



Rastreamento de variantes no gene *GJB3* indivíduos heterozigotos para o locus *DFNB1*.

Geovana A. Carneiro*, **Gustavo P. Reis***, **Julia D. Buffalo***, **Naiane F. da Silva***, **Matheus T. Galeni**, **Nadya S. M. Adamov**, **Edi L. Sartorato**

Resumo

A deficiência auditiva é uma doença sensorial comum, atingindo cerca de um em cada 500 recém-nascidos. Mais de 60% dos casos de perda auditiva congênita são causadas por fatores genéticos. Embora há vasta diversidade em relação a perda auditiva genética, mais da metade das ocorrências estão congruentes no locus *DFNB1*, do cromossomo 13q12, mais especificamente, nos genes *GJB2* e *GJB6*, codificadores das proteínas conexina 26 (*Cx26*) e 30 (*Cx30*), nessa ordem. Entretanto, a alta prevalência de indivíduos com perda auditiva apresentando mutações recessivas no locus *DFNB1* em apenas um alelo tem dificultado o diagnóstico molecular e consequentemente o aconselhamento genético.

Portanto, objetivo principal deste projeto foi rastrear a presença de mutações no gene *GJB3* em indivíduos monoalélicos para o locus *DFNB1*; uma vez que, a herança digênica tem sido descrita nos casos de perda auditiva associando mutações no gene *GJB2* e genes *GJB3* e *GJB6*. A identificação de possíveis alterações nestes genes, podem ajudar a concluir o diagnóstico molecular desses pacientes

No último semestre, no entanto, os resultados finais do projeto foram afetados devido a pandemia do COVID-19, principalmente as atividades práticas, por conta da paralisação das atividades presenciais na UNICAMP. Sendo assim, parte do projeto foi realizado e adaptado para ambiente remoto, como o estudo de artigos, apresentações em slides e exercícios complementares.

Palavras-chave: Gene *GJB3*, Rastreamento, Perda Auditiva, *DFNB1*.

Introdução

A Perda auditiva é uma doença auditiva sensorial comum, afetando o desenvolvimento infantil, a integração social e a qualidade de vida dos pacientes, com substancial impacto na saúde pública. No Brasil, a frequência é estimada em 4 a cada 1000 nascimentos, podendo variar, dependendo da região estudada, de 2 a 7 a cada 1000 recém-nascidos (Russo et al., 2000) podendo ser devido a fatores genéticos ou ambientais.

GJB2: foi o primeiro gene nuclear relacionado com a perda auditiva sensorioneural não-sindrômica de padrão autossômico recessivo a ser relatado (Kelsell et al., 1997). Está localizado no cromossomo 13q11-q12, no locus *DFNB1* e codifica a proteína conexina 26.

GJB6: esse gene codifica a proteína conexina 30 (*Cx30*) e também está localizado no locus *DFNB1*, a 35kb do gene *GJB2* em direção ao telômero, possui 261 aminoácidos e apresenta 77% de similaridade quando comparado a conexina 26.

GJB3: gene relacionado à surdez e doenças de pele, está localizado no cromossomo 1p35.1 e codifica a proteína conexina 31. Variantes relacionadas à surdez não sindrômica foram originalmente reportadas nesse gene com um padrão autossômico dominante (*DFNA2*) na população chinesa (Xia et al. 1998). Entretanto, Liu e colaboradores (2000) relataram para esse mesmo gene um padrão de herança autossômica recessiva de surdez não-sindrômica. Portanto, parece que mutações nesse gene podem resultar em diferentes fenótipos, com padrão de herança autossômico recessivo ou dominante.

Apesar da grande heterogeneidade da perda auditiva genética, mais de 50% dos casos estão associados a mutações no locus *DFNB1*, no cromossomo 13q12. Este locus contém o gene *GJB2* e *GJB6* que codificam as proteínas conexina 26 (*Cx26*) e 30 (*Cx30*), respectivamente.

Uma das maiores dificuldades em relação ao diagnóstico molecular e aconselhamento genético de indivíduos surdos portadores de mutação no gene da conexina 26, é que aproximadamente 10 a 40% dos casos são detectadas mutações recessivas em apenas um dos alelos. Ao estudar o outro alelo do gene *GJB2*, não é encontrada nenhuma mutação na região codificante, o que dificulta o diagnóstico molecular e consequentemente o aconselhamento genético nesses pacientes.

Em 2002, um grupo espanhol (Del Castillo et al., 2002) pôde explicar o fenótipo de surdez de parte desses casos, após detectarem grandes deleções próximas ao gene GJB2, envolvendo o gene vizinho GJB6. No entanto, a frequência dessas deleções varia significativamente entre as populações estudadas e dessa forma, um grande número de indivíduos monoalélicos para mutações no gene GJB2 permanecem com diagnóstico molecular indefinido. A herança digênica tem sido descrita nos casos de surdez associando o gene GJB2 aos genes GJB3 e GJB6. A grande heterogeneidade genética adicionada ao fato de que a maioria dos genes envolvidos na perda auditiva hereditária levam a um quadro clínico indistinguível entre diferentes genes, tornam o diagnóstico molecular das perdas auditivas complexo e difícil.

Diante disso, é de extrema importância qualquer estudo que possa diminuir o número de indivíduos com etiologia da perda auditiva não esclarecida, aqueles que permitam o diagnóstico molecular das perdas auditivas e possam esclarecer as causas da surdez principalmente em indivíduos heterozigotos para o locus DFNB1.

Resultados e Discussão

O projeto teve como objetivo analisar e rastrear a presença de variantes no gene GJB3 de 20 indivíduos multialélicos para o locus DFNB1, por meio do Sequenciamento Automático de Sanger e rastreamento da variante R32W pela técnica de RFLP-PCR, porém, devido à pandemia citada anteriormente, não foi possível analisar de forma concreta e precisa os pacientes citados neste projeto, sendo possível somente realizar o rastreamento da variante R32W.

Como resultado, não foi encontrado em nenhum paciente a variante R32W, após a digestão com a enzima HpaII todos os pacientes apresentaram 2 bandas no gel de agarose. Entretanto, não foi possível anexar a imagem que comprove tal resultado, uma vez que a mesma está localizada no computador em nosso laboratório e o mesmo se encontra fechado, devido a pandemia.

Como uma estratégia para dar continuidade ao andamento do projeto foram realizadas atividades remotas como leitura e análises de artigos relacionados com o tema do projeto, simulado com questões de vestibular e apresentações.

O primeiro artigo escolhido de Gouveia e colaboradores (2020), relata a perda auditiva sensorineural unilateral e bilateral assimétrica na infância relacionado às propriedades etiológicas, audiológicas e demográficas. Através de uma análise retrospectiva transversal, pode-se notar uma maior prevalência da perda auditiva sensorineural bilateral assimétrica em relação à unilateral, bem como do indicador de risco de hereditariedade, predominando o grau profundo na pior orelha e preponderância do sexo feminino.

Por conseguinte, a maioria dos familiares das crianças com perda auditiva sensorineural unilateral apresentaram a classificação socioeconômica baixa superior, enquanto que as crianças com perda auditiva sensorineural bilateral assimétrica se subdividiram igualmente em baixa superior e média inferior. Portanto, poucos são os estudos abrangentes nos casos em que não há uma deficiência auditiva bilateral de grau profundo. Então, o artigo de Gouveia esclareceu a perda auditiva sensorineural unilateral e bilateral assimétrica durante a infância, deixando claro a necessidade de aprofundamento.

O segundo artigo estudado de Nunes e colaboradores (2019), abrange a prevalência da perda auditiva (PA) associada a fatores em indivíduos de idade escolar em área urbana no norte brasileiro. O projeto se destacou na análise da prevalência e associação de fatores da PA, em estudantes, no município de Natal, Rio Grande do Norte.

A audição é importante para o desenvolvimento da fala, linguagem e aprendizagem, ajudando na interação, desenvolvimento, conhecimento, demonstração de sentimentos e pensamentos. A perda auditiva pode ter causas como o fator genético, complicação no parto, infecção das vias aéreas superiores, infecção do ouvido, uso de medicamento e exposição excessiva a ruídos.

O estudo transversal avaliou 238 estudantes de 6 a 17 anos, que responderam a perguntas como: "Você acha que ouve bem?" e "Você tem dores de ouvido?". Os responsáveis responderam perguntas socioeconômicas, aspectos da fala e audição, e fatores de risco sobre perda auditiva.

A prevalência da PA foi de 16%, variando entre os sintomas - não ouvir corretamente, dores de ouvido, e alterações nos exames realizados. A prevalência foi maior em indivíduos que reportaram dificuldades de audição, entre 6 a 12 anos, além dos resultados alterados nos exames. Infecções respiratórias foram relacionadas como um fator de risco com a perda auditiva, permanecendo de forma significativa.

O destaque deste projeto evidencia que há necessidade de melhores estruturas na saúde, atentando à fala e audição, de modo que ações de avanço possam estar de forma integral no sistema de saúde para população brasileira.

O terceiro artigo analisado, de Kaitian Chen e colaboradores (2018), se destacou inserindo um questionamento - O quão necessário é o rastreamento das variantes nos genes GJB3/GJB6 em portadores com perda auditiva (PA) identificados a partir do gene GJB2 encontrados em 50% das Perdas Auditivas Não Síndromicas (do inglês Non-Syndromic Hearing Impairment - NSHI).

Na estatística pesquisada em grande escala, anteriormente, a análise genética geral detectou um estado GJB2 heterozigoto em 14,0% dos indivíduos com perda auditiva congênita.

A hipótese exposta no artigo é que pode haver variantes GJB3 ou GJB6 supostamente causais que interagem com mutações GJB2 para causar perda auditiva em heterozigose digênica nesses portadores.

Neste estudo, examinaram todas as sequências de codificação de GJB3/GJB6 em NSHI por sequenciamento de Sanger.

Foram analisadas, no artigo, três famílias chinesas com herança digênica nos genes GJB2/GJB3 e GJB6. Foi identificada uma rara mutação no gene GJB2 sendo prejudicial, impedindo outras mutações de 127 genes de surdez.

No geral, uma mutação missense e uma variante sinônima no exon 2 de GJB3 foram finalmente detectados, nestes não relacionados às famílias. Foi classificado como benigno e sua patogenicidade permanece questionável, uma vez que a variante sinônima pode resultar em PA também.

O estudo sugere que o efeito do GJB3/GJB6 no GJB2 pode ser predominante. Os fatores ambientais e mutações desconhecidas são considerados como causadores da P.A nesses pacientes, que coincidentemente poderia acarretar no GJB2.

Como outro método de estudo remoto, foram desenvolvidos apresentações de slides, relacionados a temas que proporcionaram complemento ao relatório e projeto, com os seguintes temas:

- Medicina Personalizada: tem como objetivo combinar um tratamento com as características únicas de um paciente, de uma forma customizada com foco e ênfase no paciente.

- A replicação do DNA ou duplicação do DNA: processo de grande importância para a transmissão do material genético, pois, quando ocorre a divisão celular, esse material será dividido de forma igual entre as células-filhas. A replicação ocorre antes do início da divisão celular, durante a fase S da interfase. Também conhecida por duplicação ou polimerização, é um fenômeno genético que assegura a auto replicação das informações contidas nos cromossomos, especificamente nos genes. Existem três modelos para como os organismos poderiam replicar seu DNA: semiconservativo, conservativo e dispersivo.

- Terapia Gênica: Entende-se como a transferência de material genético com o propósito de prevenir ou curar uma enfermidade qualquer.

- Citogenética: campo da genética que estuda os cromossomos, sua estrutura, composição e papel na evolução e no desenvolvimento de doenças. É um exame que tem como objetivo analisar os cromossomos, assim identificando alterações cromossômicas. Pode ser feito em qualquer idade, normalmente feito a partir de amostra de sangue, ou líquido amniótico(gestantes), assim identificando alterações estruturais e numéricas em cromossomos. O método usado é do bandeamento G, que é aplicação do corante Giemsa, assim permitindo a visualização do cromossomos. Agora a técnica de Fish é mais específica e sensível permitindo identificar pequenas alterações nos cromossomos e rearranjos, porém há mais custos.

- NGS (next generation sequencing: Exame que realiza o sequenciamento do genoma humano, capaz de ler grandes fragmentos do DNA, permitindo a identificação de diversas doenças ou modificações genéticas. As tecnologias de NGS proporcionam a mudar a forma de pensamento sobre abordagens científicas em pesquisa básica, aplicada e clínica e no diagnóstico genético. Proporcionam novas perspectivas para a medicina de precisão. Essas tecnologias permitem sequenciar o DNA de forma muito mais rápida e barata.

- PCR: reação em cadeia da polimerase, uma técnica que se baseia na amplificação in vitro de uma sequência única de DNA, milhões de vezes de um determinado fragmento. Sua aplicação é a mais diversas como no diagnóstico de doenças infecciosas e genética; sexagem em embriões; expressão gênica; paternidades; criação de organismos transgênicos, entre outras aplicações.

Para que aconteça a amplificação de uma sequência única de um genoma em milhões de vezes, é necessário a preparação da reação da PCR. Em um microtubo é adicionado DNA; primers; DNTPs;Taq; MgCl₂ e água, após é levado para o termociclador onde passará por três etapas a desnaturação, anelamento e extensão. Após as amostras retiradas da PCR e levada para a eletroforese.

- Sequenciamento de Sanger: processo utilizado para definir a sequência exata de nucleotídeos em uma molécula de ácido desoxirribonucleico. Dessa forma, é possível analisar - com exatidão - as quatro bases nucleotídicas e as propriedades hereditárias e bioquímicas do genoma. Sendo que o método de sequenciamento do DNA é o mais frequente até hoje, este sofreu inovações para com a tecnologia e o bom funcionamento.

- Gel de Agarose e Gel de Poliacrilamida: é a matriz na qual é aplicada a amostra, e que permite realizar a separação das moléculas de DNA. Ele é um polissacarídeo, neutro, extraído da parede celular de determinadas algas. Sua estrutura química que possibilita a formação de gel altamente resistente, mesmo em baixas concentrações. O gel é inviável quando se formarem bolhas. O gel de agarose deve ficar homogêneo e translúcido, e sua polimerização se dá em torno de 10 minutos. A funcionalidade do gel de agarose é visualizada através de uma corrida eletroforética, na qual se analisam os padrões das bandas de DNA amplificado.

O gel de poliacrilamida também pode ser utilizado como gel para a eletroforese. É uma mistura de dois polímeros, acrilamida e bisacrilamida. Ele é utilizado para observação de fragmentos menores (poucos pares de bases ou proteínas). Melhor resolução do que a eletroforese em gel de agarose, mas sua desvantagem é a neurotoxicidade.

Para finalizar, como método de estudo remoto, realizamos um simulado, confeccionado pelos monitores, com assuntos abrangentes da Biologia Molecular, DNA e RNA, a fim de esclarecer dúvidas pendentes sobre o assunto e facilitar a nossa compreensão.

Conclusões

A pesquisa das principais mutações no gene *GJB3* em indivíduos monoalélicos para o locus DFNB1, não foi concluída, sendo assim não encontrando um resultado compacto para o rastreamento dos genes *GJB3* e *GJB6*, por conta das atividades terem se tornado remotas e inviáveis de dar continuidade na pesquisa, tendo em vista que há necessidade dos equipamentos laboratoriais.

No entanto, dado ao incidente pandêmico, o estudo foi interrompido no caráter prático e retomado de forma remota, por meio de: simulado, referente à genética, trabalhos e apresentações e leitura de artigos (português e inglês).

Agradecimentos



Xia JH, Liu CY, Tang BS, Pan Q, Huang L, Dai HP, Zhang BR, Xie W, Hu DX, Zheng D, Shi XL, Wang DA, Xia K, Yu KP, Liao XD, Feng Y, Yang YF, Xiao JY, Xie DH, Huang JZ. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat Genet* 1998;20:370–373.
Del Castillo, I; Villamar, M; Moreno-Pelayo, MA; Del Castillo, FJ; Alvarez, A; Tellería, D; Menéndes, I; Moreno, F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med*, 346(4): 243-249, 2002.
Russo, ICP. Overview of audiology in Brazil: state of the art. *Audiology*, 39(4): 202-206, 2000.
Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., and Jackson, R. B. (2011). *Amplifying DNA: The polymerase chain reaction (PCR) and its use in DNA cloning*. (10th ed., pp. 414-416). San Francisco, CA: Pearson.
Reece, J. B., Taylor, M. R., Simon, E. J., and Dickey, J. L. (2012). DNA profiling. *Em Campbell biology: Concepts & connections* (7th ed., pp 242-246). Kelsell DP et al: Connexin 26 mutations in hereditary nonsyndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387: 80–83.
Mafong DD, Shin EJ, Lalwani AK. Use of laboratory evaluation and radiologic imaging in the diagnostic evaluation of children with sensorineural hearing loss.
GOUVEIA, Fernanda Navarro et al. Perda auditiva unilateral e assimétrica na infância. *CoDAS* [online]. 2020, vol.32, n.1, e20180280. Epub , Jan 27, 2020. ISSN 2317-1782.