

## INTRODUÇÃO

Acredita-se que mais de 100 genes estejam envolvidos na surdez hereditária não sindrômica, sendo assim, algumas mutações têm sido implicadas na predisposição à surdez quando associadas a agentes ototóxicos, por exemplo, a cisplatina e a carboplatina que são drogas com atividade antitumoral que podem apresentar como efeito colateral a ototoxicidade. Esta é conhecida pela lesão do órgão periférico da audição. Entre outras mutações mitocondriais existentes, as mais frequentes na população brasileiras são: a A1555G e a A827G (frequência de 2%) localizadas no gene *MTRNR1*, sendo a mutação A1555G o primeiro defeito molecular identificado como causa de surdez não-sindrômica. Essa mutação foi descrita em 1993 em uma grande família árabe-israelita. A incidência de perda auditiva varia entre 20% e 60% devido a diferentes populações estudadas ou dependendo dos critérios de normalidade adotados. Outra mutação mais frequente é a 35delG (está envolvida em 70% dos casos de surdez com herança autossômica recessiva), esta consiste na deleção de uma das 6 guaninas que se estendem da posição 30 a 35 no gene *GJB2*. Este gene está envolvido em 80% dos casos nos quais se observa esse padrão de herança, contudo, mutações no gene da conexina 26 também podem determinar surdez herdada de modo dominante. A genotipagem usando o System® MassARRAY da Sequenom, Inc. (San Diego, CA), por meio da técnica MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*), possibilita detectar mutações com alta precisão e são aplicados em estudo associados a larga-escala.

## OBJETIVO

Rastrear mutações e polimorfismos em genes nucleares e mitocondriais e correlacioná-los ao uso de quimioterapia com drogas ototóxicas em indivíduos com ou sem perda auditiva, que receberam tratamento na infância.

## MÉTODOS

Casística – Foram utilizados no estudo 30 pacientes que receberam tratamento quimioterápico com drogas ototóxicas na infância. Esses indivíduos receberam acompanhamento clínico no Hospital A. C. Camargo. Todas as análises moleculares foram realizadas no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CBMEG – UNICAMP.

### Mutações rastreadas e suas respectivas técnicas

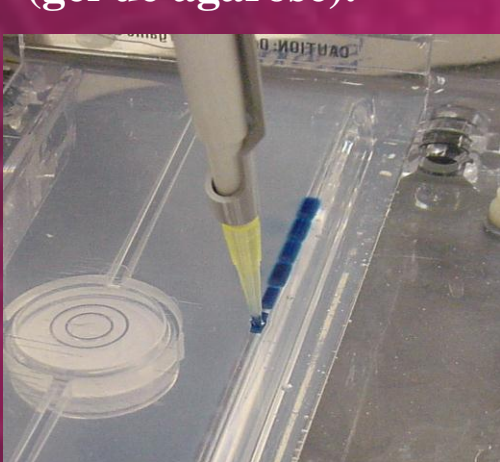
| Mutações   | Técnicas                                 |
|--|--|
| $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6D13S1854)$ | PCR-MULTIPLIX                            |
| 35delG   | AS-PCR                                   |
| A1555G e A827G                                   | ESPECTROMETRIA DE MASSA E SEQUENCIAMENTO |

### Análise por PCR

1-Amplificação



2-Análise dos resultados (gel de agarose).



### Análise por espectrometria de massa

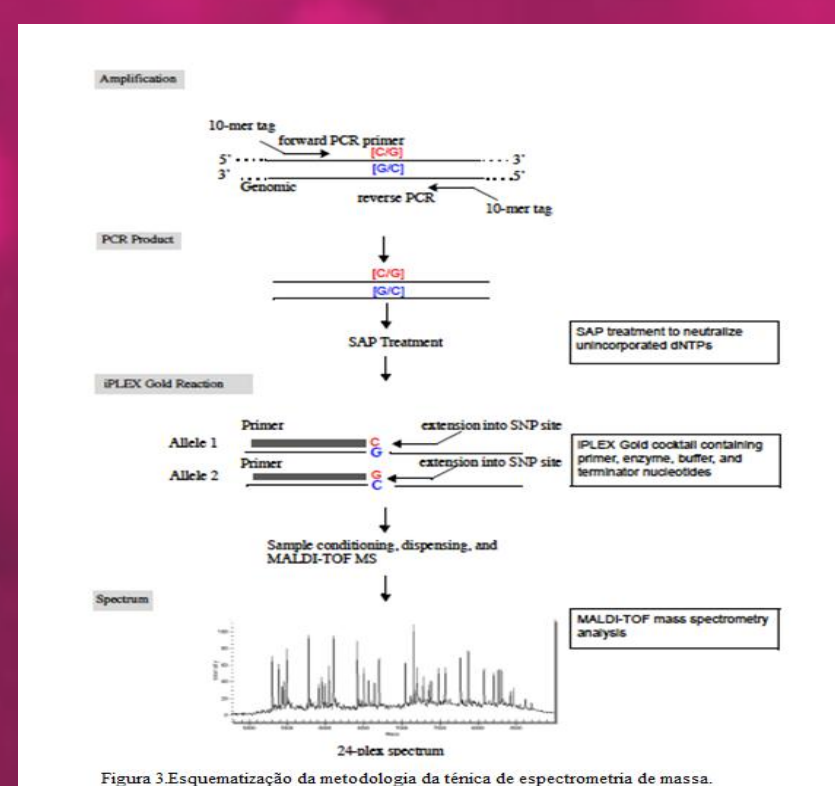


Figura 3 Esquematização do protocolo de análise de espectrometria de massa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os 30 indivíduos analisados, foi encontrada a mutação 35delG no gene *GJB2* em 1 indivíduo em heterozigose (figura 1).

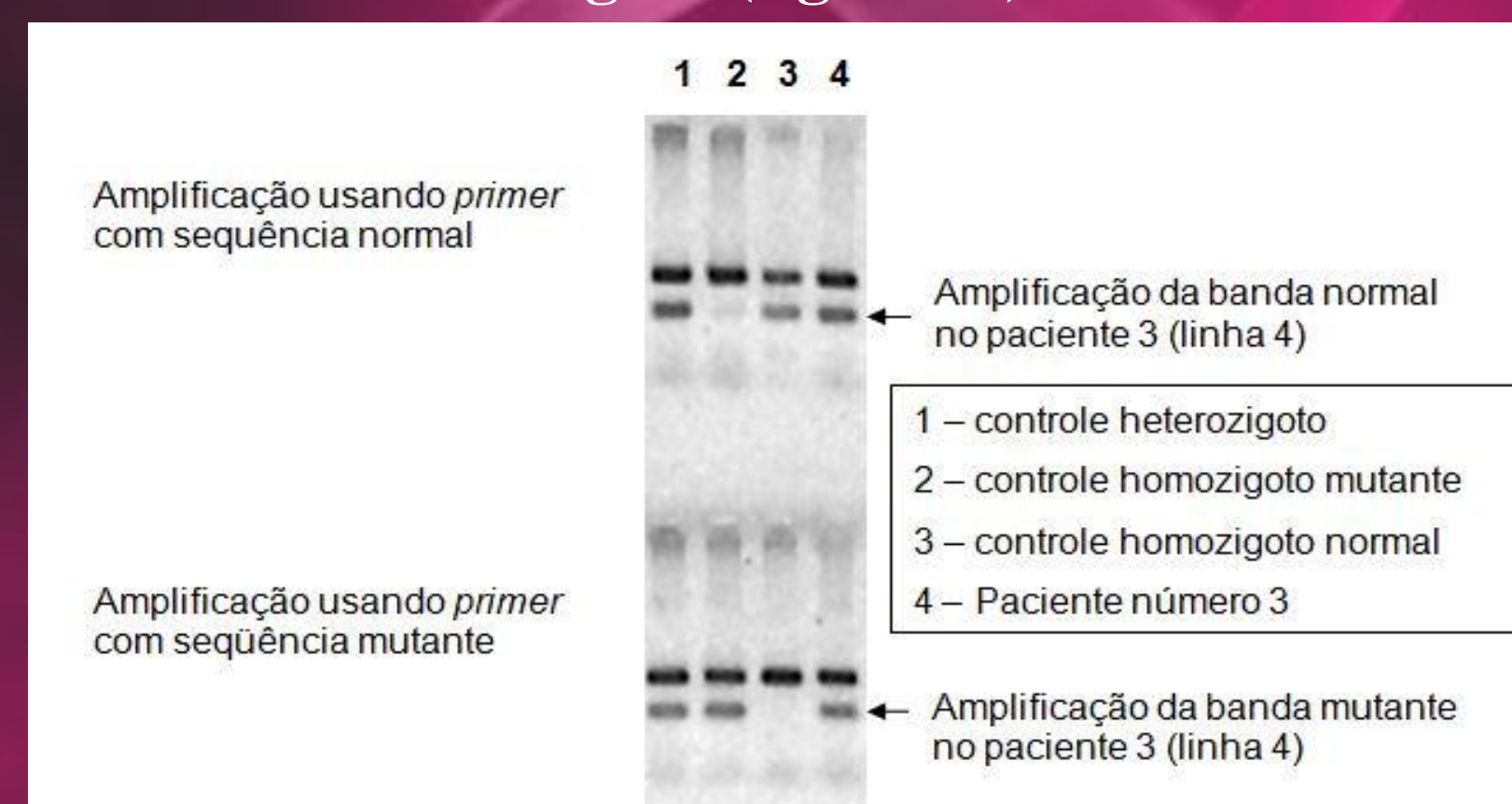


Figura 1 – Resultado do PCR alelo específico mostrando a amplificação do DNA do paciente de número 3, heterozigoto para a mutação 35delG no gene *GJB2*.

No gene mitocondrial *MTRNR1* foram encontradas as alterações A827G (2 casos) (Figura 2) e T825A (1 caso) (Figura 3).



Figura 2 – Eletroferograma mostrando a mutação pontual A827G. (A) Indivíduo com a mutação A827G; (B) Indivíduo com sequência normal.

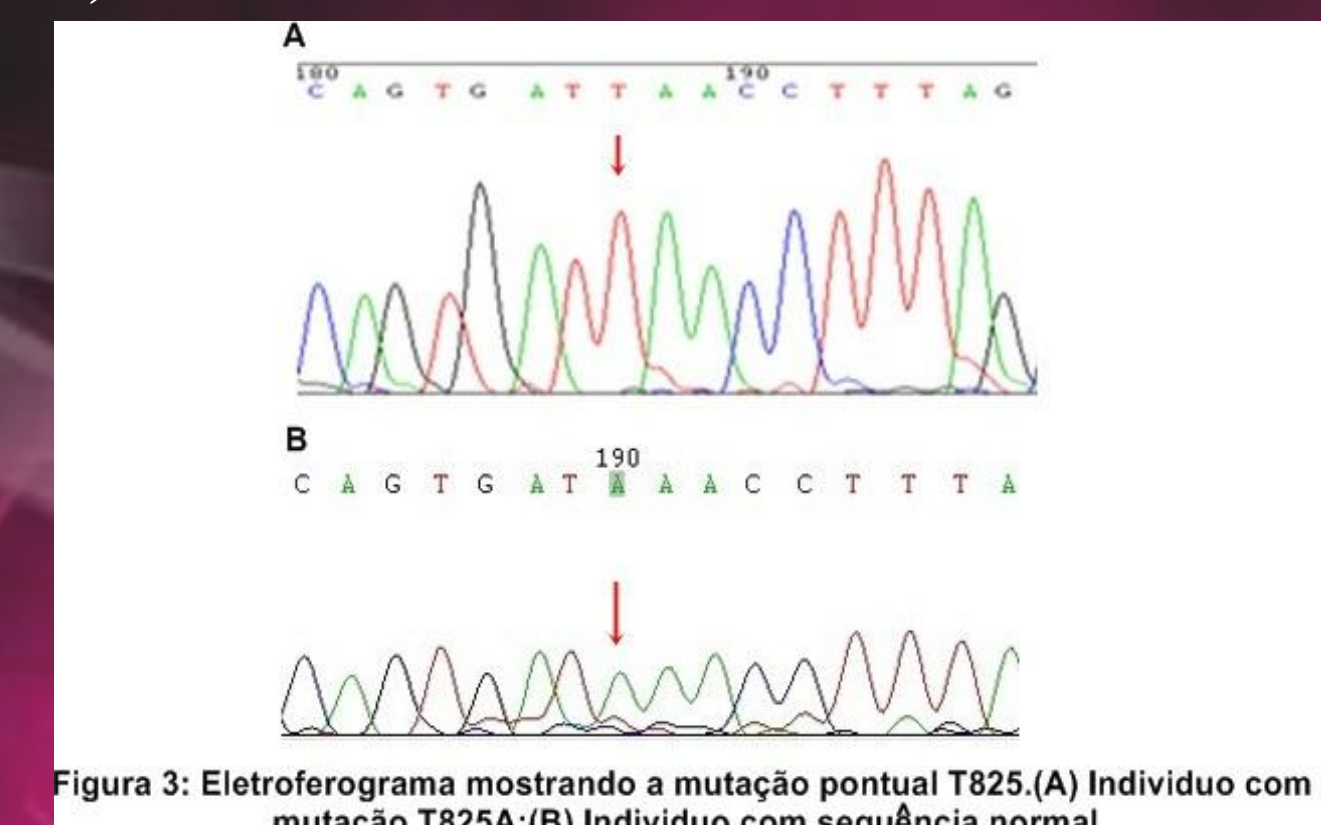


Figura 3 – Eletroferograma mostrando a mutação pontual T825A; (A) Indivíduo com a mutação T825A; (B) Indivíduo com sequência normal.

Porém, não foi encontrada a mutação mitocondrial A1555G. Recentemente a pesquisa de Abreu-Silva demonstrou que a mutação mitocondrial A1555G no Brasil apresenta uma frequência de 2%, frequência semelhante foi encontrada na população de origem Europeia. Peters et al (2003) estudaram o mtDNA de 20 pacientes com perda auditiva e 19 sem perda auditiva, sob doses terapêuticas de cisplatina, mas não identificaram a mutação A1555G em quaisquer dos pacientes analisados.

As deleções  $\Delta(GJB6-D13S1830)$  e  $\Delta(GJB6-D13S1854)$  não foram detectadas em nenhum dos indivíduos estudados. A frequência observada do alelo 35delG observada nos indivíduos estudados está de acordo com os dados da literatura.

Através da plataforma de Espectrômetro de Massa - Sequenom, foi possível detectar 2 indivíduos com as deleções A827G (figura 4), sendo os demais pacientes normais, e nenhuma paciente apresentou a mutação A1555G, com exceção do paciente 22otx, na qual, não se obteve nenhum resultado.

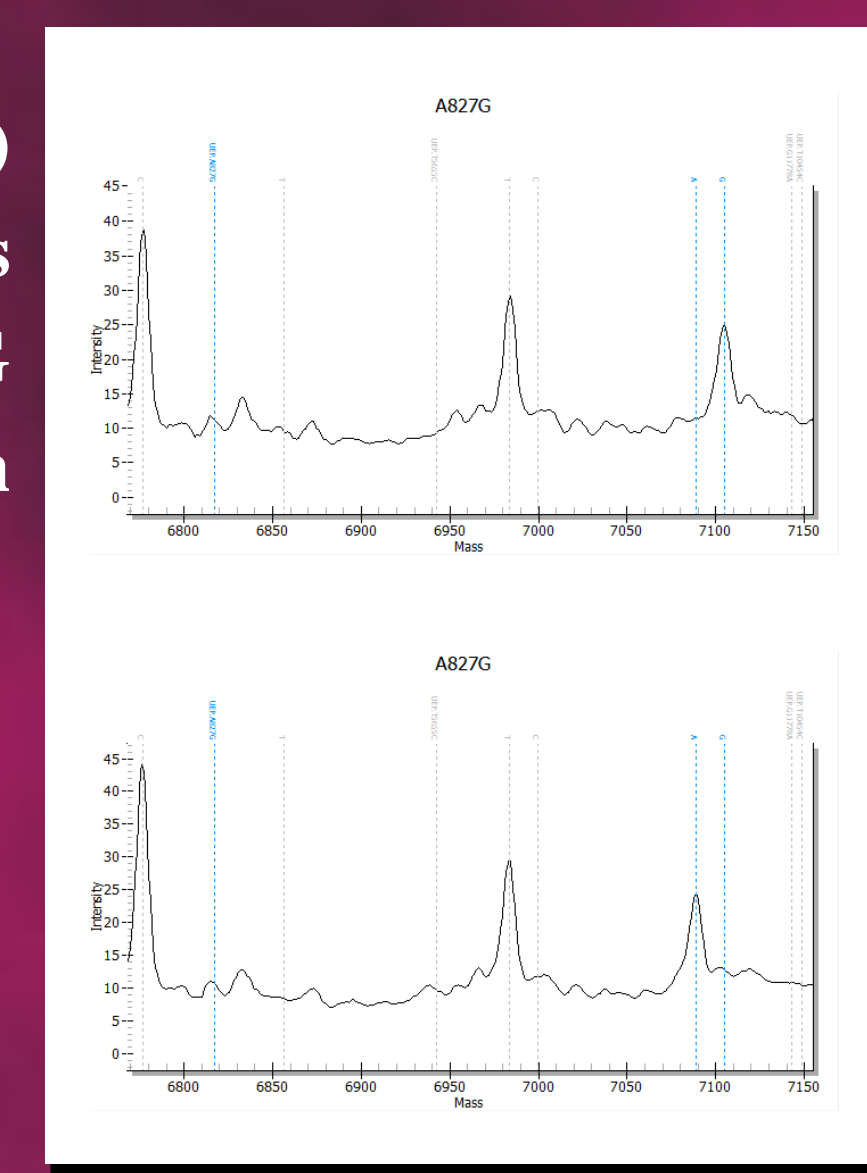


Figura 4- Espectro mostrando um paciente mutante e um paciente normal para a mutação A827G

## CONCLUSÃO

Foram rastreadas mutações mitocondriais e nucleares em 30 indivíduos que receberam tratamento quimioterápico com drogas ototóxicas na infância. Porém com os resultados encontrados, não foi possível correlacionar as mutações encontradas e o uso das drogas ototóxicas. Por isso, a continuação dos estudos é necessária para o acréscimo de um maior número de casos, para assim verificar uma possível correlação.

## Fontes de Financiamento