS, Morton CC. Genetic causes of nonsyndromic hearing loss. *Curr Opin* 1999; 11: 551-557
181. Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet* 1998; 7(10): 1589-1597
182. Lalwani AK, Walsh BJ, Reilly PG, Muzyczka N, Mhatre NA. Development of in vivo gene therapy for hearing disorders: introduction of adeno-associated virus into the cochlea of the guinea pig. *Gene Ther* 1996; 3:588-592