



Perspectivas para triagem da deficiência auditiva genética: rastreamento da mutação 35delG em neonatos

*Prospects for genetic hearing loss screening:
35delG mutation tracking in a newborn population*

Vânia B. Piatto¹, Camila A. Oliveira², Fabiana Alexandrino², Carla J. Pimpinati³, Edi L. Sartorato⁴

Resumo

Objetivos: Investigar a prevalência da mutação 35delG em amostra de recém-nascidos, com teste molecular específico; avaliar as perspectivas para a triagem neonatal genética para a deficiência auditiva.

Casística e método: Foram avaliados 223 recém-nascidos no Hospital de Base de São José do Rio Preto, em São Paulo, para análise molecular da mutação 35delG, no gene da conexina 26, com a técnica da reação em cadeia da polimerase alelo-específico, após extração do DNA genômico de sangue de cordão umbilical.

Resultados: Foram identificados cinco heterozigotos, obtendo-se prevalência de 2,24% de portadores da mutação 35delG, na população do estudo.

Conclusão: O uso do teste molecular permitiu a identificação da mutação 35delG na população do estudo, podendo ser utilizado como complemento aos rastreamentos audiométricos neonatais por ser simples, rápido, de fácil execução e de baixo custo.

J Pediatr (Rio J). 2005;81(2):139-42: Mutação 35delG, análise molecular, deficiência auditiva, triagem neonatal.

Abstract

Objectives: To investigate the prevalence of the 35delG mutation in a newborn population, with specific molecular testing, and to evaluate the prospects for genetic neonatal screening for hearing impairment.

Population and method: 233 newborn were evaluated at the Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP, for molecular analysis of the 35delG mutation in the connexin 26 gene, with the reaction technique in allele-specific polymerase chain reaction, after genomic DNA extraction from umbilical cord blood.

Results: Five heterozygotes were identified, obtaining a prevalence of 2.24% of 35delG mutation carriers in the study population.

Conclusion: Using the molecular test allowed for the identification of the 35delG mutation in the study population with the possibility of being used as a complement to neonatal audiometric screening as being simple, fast, and easily to perform with low costs.

J Pediatr (Rio J). 2005;81(2):139-42: 35delG mutation, molecular analysis; hearing impairment; neonatal screening.

Introdução

Devido à alta frequência e ao impacto clínico da deficiência auditiva, a detecção precoce tem se tornado uma importante meta de saúde pública. O rastreamento neonatal foi recomendado pelos *National Institutes of Health* e

Joint Committee on Infant Hearing Screening, para a implementação de avaliações eletrofisiológicas como as otoemissões acústicas evocadas e a audiometria de tronco encefálico^{1,2}. Simultaneamente ao desenvolvimento de tecnologias para diagnosticar a deficiência auditiva, recentes e contínuos avanços, no campo da genética molecular, estão proporcionando, cada vez mais, a identificação de genes responsáveis pelas formas hereditárias, permitindo-se a detecção precoce^{3,4}.

A deficiência auditiva sensorio-neural acomete um em cada 1.000 recém-nascidos, sendo que cerca de 60% dos casos pode ser atribuído a fatores genéticos, e os 40% restantes estão entre as mais diversas etiologias nos países desenvolvidos. Dentre as causas genéticas, as formas hereditárias sindrômicas constituem 30% dos casos de deficiência auditiva em crianças, sendo as formas não-sindrômicas as mais prevalentes na população deficiente auditiva, em cerca de 70% dos casos⁵.

1. Doutora em Ciências da Saúde. Médica pediatra. Professora adjunta, Departamento de Anatomia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), SP.
2. Biomédica. Doutoranda em Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP.
3. Graduanda, Faculdade de Fonoaudiologia, UNICAMP, SP.
4. Doutora em Genética Médica. Pesquisadora, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), UNICAMP, SP.

Artigo submetido em 01.09.04, aceito em 24.11.04.

Como citar este artigo: Piatto VB, Oliveira CA, Alexandrino F, Pimpinati CJ, Sartorato EL. Perspectivas para triagem da deficiência auditiva genética: rastreamento da mutação 35delG em neonatos. *J Pediatr (Rio J)*. 2005;81:139-42.

Em 1994, foi identificado o primeiro local cromossômico para a deficiência auditiva não-sindrômica autossômica recessiva, denominada DFNB1, no cromossomo 13 (13q)⁶ e, em 1997, o gene da conexina 26 (Cx26 ou GJB2 – *gap junction beta-2 protein*), no local 13q11-12⁷. A junção comunicante constituída pela proteína Cx26, especificamente, foi identificada como tendo grande expressão na orelha interna, realizando um papel crucial na função fisiológica relacionada à homeostase iônica coclear e no processo fisiológico do potencial endococlear⁸. Portanto, mutações no gene da Cx26 ocasionam um defeito na estrutura e no funcionamento dessas junções, levando à manutenção de altas concentrações de potássio intracelular; isso prejudica o mecanismo que permite a resposta rápida das células ciliadas ao novo estímulo sonoro, resultando, então, em perda auditiva⁹.

Dentre as mutações no gene da Cx26 até o momento descritas, as quais ocasionam DFNB1, uma mutação em particular e a primeira descrita, a mutação 35delG é responsável pela maioria dos alelos mutantes (60-85%) na população da Europa Mediterrânea¹⁰. Entretanto, cerca de 10 a 42% dos pacientes com deficiência auditiva apresentam mutações no gene da Cx26 em apenas um alelo, a despeito do fato de a maioria das mutações ter caráter recessivo¹¹. Em vários países europeus, a prevalência da mutação 35delG, na população com audição normal, é estimada de 2 a 4%¹⁰.

A mutação 35delG é a deleção de uma guanina (G) em uma seqüência de seis guaninas, que se estendem da posição 30 a 35 dos nucleotídeos, no exon codificante do gene da Cx26, o que resulta na interrupção do códon, na posição 38 dos nucleotídeos, com a conseqüente terminação prematura da proteína (*frameshift*) e no códon 13 do aminoácido, resultando na síntese de um polipeptídeo incompleto, com 12 aminoácidos, em vez do normal, com 226 aminoácidos¹².

Nos países em desenvolvimento, ainda há estudos escassos sobre a prevalência da deficiência auditiva genética. No Brasil, foi determinada a prevalência de 0,97% de portadores da mutação 35delG, ou seja, 1:103 heterozigotos, em um rastreamento neonatal¹³. Em outro estudo realizado, dessa vez em pacientes com deficiência auditiva, a mutação 35delG foi identificada em 84,2% dos alelos¹⁴.

O presente estudo teve como objetivo investigar a prevalência da mutação 35delG, com o teste reação em cadeia da polimerase (PCR) alelo-específico, em amostra de recém-nascidos, e chamar a atenção para a necessidade da avaliação genética neonatal na deficiência auditiva.

Casuística e métodos

O estudo foi realizado no período de 22 de setembro a 10 de outubro de 2003, no qual ocorreram 227 nascimentos no Centro Obstétrico do Hospital de Base de São José do Rio Preto (SP). Desses nascimentos, quatro são gemelares monozigóticos; portanto, foi considerado como amostra final, incluída no estudo, o total de 223 recém-nascidos. Foram coletados 4 ml de sangue de cordão umbilical, após

ligadura do cordão, em um tubo Vacutainer® contendo anticoagulante (EDTA), com prévia obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido da mãe ou do casal. O protocolo para esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (CEP- FAMERP).

O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue de cordão umbilical usando-se o GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc. Limited, 2000), de acordo com o protocolo do fabricante; o procedimento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da FAMERP.

Para a detecção da mutação 35delG, foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase alelo-específico – AS-PCR (*allele-specific polymerase chain reaction*)¹⁵, no termociclador Applied Biosystems – GeneAmp PCR System 9700®, realizada no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP (CBMEG). Para essa reação, foram sintetizados três ARMS *primers* (*amplification-refractory mutation system*, ou sistema de amplificação refratária de mutação) para detecção de mutações de ponto: *primer* normal (NOR), usado para amplificar o alelo sem a mutação 35delG, *primer* mutante (MUT), para amplificar o alelo com a mutação 35delG, e o *primer* comum (COM), usado como *primer* inverso, juntamente com os *primers* NOR ou MUT usados como *primers* diretos¹⁶. As seqüências dos oligonucleotídeos dos *primers* e as condições para a reação AS-PCR foram de acordo com as descritas na literatura¹⁵. Essas duas reações (NOR/COM e MUT/COM) permitem identificar cada amostra como homozigoto normal (sem a mutação 35delG em ambos os alelos), heterozigoto ou homozigoto mutante para essa mutação (com a mutação 35delG em um alelo ou em ambos, respectivamente). Também foram sintetizados *primers* denominados controles A (direto) e B (inverso) para co-amplificação do gene da Cx26 com um segmento do gene amelogenina homólogo ao cromossomo X-Y, sendo utilizados, portanto, como controles internos de amplificação¹⁷.

Os produtos da AS-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão Tris-Borato-EDTA ou TBE 1X, contendo brometo de etídio, na concentração de 0,5 µg/ml, submetido à iluminação ultravioleta, para confirmar o sucesso da reação, e o gel, fotodocumentado.

Análise estatística

Foram avaliados 100 recém-nascidos, em estudo-piloto, para estimativa da proporção (p) de deficiência auditiva nessa amostra inicial. A essa proporção, após ter sido determinada, foi aplicada a fórmula estatística de “dimensionamento de amostra com população conhecida”, obtendo-se o tamanho da amostra final (n) necessária para representar estatisticamente a população total (Np) de recém-nascidos, no período determinado para a realização da pesquisa (Np = 223 neonatos). Para o cálculo da amostra final (n), foi utilizada a referida fórmula estatística, com os seguintes parâmetros: p = 0,01 (estimado pela amostra-piloto); q = 0,99; zc = 3,00 (99,74% de confiabilidade);

$e = 0,03$ (3% de erro de estimativa); $N_p = 223$ (tamanho da população).

$$n = zc^2 \times p \times q \times N_p / e^2 \times (N_p - 1) + zc^2 \times p \times q$$

Os resultados do estudo foram expressos em percentagens.

Resultados

Dentre os 223 neonatos, foram identificados 5 heterozigotos, obtendo-se, portanto, a prevalência de 2,24% (1:44,6) de portadores da mutação 35delG, na população do estudo. Esses neonatos heterozigotos estão sendo submetidos a avaliações audiométricas periódicas.

Discussão

Em uma população de 223 neonatos, no Hospital de Base de São José do Rio Preto, São Paulo, por meio da análise molecular do gene da Cx26, pela técnica PCR alelo-específico (AS-PCR), foi encontrada a prevalência de 2,24% (1:44,6) de portadores da mutação 35delG. Esse resultado e a metodologia utilizada são concordantes com estudos já realizados e descritos na literatura, em várias populações, nos quais a prevalência de portadores, em amostras com totais de 53 a 560 indivíduos compostas por recém-nascidos, crianças ou indivíduos adultos, com audição normal, variou de 0% (EUA, afro-americanos, Inglaterra, França, Egito) a 4,4% (Estônia)¹⁸; no estado de Nova Iorque (EUA), em rastreamento realizado em uma população de 2089 neonatos, foi encontrada a prevalência de 1,29% de portadores da mutação 35delG¹⁹.

A relativa contribuição da mutação 35delG para a deficiência auditiva não-sindrômica, em diferentes populações, variou de 0% (Omã, Coréia, Japão) a 70% (Itália, Espanha, Grécia), demonstrando a heterogeneidade genética existente entre os diversos países, apesar de alguns desses estudos terem se baseado em pequeno número de pacientes, além de algumas diferenças nos métodos de rastreamento da mutação²⁰⁻²³.

No Brasil, foi determinada a prevalência de 0,97% de portadores da mutação 35delG, aproximadamente 1:103 heterozigotos, em um rastreamento realizado em 620 neonatos, na região de Campinas (SP)¹³. A metodologia utilizada no presente estudo foi semelhante ao estudo realizado em Campinas, a fim de se manter o padrão metodológico, mas foi encontrada uma variação na frequência dos alelos com a mutação 35delG. Esse fato pode ser explicado pela diferença na amostra ou talvez porque a composição étnica da população brasileira é altamente heterogênea; com isso, ocorre a miscigenação entre vários grupos étnicos, principalmente caucasóides e africanos, podendo haver diferenças na prevalência entre as regiões do país e até mesmo entre cidades dentro de um mesmo estado²⁴. Portanto, faz-se necessário um estudo multicêntrico para se determinar a real prevalência da mutação 35delG na população do Brasil.

De acordo com a literatura, as análises do gene da Cx26, em pacientes com deficiência auditiva, freqüentemente

demonstram heterozigose em, aproximadamente, 10 a 42% dos casos, a despeito de a maioria das mutações, especialmente a mutação 35delG, ter caráter recessivo^{11,25}. Em sintonia com esses dados estão os resultados do estudo realizado em pacientes com deficiência auditiva sensorio-neural não-sindrômica, do Hospital de Base de São José do Rio Preto, no qual se determinou a prevalência de 12,12% de heterozigotos para a mutação 35delG²⁶. Em outras duas investigações no Brasil, foi encontrada a prevalência, para cada uma das pesquisas, de 6,45¹⁴ e 2,66%²⁷ de indivíduos heterozigotos, com deficiência auditiva. A prevalência em ambos os estudos foi menor do que a da literatura, talvez por diferenças na amostra ou pelas características étnicas e regionais da população brasileira¹⁴, conforme referido anteriormente.

Entretanto, uma vez que a deficiência auditiva ocasionada pela mutação 35delG se manifesta quando existe a mutação em ambos os alelos (homozigose), na maior parte dos casos caracterizando transmissão autossômica recessiva, são necessárias análises mais abrangentes do gene da Cx26, a fim de se distinguir os pacientes heterozigotos que apresentam déficit auditivo (prevalência em 10-42% dos casos)^{11,25} daqueles heterozigotos normais (portadores são, ou seja, indivíduos com a mutação em apenas um alelo, mas com audição normal, cuja prevalência é estimada em 2 a 4% da população sem déficit auditivo)¹⁰. Essas análises e pesquisas mais abrangentes (incluindo as análises de toda a região codificante, da região não-codificante do gene, ou a análise da mutação Δ (GJB6-D13S1830), no gene da Cx30) devem ser direcionadas pelas características audiométricas e clínicas desses indivíduos²⁶. Estudos recentes sugerem, para os casos de heterozigotos com deficiência auditiva, a existência de outra mutação no exon codificante do gene da Cx26, ou a possível coexistência da mutação Δ (GJB6-D13S1830), no gene da Cx30, contribuindo, nesses casos, para uma origem digênica da deficiência auditiva²⁶.

Esses dados apóiam o uso futuro de testes genéticos, tal como o PCR alelo-específico, designado para identificar a mutação 35delG, conforme realizado nesse estudo, pois possibilita o diagnóstico de portadores são, de homozigotos ou de portadores da mutação 35delG com deficiência auditiva, em uma grande proporção de casos; isso pode ser um valioso complemento aos rastreamentos audiométricos neonatais, por ser simples, rápido, de fácil execução e de baixo custo²⁸⁻³⁰. Os recém-nascidos que apresentarem heterozigose pelo teste genético deverão ter acompanhamento audiométrico seriado, pois esses podem estar incluídos nos casos de portadores da mutação 35delG, com deficiência auditiva, ou nos casos em que são apenas portadores da mutação, tendo audição normal, conforme realizado nesse estudo.

Conclui-se que o uso desse teste permitiu a identificação da mutação 35delG e que o mesmo, sendo realizado logo após o nascimento, poderá facilitar o diagnóstico precoce diferencial entre os portadores são e as crianças com deficiência auditiva (homozigotas ou heterozigotas para a mutação 35delG). Além disso, proporcionará aos pais vali-

osas informações sobre a terapêutica e o prognóstico, juntamente com aconselhamento genético³⁰. É imprescindível, portanto, que haja interesse em estabelecer a prevalência e os tipos de mutações que causam a deficiência auditiva não-sindrômica no Brasil, com contínuos estudos de amostras populacionais, a fim de se permitir a implantação de um programa de triagem neonatal genético em todo o país. Tal programa pode levar a significativas reduções em gastos médico-hospitalares e a melhorias na saúde pública, proporcionando uma vida digna a todos os pacientes.

Agradecimentos

Aos pais dos recém-nascidos, que, por concordarem com a execução dessa pesquisa, contribuirão para um futuro melhor às crianças de nosso país.

À amiga e tradutora, Cecília Meneguette Ferreira, por seu prestimoso auxílio.

Referências

- National Institutes of Health Consensus Statement. Early identification of hearing impairment in infants and young children. NIH Consensus Statement 1993;11:1-24.
- American Speech-Language-Hearing Association [homepage on the Internet]. Rockville, Maryland: ©1997-2005 American Speech-Language-Hearing Association [updated 2003, Aug 30; cited 2005 Mar 4]. Joint Committee on Infant Hearing. Year 2000 position statement: principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. [about 27 screens]. Available from: http://www.asha.org/about/legislation-advocacy/federal/ehdi/y2kpstn_stmnt.htm
- Denoyelle F, Marlin S, Petit C, Garabédian E-N. Surdités neurosensorielles d'origine génétique. *Rev Prat.* 2000;50:146-9.
- American College of Medical Genetics. Genetics Evaluation Guidelines for the Etiologic Diagnosis of Congenital Hearing Loss. *Genet Med.* 2002;4:162-71.
- Mustafa T, Arnos KS, Pandya A. Advances in hereditary deafness. *Lancet.* 2001;358:1082-90.
- Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahia A, et al. A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet.* 1994;6:24-8.
- 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;387:80-3.
- Shibata Y, Kumai M, Nishi K, Nakamura K. Diversity and molecular anatomy of gap junctions. *Med Electron Microsc.* 2001;34:153-9.
- Kikuchi T, Adams JC, Miyabe Y, So E, Kobayashi T. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc.* 2000;33:51-6.
- Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brondum-Nielsen K, et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Eur J Hum Genet.* 2000;8:19-23.
- Wilcox SA, Saunders K, Osborn AH, Arnold A, Wunderlich J, Kelly T, et al. High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Hum Genet.* 2000;106:399-405.
- Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Connexins and Deafness Homepage. 2004; <http://www.crg.es/deafness/cx26mut.php>.
- Sartorato EL, Gottardi E, Oliveira CA, Magna LA, Annichino-Bizzacchi JM, Seixas CA, et al. Determination of the frequency of the 35delG allele in Brazilian neonates. *Clin Genet.* 2000;58:339-40.
- Oliveira CA, Maciel-Guerra AT, Sartorato EL. Deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene in Brazilian patients. *Clin Genet.* 2002;61:354-8.
- Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yari Y, et al. Identification of mutation on the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat.* 1998;11:387-94.
- Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. In: Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, et al, editors. *Current Protocols in Human Genetics*. New York, NY: John Wiley & Sons Inc; 1998. p. 981-9.
- Antoniadi T, Gronskov K, Sand A, Pampanos A, Brondum-Nielsen K, Petersen MB. Mutation analysis of the GJB2 (connexin 26) gene by DGGE in Greek patients with sensorineural deafness. *Hum Mutat.* 2000;16:7-12.
- Van Laer L, Coucke P, Mueller RF, Caethoven G, Flothmann K, Prasad SD, et al. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet.* 2001;38:515-8.
- Fitzgerald T, Duva S, Ostrer H, Pass K, Oddoux C, Ruben R, et al. The frequency of GJB2 and GJB6 mutations in the New York State newborn population: feasibility of genetic screening for hearing defects. *Clin Genet.* 2004;65:338-42.
- Rabionet R, Zelante L, Lopez-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet.* 2000;106:40-4.
- Kenna MA, Wu B-L, Cotanche DA, Korf BR, Rehm HL. Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001;127:1037-42.
- Simsek M, Al-Wardy N, Al-Khayat A, Shanmugakonar M, Al-Bulushi T, Al-Khabory M, et al. Absence of deafness associated connexin 26 (GJB2) gene mutations in the Omani population. *Hum Mutat.* 2001;18:545-6.
- Pampanos A, Economides J, Iliadou V, Neou P, Leotsakos P, Voyiatzis, et al. Prevalence of GJB2 mutations in prelingual deafness in the Greek population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2002;65:101-8.
- Oliveira CA, Alexandrino F, Abe-Sandes K, Silva Jr WA, Maciel-Guerra AT, Magna LA, et al. Frequency of 35delG in the GJB2 gene in samples of Caucasians, Asians and African Brazilians. *Hum Biol.* 2004;76:313-6.
- Stevenson VA, Ito M, Milunsky JM. Connexin-30 deletion analysis in connexin-26 heterozygotes. *Genet Test.* 2003;7:151-4.
- Piatto VB, Bertollo EM, Sartorato EL, Maniglia JV. Prevalence of the GJB2 mutations and the del(GJB6-D13S1830) mutation in Brazilian patients with deafness. *Hear Res.* 2004;196:87-93.
- Pfeilsticker LN, Stole G, Sartorato EL, Delfino D, Guerra ATM. A investigação genética na surdez hereditária não-sindrômica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004;70:182-6.
- Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC, Smith RJ. Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *JAMA.* 1999;281:2211-6.
- Fernandez-Burriel M, Rodriguez-Quinones F. A simple method of screening for the common connexin-26 gene 35delG mutation in nonsyndromic neurosensory autosomal recessive deafness. *Genet Test.* 2003;7:147-9.
- Smith RJ, Hone S. Genetic screening for deafness. *Pediatr Clin North Am.* 2003;50:315-29.

Correspondência:

Vânia Belintani Piatto
Rua Santina Figliagi Ceccato, 450/23-A
CEP 15035-180 – São José do Rio Preto, SP
Tel.: (17) 231.0874
E-mail: vabp@bol.com.br