

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA**

**SURDEZ HEREDITÁRIA: MAPEAMENTO DA SÍNDROME DE BJORNSTAD**

**Autor:** José Faibes Lubianca Neto

**Orientador:** Flávio Danni Fuchs

**TESE DE DOUTORADO, 2000**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

Lubianca Neto, José Faibes

Surdez Hereditária: Mapeamento da Síndrome de Bjornstad / José Faibes

Lubianca Neto; orient. Flávio Danni Fuchs – Porto Alegre: UFRGS, 2000.

Xii, p. 89.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica.

1. Surdez hereditária; 2. Síndrome de Bjornstad; 3. Estudo de Ligação; 4.

Genética Molecular

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Roland Douglas Eavey, M.D., chefe da Divisão de Otorrinolaringologia Pediátrica do Massachusetts Eye and Ear Infirmary e Professor do Departamento de Otologia e Laringologia da Harvard Medical School, Boston, pela excelente acolhida no meu ano de "research fellowship" nos Estados Unidos e, acima de tudo, pela amizade e incentivos intelectuais constantes.

Ao Professor Jonathan G. Seidman, Ph.D., e à Professora Christine E. Seidman, M.D., Ph.D., do Departamento de Genética da Harvard Medical School, Boston, pela minha introdução no fascinante mundo da genética molecular da surdez e pela orientação diária na feitura dos diferentes experimentos de biologia molecular.

Ao Professor Flávio Danni Fuchs, M.D., Ph.D., meu padrão de excelência em pesquisa médica e exemplo de ética no comando de uma equipe de pesquisa e no relacionamento com colegas e pacientes, o meu agradecimento por me fornecer as ferramentas essenciais para tornar-me um pesquisador.

À família mexicana estudada, que, mesmo vivendo em condições desfavoráveis, não cansa de bravamente desafiar a desgraça de que foi acometida, não medindo esforços para facilitar nossa tarefa de pesquisa e para transpor os

imensos obstáculos financeiros para obtenção de próteses auditivas para TODOS os seus afetados.

A todos os colegas que participaram de forma direta ou indireta na obtenção do mapeamento da síndrome de Bjornstad e que aparecem na lista de autores da publicação, em especial aos Drs. Somkiat Sangwatanaroj e Leonard Lu, pela ajuda mais próxima na feitura dos experimentos e pela amizade dispensada.

À colega Daniela Boeira da Silva que, através das ilustrações dessa tese, demonstrou outro dom além do da Medicina, o da arte.

## DEDICATÓRIAS

À Jaqueline, esposa amada e amiga, pelo incentivo nas minhas horas de desânimo e compreensão nas suas horas de solidão.

Ao João Pedro, meu filho, o melhor presente que ganhei na vida!

Aos meus pais, Sérgio e Ilza, pelo orgulho que sinto de ser seu filho.

Ao Paulo Sérgio, meu irmão e amigo, que só poderia ter escolhido a profissão de lutar pela justiça.

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>6-10</b>
<b>2- REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>11-46</b>
2.1 – Mecanismo de audição.....	12-22
2.1.1 - Transdução mecano-elétrica.....	13-18
2.1.2 – Mecanismo de amplificação coclear.....	19-22
2.2 – Surdez hereditária.....	22-46
2.2.1 - Forma não-sindrômica de perda auditiva hereditária.....	23-24
2.2.1.1 - Genes mapeados e já seqüenciados causadores de perda auditiva não-sindrômica.....	24-34
2.2.2 - Forma sindrômica de perda auditiva hereditária.....	35-44
2.2.2.1 – Síndrome de Bjornstad.....	38-44
2.2.3 – Implicações clínicas e éticas dos avanços da genética molecular da surdez.....	44-46
<b>3 – OBJETIVOS.....</b>	<b>47-48</b>
3.1 - Principal.....	48
3.2 - Secundário.....	48
<b>4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49-61</b>
<b>5 – ARTIGO ORIGINAL REDIGIDO EM INGLÊS.....</b>	<b>62-68</b>
<b>6 – VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO ORIGINAL.....</b>	<b>69-89</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

A surdez, entendida como perda parcial (hipoacusia) ou total (cofose) da audição é a mais comum das deficiências sensoriais. Em torno de uma em cada 1000 crianças são afetadas por surdez grave ao nascer ou até o término do período pré-lingual. Mais uma em cada 1000 crianças se torna surda antes de alcançar idade adulta (1). Em torno de 0,3% da população manifesta perda auditiva acima de 65 decibéis (dB) entre 30 e 50 anos e 2,3% entre 60 e 70 anos (2). A prevalência de perda auditiva incapacitante em norte-americanos com mais de 75 anos de idade atinge a 360 em cada 1000 pessoas (3). Não se dispõe de dados epidemiológicos confiáveis sobre ocorrência de surdez na população brasileira.

A prevalência de deficiência auditiva hereditária alcança cifras significativas. Em países desenvolvidos, cerca de 60% das perdas auditivas graves pré-linguais são genéticas (4). Estimou-se a ocorrência de perda hereditária neurosensorial em 27 a cada 1000 pessoas (5). A surdez hereditária não-sindrômica de transmissão autossômica dominante, por exemplo, ocorre em aproximadamente uma a cada 40000 pessoas (5).

Em termos de saúde pública, perda auditiva tem impacto sócio-econômico maior do que outras deficiências sensoriais ou de que doenças neurológicas. A surdez em vários graus afeta quase 30 milhões de norte-americanos e custa à nação mais de 56 bilhões de dólares anualmente (6). Cegueira, por outra parte, afeta menos do que metade de indivíduos e associa-se a um gasto no mínimo 1/3 menor. A perda auditiva tem maior impacto econômico do que epilepsia, esclerose múltipla, lesões medulares, acidentes vasculares cerebrais e doenças de Huntington e Parkinson combinadas e, além disso, afeta quatro vezes mais indivíduos (6).

A surdez é um sintoma comum de diferentes doenças. Pode expressar-se em qualquer idade e ser classificada de diferentes formas (7) (quadro 1).



**Quadro 1.** Classificação da perda auditiva.

<b>CRITÉRIOS</b>	<b>SUBCATEGORIAS</b>
<b>Causa</b>	Genética (monogênica or multifatorial) Não genética
<b>Achados físicos associados</b>	Sindrômica Não-sindrômica
<b>Início</b>	Pré-lingual Pós-lingual
<b>Tipo</b>	Neurosensorial Condutiva Mista
<b>Gravidade</b>	
Leve	Perda de 25 – 40 dB
Moderada	Perda de 41 – 55 dB
Moderada-severa	Perda de 56 – 70 dB
Severa	Perda de 71 – 90 dB
Profunda	Perda > 90 dB
<b>Frequências envolvidas</b>	
Baixas	<500 Hz
Médias	501 – 2000 Hz
Altas	> 2000 Hz

\*Adaptado de Parving e Newton (7).

Embora alguns autores já considerem hipoacusia clínica quando a perda exceda 20 dB (7), ainda é consenso na prática clínica diária que a audição é

significativamente prejudicada somente quando a perda exceda 25 dB. Indivíduos com pelo menos 80 dB de perda em ambas orelhas são surdos graves. A não ser que melhorados através da protetização acústica ou cirurgia, essa perda é tão grave que impede o processamento da informação auditiva, com importantes repercussões na qualidade de vida.

Se a perda auditiva, principalmente pré-lingual, não é tratada precocemente, podem advir prejuízos. O que começa como problema sensorial, torna-se problema perceptual: a criança não consegue identificar objetos e eventos pelos sons que estes produzem; problema de fala: a criança não adquire o controle da fala; problema de comunicação: muitas vezes a criança não consegue expressar seus pensamentos sem o apoio de gestos e apresenta dificuldade para compreender o que lhe é dito; problema cognitivo: crianças com alterações na aquisição da linguagem aprendem sobre o mundo apenas pelo concreto; problema social: expresso pelas dificuldades para desenvolver comportamento apropriados em relação a outras pessoas; problema emocional: as crianças são incapazes de satisfazer suas necessidades que envolvam a linguagem falada; problema educacional: crianças apresentam um aproveitamento reduzido das experiências educacionais; problema intelectual: mesmo demonstrando inteligência não verbal, elas apresentam deficiências em conhecimentos gerais e na competência lingüística e problema vocacional: normalmente elas chegam à vida adulta com possibilidades limitadas para uma profissão remunerada (8).

Vêm ocorrendo mudanças profundas na sociedade nas décadas recentes que resultaram em mudanças na ênfase social de trabalho físico para comunicação. Durante os séculos 19 e 20, esforços da medicina foram dirigidos para prevenção de desnutrição, infecção, câncer e outras moléstias que diminuía a habilidade das pessoas de exercerem trabalhos braçais – base tradicional da riqueza da sociedade de

então. Hoje, a força da sociedade se baseia na habilidade comunicativa de seus membros. O foco da medicina está direcionando-se para a prevenção das desordens de comunicação. A disseminação do uso dos computadores pessoais aumentou a importância da informação-comunicação no cotidiano. Indivíduos com desordens de comunicação estão sob substancial risco de desemprego e de má qualidade de vida.

Avanços na ciência médica e nos cuidados da audição trazem dilema para profissionais envolvidos com perda auditiva: corrigir, ao invés de remediar, certos tipos de perda auditiva (9). É nesse contexto que se insere o estudo das perdas auditivas hereditárias, onde o foco das pesquisas se direciona para o mapeamento dos diversos genes no genoma humano, identificação e seqüenciamento desses genes e, por fim, para descoberta de estrutura e função de proteínas que codificam. O objetivo final é o de desenvolver tratamentos, como terapia gênica, que melhorem ou até revertam a deficiência auditiva (10,11).

Com essa revisão, objetiva-se rever bases histológicas e moleculares do processamento do estímulo auditivo, bem como resumir avanços alcançados na área da genética molecular da perda auditiva hereditária. Dentro das perdas sindrômicas, será dada especial atenção à Síndrome de Bjornstad, estímulo para desenvolvimento do artigo original apresentado.

**2- REVISÃO DE LITERATURA**

## 2.1 – Mecanismo de audição

A orelha humana é uma verdadeira usina produtora e modificadora de energia. O estímulo sonoro é captado pelo pavilhão auricular e condensado no conduto auditivo externo, através do qual alcança a membrana timpânica. A membrana vibra, transmitindo energia sonora, agora sob forma de energia mecânica, para os ossículos da orelha média. Estes estão articulados de tal forma que o movimento final de alavanca provoca um pistoneamento do estribo para dentro e para fora da janela oval, movimentando líquido que preenche o vestíbulo (orelha interna), gerando ondas viajantes na perilinfa. O efeito de alavanca dos ossículos (determinado pela diferença entre o comprimento do cabo do martelo e o processo longo da bigorna) multiplica a energia sonora que chega à janela oval em 1,3 vezes (12). Da mesma forma, a concentração de energia sonora determinada pela diferença de área entre a membrana timpânica ( $55\text{m}^2$ ) e a janela oval ( $3,2\text{ mm}^2$ ) multiplica em 17 vezes a pressão sonora que chega na janela oval (12). O produto dos efeitos de alavanca e hidráulico aumenta a pressão sonora em 22,1 vezes, o que equivale, aproximadamente, a um aumento de 30 dB (12). Qualquer alteração do sistema até aqui descrito provoca perda auditiva do tipo condutivo.

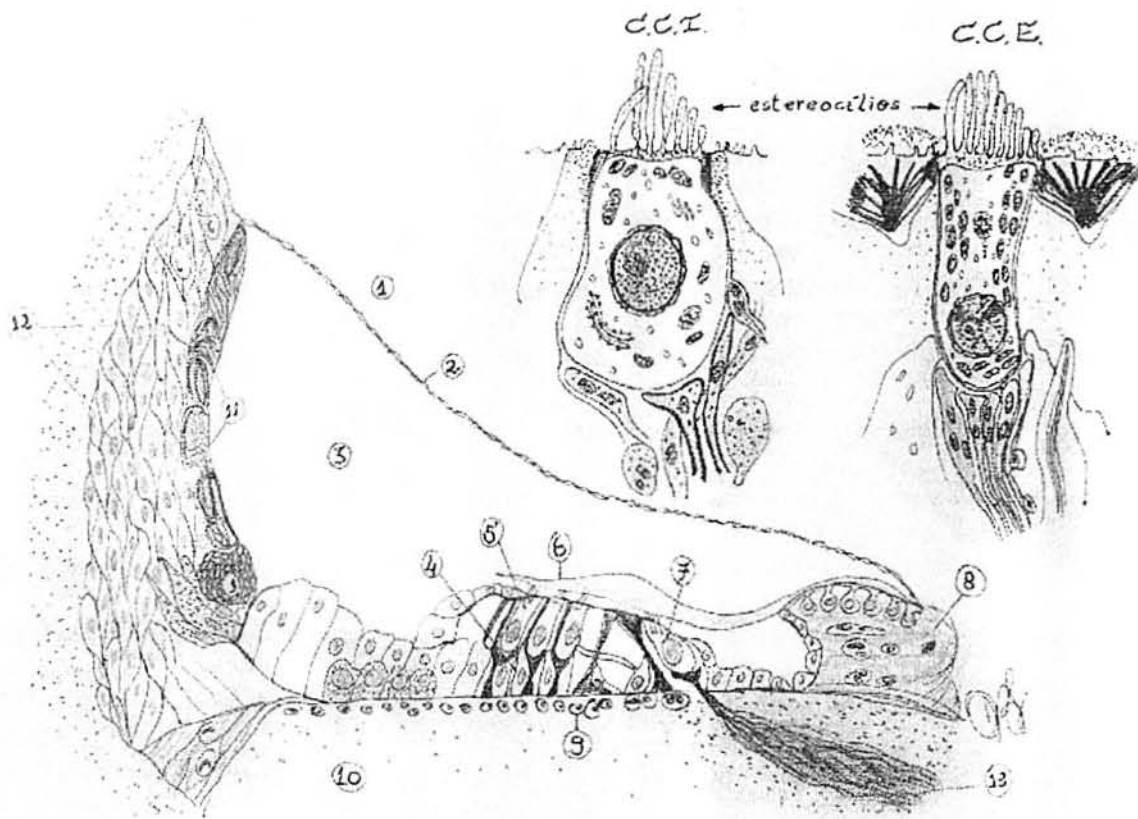
As ondas geradas pelo movimento do estribo fazem deflexões nas membranas dos órgãos de Corti (órgão sensorial da audição). Nesse ponto o estímulo é convertido em impulsos elétricos (transdução mecano-elétrica), que são transmitidos, através do VIII par craniano, para vias auditivas centrais e córtex. Saliente-se que o número de neurônios envolvidos na audição aumenta dramaticamente da cóclea em direção ao tronco cerebral e córtex auditivo (13). Toda informação auditiva é transduzida por somente 15000 células ciliadas, das quais as células ciliadas internas (3500) são

criticamente importantes, já que elas fazem sinapses com aproximadamente 90% a 95% dos 30000 neurônios primários auditivos. Em nível do núcleo coclear, o número de elementos neurais envolvidos é medido em centenas de milhares (13). Por isso, mesmo dano localizado, envolvendo poucas células na periferia do sistema auditivo, pode levar à perda auditiva substancial.

Para entender-se como a descoberta dos genes da surdez está ajudando na compreensão da fisiologia coclear, e também qual a razão da surdez em alguns dos pacientes afetados, é importante que se revise estrutura e funcionamento de elementos chaves no funcionamento coclear (membrana basilar e órgão de Corti com suas células ciliadas), bem como fenômenos de transdução mecano-elétrica e amplificação coclear (12, 14). A figura 1 é um esquema da rampa ou escala média, também conhecida como ducto coclear.

### **2.1.1 - Transdução mecano-elétrica**

Como bem resumiu Hudspeth, transdução mecano-elétrica ocorre quando estímulo mecânico abre canais iônicos da membrana plasmática da célula ciliada (15). O conseqüente influxo de corrente através desses canais altera potencial de membrana, o que por sua vez afeta taxa de liberação de vesículas sinápticas da célula ciliada. Excitada por esse mediador químico, fibra nervosa aferente conectada com superfície basolateral da célula ciliada transmite ao cérebro padrão de potenciais de ação que contém estímulos com características próprias, variando em intensidade, temporalidade e freqüência.



**Figura 1.** Representação de corte transverso do ducto coclear. As principais estruturas estão indicadas por números e são: 1 - Rampa ou escala vestibular; 2 - Membrana de Reissner; 3 - Rampa ou escala média ou ducto coclear; 4 - Célula de suporte; 5 - Célula ciliada externa (CCE); 6 - Membrana tectórica; 7 - Célula ciliada interna (CCI); 8 - Limbo espiral; 9 - Membrana basilar; 10 - Rampa ou escala timpânica; 11 - Estria vascular; 12 - Ligamento espiral; 13 - Nervo coclear. Em destaque, célula ciliada interna (CCI) e célula ciliada externa (CCE), a última mais estreita e alongada. Os estereocílios estão indicados na figura.

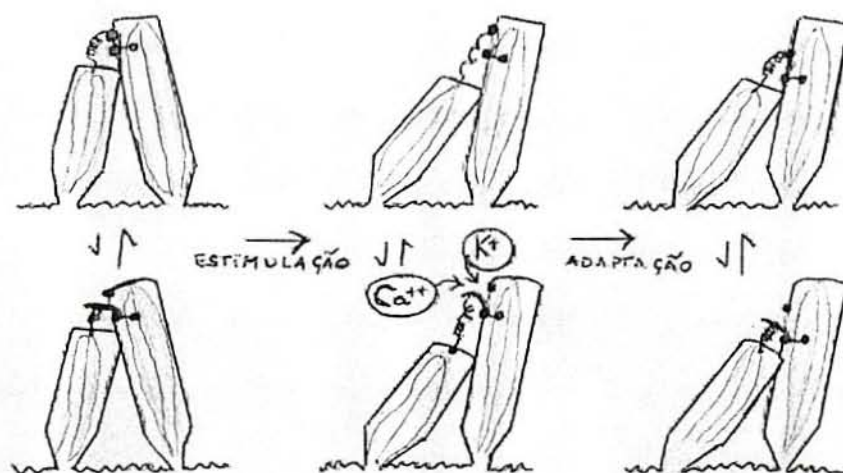
As paredes ósseas da rampa vestibular são rígidas, mas a membrana de Reissner (membrana que limita rampa vestibular e ducto coclear) é flexível. Como a membrana basilar não está sob tensão, é prontamente pressionada em direção à

escala timpânica pelos picos das ondas viajantes da escala vestibular. A energia do deslocamento do fluido na rampa timpânica se dissipa no ar através da janela redonda. Os ápices das células ciliadas no órgão de Corti são mantidos rígidos pela lâmina cuticular, e os esterocílios das células ciliadas externas estão embebidos na membrana tectórica, uma matrix extracelular acelular. Quando o estribo move-se, ambas membranas se movem na mesma direção, mas elas estão dispostas em diferentes eixos, propiciando um movimento que deflete os esterocílios. Os esterocílios das células ciliadas internas não estão inseridos na membrana tectórica, mas a contração da célula ciliada externa traciona a membrana tectórica a tal ponto que a faz tocar e defletir o ápice dos esterocílios das células ciliadas internas, gerando os impulsos elétricos que serão transmitidos ao nervo auditivo (15).

Em última análise, são as deflexões dos esterocílios motivados pelos movimentos antagônicos da vibração da membrana basal e da membrana tectórica que iniciam a transdução mecano-elétrica. Cada célula ciliada contém no seu pólo apical esterocílios cilíndricos dispostos em forma de "W". O esterocílio é projeção de célula ciliada, consistindo de córion de actina coberto pela membrana plasmática da célula, lembrando estrutura de microvilos (16). Os esterocílios são rígidos devido a um eixo de filamentos interligados de actina que estão inseridos em mexa de filamentos, também de actina, que constituem a placa cuticular. O eixo esterociliar deflete-se como um todo, devido às conexões laterais existentes entre cada esterocílio e pelo fato da base dos esterocílios ser mais estreita em relação ao corpo. Além dessas conexões laterais, cada esterocílio tem uma delgada conexão que une extremidade do esterocílio ao esterocílio vizinho mais alto. Acredita-se que canal iônico de transdução esteja ligado à esta conexão denominada ligamento apical (17). Os movimentos dos ligamentos apicais empurram e tracionam esterocílios adjacentes, abrindo canais de potássio

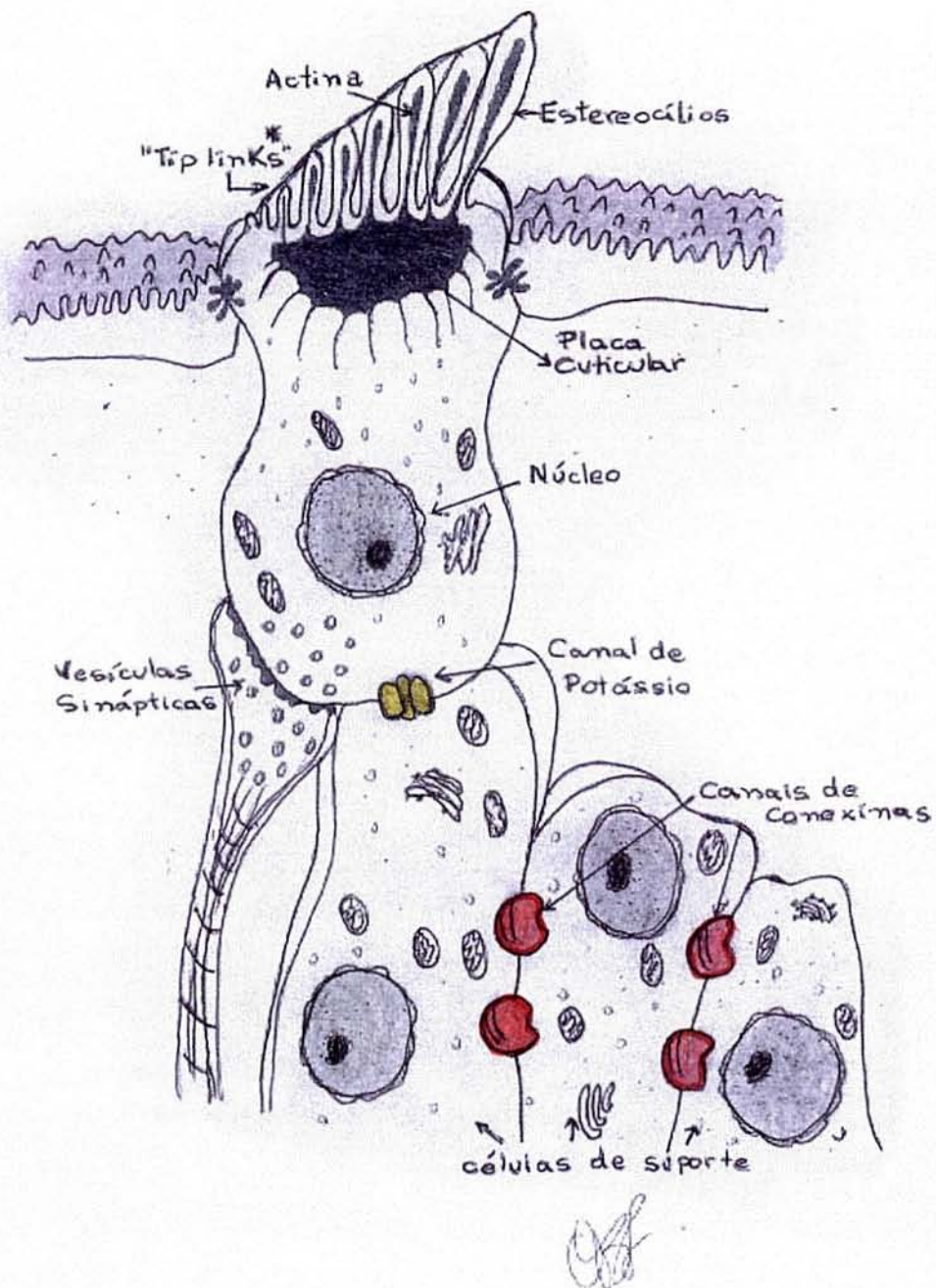


(vide figura 2). O ligamento apical é reposicionado alguns milissegundos após, provavelmente através de moléculas de miosina que deslizam pelo citoesqueleto de actina do esterocílio, reduzindo tensão do ligamento apical e determinando fechamento do canal de transdução (15).



**Figura 2.** Representação esquemática e dinâmica da deflexão de estereocílios tensionando ligamento apical que funciona como mola e abre canais de transdução, com entrada de íons potássio e cálcio, despolarizando a célula. Em repouso, o canal oscila entre aberto e fechado cerca de mil vezes por segundo (esquerda), mas está fechado a maior parte do tempo. A adaptação ocorre alguns milissegundos depois, reposicionando terminação do ligamento apical, reduzindo tensão e permitindo fechamento (segundo modelo de Hudspeth, referência 15).

O ducto coclear é preenchido por endolinfa rica em potássio. Esse íon é ativamente secretado pela estria vascular, mesmo contra gradiente de concentração do interior do ducto coclear. A diferença de potencial existente entre interior positivo do ducto coclear (+ 80mV) e interior negativo das células ciliadas (-45mV nas células ciliadas internas e -70 mV das células ciliadas externas) é fundamental para permitir rápida excitabilidade de células ciliadas em resposta a estímulo mecânico vibratório provocado pela onda sonora (18). O influxo de íons potássio, secundário à abertura de canais de transdução da célula ciliada, resulta em troca de potencial de membrana (despolarização), iniciando estímulo elétrico. A despolarização das células ciliadas, então, ativa os canais de cálcio na superfície basolateral das células, levando ao influxo de cálcio para dentro das células ciliadas. O influxo desencadeia liberação de neurotransmissores que ativam o nervo acústico. Células ciliadas são repolarizadas quando íons de potássio deixam essas células, através dos canais de potássio e entram nas células de suporte epiteliais. Os íons potássio então difundem-se para estria vascular através das junções do tipo "gap", formadas por conexinas e são secretados de volta para endolinfa através dos canais de potássio, assim restaurando o sistema de transdução mecano-elétrico (6,15). A figura 3 traz representação esquemática das várias interconexões celulares.



**Figura 3.** Representação esquemática das principais estruturas envolvidas na função das células ciliadas (adaptado da referência 19). \* "Tip links" – ligamentos apicais.

### 2.1.2 – Mecanismo de amplificação coclear

O movimento da platina na janela oval provoca deslocamentos da perilinfa na escala vestibular, iniciando “ondas viajantes de Békésy” (20). Na medida que a onda viaja da base até o ápice da cóclea, sua amplitude de vibração aumenta até um máximo e, então, decai rapidamente. A distância do estribo a esse ponto de amplitude máxima varia com a frequência da vibração que iniciou a onda. Como a membrana basilar tem características físicas distintas nos diferentes giros da cóclea (mais fina e rígida na base e mais espessa e flácida no ápice), sons agudos tendem a ter o ponto de amplitude de vibração máxima próximo à janela oval, enquanto sons mais graves tendem a atingirem esse ponto nos giros mais apicais da cóclea (20).

Por muito tempo, acreditou-se que esse mecanismo passivo descrito nos clássicos experimentos de von Békésy, que aliás lhe renderam prêmio Nobel de 1961, seria responsável pela seletividade de frequência dentro da cóclea (14). No entanto, alguns pontos permaneciam inexplicados. Como esse pesquisador examinou ossos temporais de cadáveres humanos e com tecnologia precária, a rigidez da membrana basilar só permitia documentar movimentos oscilatórios com estímulos sonoros de alta intensidade, acima de 145 dB. Estímulos próximos ao limiar auditivo (10 a 20 dB) não proporcionavam respostas vibratórias da membrana basilar. Além disso, movimentos da membrana basilar eram muito amplos e o pico da vibração ocorria numa região muito extensa da cóclea. Isso não explicava a excepcional discriminação de frequências documentada em seres humanos que conseguem diferenciar sons cujas frequências são apenas 0,2% a 0,5% diferentes (21). Músicos treinados podem distinguir dois tons puros de 1000 Hz que diferem em sensação de frequência por somente 1 Hz – uma diferença de frequência de apenas 0,1% (6).

Como células ciliadas internas recebem cerca de 90 a 95% dos nervos aferentes, enquanto células ciliadas externas recebem apenas 5%, desde cedo seu papel como verdadeiro receptor sensorial do órgão de Corti era suspeitado, já que fornecem virtualmente toda informação auditiva para o cérebro (22). Além disso, demonstrou-se que potenciais intracelulares medidos nas células ciliadas internas após estímulo auditivo têm mesma seletividade de frequências que nas fibras do nervo auditivo, de onde se conclui que estímulo que vai ao nervo auditivo vem da célula ciliada interna (23).

Se a célula ciliada interna é receptor sensorial, qual seria então a função das células ciliadas externas? O processo de amplificação coclear começa a se deteriorar se células ciliadas externas forem danificadas ou modificadas, como por exemplo, farmacologicamente (24). Porém, foram a demonstração de que a orelha média emite sons em resposta a um estímulo acústico (25) ou espontaneamente (26), e o fato de que as células ciliadas apresentam motilidade quando eletricamente estimuladas "in vitro" (27) que esclareceram o papel-chave das células ciliadas externas como elemento efetor no processo de amplificação coclear.

Célula ciliada externa isolada, quando estimulada eletricamente "in vitro", encurta-se quando despolarizada e se alonga quando hiperpolarizada (27). Existe alteração real na forma dessas células. Essa alteração pode ser tão grande quanto 5% do comprimento original da célula, o que é uma considerável alteração biológica. Esse é o mecanismo proposto pelo qual a célula ciliada externa influi mecanicamente na sua vizinhança (15).

Embora inicialmente se pensasse que esse mecanismo era secundário à contração do tipo muscular, já que se tinha ciência da presença de proteínas contráteis, de complexo citoesqueleto e de arranjo de cisternas endoplasmáticas paralelas à

membrana plasmática de células ciliadas externas, alguns estudos refutaram tal hipótese (28). Uso de bloqueadores metabólicos não interferiu na eletromotilidade das células ciliadas externas, indicando que tal fenômeno era independente de ATP (29). Da mesma forma, digestão de todo conteúdo citoplasmático (incluindo citoesqueleto e cisternas endoplasmáticas) com tripsina não aboliu motilidade da célula ciliada externa (30).

Somado a isso, demonstrou-se que a atividade motora das células ciliadas externas coincide com denso arranjo de proteínas integrais de membrana que se distribui ao longo da membrana plasmática basolateral (30). Saliente-se que a célula ciliada externa é única com relação ao fato de ter aproximadamente 75% de sua superfície coberta por proteínas (22). Tal configuração não é encontrada em nenhum outro tipo de célula. A forma mais aceita para a ação do "motor" é que tais proteínas representem a estrutura sensório-motora da célula ciliada externa, ou seja, sejam os próprios sensores da variação na voltagem da membrana plasmática e os próprios efetores da motilidade (22). Recente estudo identificou gene, designado *prestina*, que é especificamente expresso nas células ciliadas externas. Muitos genes ficam conhecidos pelo nome da proteína que codificam, e esse é um exemplo. Pesquisadores demonstraram alterações de forma induzidas por voltagem em células renais humanas cultivadas "in vitro". Tais células expressam *prestina* e suas respostas elétricas são muito semelhantes a das células ciliadas, demonstrando capacitância não-linear. Concluíram que *prestina* é a proteína motora da célula ciliada externa (31).

Pelo dito até aqui, entende-se o porquê da definição poética de Hudspeth ao referir-se à orelha interna. Para ele, a orelha interna é "trunfo evolucionário de miniaturização, pois compactados no volume de uma bola de gude estão sistema de

orientação inercial tridimensional, amplificador acústico e analisador de frequências” (15).

A revisão de funcionamento coclear objetivou contextualizar diferentes estruturas e moléculas que participam na transdução mecano-elétrica e na discriminação de frequências. Assim, mutações em genes que codificam proteínas específicas expressas no órgão de Corti, como conexinas que formam junções do tipo “gap”, proteínas formadoras dos canais de potássio, elementos colágenos e não-colágenos formadores da membrana tectórica, miosinas, entre outras ainda não conhecidas, podem ter conseqüências fatais para audição.

## **2.2 – Surdez hereditária**

Aproximadamente 60% dos casos de surdez pré-lingual em países desenvolvidos são devidos a defeitos genéticos (4). Em países em desenvolvimento, como o Brasil, causas infecciosas ainda são bastante comuns, mas esse número tende a diminuir com a melhoria gradativa das condições de saúde pública. Assim, etiologia genética tende a se tornar cada vez mais importante também entre nossos casos de surdez.

Na maioria dos casos a perda auditiva é uma desordem multifatorial causada por fatores genéticos e ambientais. Entretanto, mutações de genes isolados podem levar ao déficit auditivo. Nesses casos, perda auditiva é doença monogênica que pode ter forma de herança autossômica dominante, autossômica recessiva, ligada ao X ou mitocondrial. É importante salientar que perda auditiva genética não é necessariamente congênita, e muitos casos de famílias afetadas por surdez hereditária podem manifestar essa desordem mais tardiamente na vida (após a 4ª década de

vida). A surdez hereditária pode ser sindrômica (caracterizada por hipoacusia em combinação com outras anormalidades) ou não-sindrômica (somente com perda auditiva). Há inúmeras revisões recentes sobre surdez hereditária (19,32,33,34).

### **2.2.1 - Forma não-sindrômica de perda auditiva hereditária**

Aproximadamente 85% dos casos de surdez pré-lingual não-sindrômica se manifestam como formas autossômicas recessivas. Formas autossômicas dominantes respondem por 12 a 14% dos casos e os restantes 1 a 3% são heranças mendelianas ligadas ao cromossomo X (32,33). Também se descrevem formas herdadas exclusivamente através da mãe, correspondendo à herança mitocondrial, associadas ou não à herança autossômica dominante.

Em termos fenotípicos, formas autossômicas recessivas são mais severas, sendo responsáveis por aproximadamente todas formas de surdez congênita. Na maioria das vezes, são devidas a defeitos cocleares. Formas autossômicas dominantes parecem contribuir mais importantemente para casos de surdez pós-lingual. Essas últimas são geralmente progressivas, menos severas (pelo menos nos anos iniciais de aparecimento) e podem mostrar associação de déficits tanto condutivos quanto sensorineurais (32,33).

Convencionou-se chamar diferentes localizações cromossômicas ("locus" em latim, plural "loci") de formas não-sindrômicas de surdez genética com a sigla DFN (oriunda do inglês "deafness"), acrescida ou não das letras A e B, significando forma de transmissão autossômica dominante e recessiva, respectivamente. Quando aparecer DFN isoladamente, leia-se forma de transmissão ligada ao cromossomo X. Até o momento, já foram mapeadas 60 formas de surdez não-sindrômica. Desse total, 28



são perdas auditivas não-sindrômicas de transmissão autossômica dominante (DFNA), 26 de transmissão autossômica recessiva (DFNB), 4 de transmissão ligada ao cromossomo X (DFN) e 2 de transmissão mitocondrial. Os quadros 2,3,4 e 5, retirados com algumas modificações da "Hereditary Hearing Loss Homepage", descrevem forma genética de transmissão, localizações cromossômicas e genes já descritos para diferentes formas de surdez não-sindrômica (35).

#### **2.2.1.1 - Genes mapeados e já seqüenciados causadores de perda auditiva não-sindrômica**

A busca por genes responsáveis pelas formas não-sindrômicas de surdez está apenas começando, embora o ritmo de aquisição de novos conhecimentos na área seja muito rápido. Desde 1992, data da publicação do primeiro artigo mapeando uma forma não-sindrômica de surdez, já foram identificados 60 "loci" (35), já que mais recentemente a DFN1 foi associada à síndrome envolvendo distonia, retardo mental e cegueira progressivos, portanto não representando "locus" não-sindrômico (36).

**Quadro 2.** Formas de surdez genética não-sindrômica de transmissão autossômica dominante.

<b>NOME DO LOCUS</b>	<b>LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA</b>	<b>GENE</b>
DFNA1	5q31	HDIA1
DFNA2	1p34	GJB3,KCNQ4
DFNA3	13q12	GJB2, GJB6
DFNA4	19q13	?
DFNA5	7p15	DNFA5
DFNA6	4p16,3	?
DFNA7	11q21-q23	?
DFNA8	11q22-24	TECTA
DFNA9	14q12-q13	COCH
DFNA10	6q22-q23	?
DFNA11	11q12,3-q21	MYO7A
DFNA12	11q22-q24	TECTA
DFNA13	6p21	COL11A2
DFNA14	4p16	?
DFNA15	5q31	POU4F3
DFNA16	2q24	?
DFNA17	22q	?
DFNA18	3q22	?
DFNA19	10 (pericentromérico)	?
DFNA20	17q25	?
DFNA21	Em confirmação	?
DFNA22	Em confirmação	?
DFNA23	14q21-q22	?
DFNA24	4q	?
DFNA25	12q21-24	?
DFNA26	17q25	?
DFNA27	4q12	?
DFNA28	8q22	?
DFNA29	Em confirmação	?
DFNA30	15q26	?
DFNA31	Excluído	-
DFNA32	Em confirmação	?
DFNA33	Em confirmação	?
DFNA34	Em confirmação	?
DFNA35	Em confirmação	?
DFNA36	9q13-q21	?

**Quadro 3.** Formas de surdez genética não-sindrômica de transmissão autossômica recessiva.

<b>NOME DO LOCUS</b>	<b>LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA</b>	<b>GENE</b>
DFNB1	13q12	GJB2
DFNB2	11q13,5	MYO7A
DFNB3	17p11,2	MYO15
DFNB4	7q31	PDS
DFNB5	14q12	?
DFNB6	3p14-p21	?
DFNB7	9q13-q21	?
DFNB8	21q22	?
DFNB9	2p22-p23	OTOF
DFNB10	21q22,3	TMPRSS3
DFNB11	9q13-q21	?
DFNB12	10q21-q22	?
DFNB13	7q34-q36	?
DFNB14	7q31	?
DFNB15	3q21-q25 e 19p13	?
DFNB16	15q21-q22	?
DFNB17	7q31	?
DFNB18	11p14-p15,1	?
DFNB19	18p11	?
DFNB20	11q25-qter	?
DFNB21	11q	TECTA
DFNB22	Em confirmação	?
DFNB23	10p11,2-q21	?
DFNB24	11q23	?
DFNB25	4p15,3-q12	?
DFNB26	4q2 e 1q22-23	?
DFNB27	Em confirmação	?
DFNB28	22q13	?
DFNB29	Em confirmação	?

**Quadro 4.** Formas de surdez genética não-sindrômica de transmissão ligada ao cromossomo X.

<b>NOME DO LOCUS</b>	<b>LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA</b>	<b>GENE</b>
DFN1	Xq22	DDP
DFN2	Xq22	?
DFN3	Xq21,1	POU3F4
DFN4	Xq21,2	?
DFN5	Excluído	excluído
DFN6	Xp22	?
DFN7	Excluído	excluído
DFN8	Em confirmação	?

**Quadro 5.** Formas de surdez genética não-sindrômica de transmissão mitocondrial

GENE	MUTAÇÃO
12SrRNA	1555A->G
TRNA-Ser (UCN)	7445A->G
	7472insC
	7510T->C
	7511T->C

O total de 19 genes responsáveis por surdez hereditária não-sindrômica já foram identificados, seqüenciados e publicados (35). Isso significa dizer que aproximadamente 32% das formas já mapeadas de perda auditiva hereditária não-sindrômica já tem seu gene mutado identificado. Nessa revisão não está incluída discussão sobre gene DDP, pois ele causa perda auditiva sindrômica recessiva ligada ao X, e não perda não-sindrômica, como originalmente descrito (36).

Mutações nos genes de dois tipos de miosinas não-convencionais, **miosina 15** (MYO15) e **miosina 7A** (MYO7A), foram identificadas como responsáveis por surdez genética. As miosinas não-convencionais são “motores moleculares” que se ligam à actina, hidrolizam ATP e deslocam-se ao longo dos filamentos de actina do estereocílio. Cortes histológicos em ratos com mutação da MYO15 mostram células ciliadas com estereocílios muito pequenos e um longo feixe contendo actina, que protui da terminação basal do estereocílio (37). Isso parece indicar que MYO15 é necessária para organização de actina nas células ciliadas. A miosina 15 está implicada em forma recessiva não-sindrômica de perda auditiva: DFNB3 (37,38). Miosina VIIA é responsável

por perda auditiva pré-lingual autossômica recessiva -DFNB2 (39), por perda auditiva pós-lingual autossômica dominante e progressiva afetando todas frequências -DFNA11 (40), além de ser o gene mutado na síndrome de Usher tipo 1b (41). Na orelha interna, este último tipo de miosina está presente tanto nas células ciliadas externas como nas células ciliadas internas (embora em maior concentração nas últimas) e sua função parece estar relacionada com estrutura dos estereocílios e com transdução de sinal durante processo de audição. Miosina VIIA pode carrear ou ancorar outras moléculas que são importantes para formar arranjo preciso de estereocílios, além de já ter sido associada com liberação de vesículas sinápticas (42). Arranjo em forma de "W" dos estereocílios é importante para permitir abertura sincronizada dos canais iônicos durante vibração induzida pelo movimento da endolinfa. Em ratos com mutações na miosina VIIA, ao invés da conformação típica, o que se vê são os estereocílios organizados anarquicamente, em pequenos tufo, determinando surdez (43).

A **Conexina 26** (Cx26) , também chamada **GJB2** ("gap junction protein beta-2"), um dos genes que codifica proteína da família das conexinas, já foi identificada como contendo mutações em formas autossômicas dominantes (DFNA3) (44,45) e recessivas (DFNB1) de perda auditiva (44,46,47). Esse gene foi identificado em 1997 e foi o primeiro gene relacionado com perda auditiva não-sindrômica conhecido (44). Conexinas formam junções do tipo "gap" que são canais de membrana plasmática que funcionam como comunicações intercelulares. Junções do tipo "gap" estão envolvidas no processo de criação e manutenção do potencial endo-coclear e formam comunicações intercelulares entre células de suporte do órgão de Corti. Defeito na estrutura e funcionamento dessas comunicações intercelulares prejudicaria mecanismo de escoamento de potássio para estria vascular, mecanismo que também é responsável pela rápida resposta da célula ciliada ao novo estímulo sonoro (48).

Conexina 26 parece ser gene extremamente comum na gênese da surdez hereditária. Na verdade, DFNB1 é a forma mais comum de perda auditiva autossômica recessiva, sendo causa de aproximadamente 20% dos casos de perda auditiva hereditária pré-lingual. A perda auditiva é usualmente congênita e estável, com pouca progressão, e sua severidade varia de moderada à profunda (19). Em trabalho recente, 65 famílias com história de surdez provenientes de vários países (Tunísia, França, Nova Zelândia e Reino Unido) foram testadas para mutações na conexina 26. Em 39 dessas encontrou-se mutações nesse gene. O que chamou mais atenção é que, em 70% das vezes, a mutação foi a mesma (49). Esse achado, associado ao fato da conexina 26 ser gene com estrutura extremamente simples (contendo somente uma região codificadora), justifica previsão otimista de que será relativamente simples de se desenvolver teste diagnóstico genético de uso clínico corriqueiro para detectar mutações na conexina 26. Tal teste poderá permitir diagnóstico rápido de surdez em recém-nascidos, permitindo, no mínimo, intervenção precoce. Ressalte-se que alguns centros brasileiros (Minas Gerais e São Paulo) já realizam teste para identificar a mutação mais comum desse gene: 30delG (uma extensão de 6 resíduos de Guanina na posição 30-35 da seqüência de DNA desse gene).

Mutações em outro tipo de conexina, **conexina 31**, (**GJB3** ou **Cx31**), também expressa na cóclea, foram recentemente relacionadas com perda auditiva autossômica dominante não-sindrômica (DFNA2) em duas pequenas famílias chinesas (50). Mutações em outro subtipo dessas proteínas, a **conexina 30** (**GJB6** ou **Cx30**), também foram implicadas na DFNA3 (51).

O "diaphanous" (**HDIA1** ou **DIAPH1**) é um gene da família das forminas responsáveis pela definição da polaridade celular. Mutação identificada nessa proteína só foi descrita em uma grande família da Costa Rica, com perda auditiva progressiva,

primariamente nas baixas frequências (52). A DFNA1 foi a primeira forma de surdez não-sindrômica mapeada (53). Parece que a proteína codificada por esse gene serve como suporte temporário para actina, quando ela se rearranja para ajudar a célula a se dividir ou formar projeções, como os estereocílios. A ação parece ser indireta através do recrutamento da profilina, proteína ligadora de actina, que induz a polimerização da actina, regulando sua dinâmica (52).

Outro gene já identificado como causador de perda auditiva não-sindrômica, **POU3F4** (domínio POU, classe 3, fator de transcrição 4), codifica proteína relacionada com transcrição de DNA, que desempenha importante papel na regulação do desenvolvimento de tipos celulares (54). Esse gene parece estar envolvido com maturação de osso, tanto que ratos com inativação do POU3F4 têm desenvolvimento anormal do labirinto ósseo e dos ossículos da orelha média. Mutações neste gene foram encontradas em forma não-sindrômica ligada ao cromossomo X (DFN3), que determina perda auditiva congênita, mista e progressiva com fixação da platina do estribo. Esses pacientes possuem comunicação anormal entre líquido e perilinfa, a qual pode causar fístula durante a estapedotomia ("gusher" perilinfático) (55,56). Gene com função semelhante, **POU4F3** (domínio POU, classe 4, fator de transcrição 3), é expresso somente nas células ciliadas. Parece importante para sobrevivência das células do órgão de Corti (54). Quando mutado, é responsável por forma autossômica dominante progressiva de perda auditiva, DFNA15 (57).

Gene **TECTA**, assim chamado por ser responsável pela síntese de proteína estrutural da membrana tectórica do órgão de Corti (alfa-tectorina), demonstrou mutações em três formas de surdez genética pré-lingual: DFNA8, DFNA12 e DFNB21 (58,59). A membrana tectórica é matrix extracelular e acelular da orelha interna que contacta e deflete feixes de estereocílios de células ciliadas durante estimulação

sonora, agindo como ressonador. Alfa-tectorina é um dos maiores componentes não-colágenos da membrana tectórica (aproximadamente 50% do conteúdo proteico da membrana tectórica, junto com  $\beta$ -tectorina) (60).

Novas mutações no gene **PDS**, assim denominado por ser o gene mutado na síndrome de Pendred (associação de bócio com anormalidades da orelha interna) (61), também foram encontradas nos afetados por forma de surdez autossômica recessiva pré-lingual, DFNB4 (62). Originalmente, pensou-se que a proteína codificada pelo PDS, pendrina, fosse responsável pelo transporte de íons sulfato. Atualmente acredita-se que seja mais provavelmente transportadora dos íons iodo e cloro (63). O transporte deficiente de iodo pode explicar anormalidades tireoidéias nesses pacientes, e o transporte defeituoso de cloro pode explicar desenvolvimento anormal da cóclea e perda auditiva. A diminuição do transporte de cloro pode causar fluxo anormal de fluidos na cóclea, levando a alargamento do aqueduto vestibular e à perda auditiva (19). Ainda mais recentemente, isolou-se gene que codifica proteína prestina, tida como a proteína motora da célula ciliada externa, que mostra moderada similiaridade de seqüência com o PDS (31).

Outro gene isolado é o **COCH**. Em relação a esse gene, tivemos oportunidade de participar na busca de famílias afetadas, coleta de amostras sanguíneas, isolamento do DNA, verificação da ligação das diferentes famílias para o mesmo "locus" e seqüenciamento na busca de mutações. Publicado na edição de novembro de 1998 da "Nature Genetics" (64), esse gene é responsável por forma de surdez não-sindrômica de tipo autossômico dominante de aparecimento tardio, progressivo, inicialmente nas altas freqüências, associado com labirintopatia (DFNA9) (65). Indivíduos começam a perder audição entre 16 e 28 anos de idade (média 21 anos). A perda auditiva é lentamente progressiva, aproximadamente de 3dB por ano. Inicialmente, a perda



auditiva é mais pronunciada nas altas frequências; eventualmente progride para anacusia na meia-idade. Quatro membros familiares foram submetidos à implante coclear na 5ª década de vida, com bons resultados. Vários indivíduos também apresentam sinais de déficits vestibulares. Estima-se que mutações nesse gene sejam a principal causa de perda auditiva não-sindrômica autossômica dominante pós-lingual. Isolaram-se 3 mutações diferentes em cada uma das três famílias analisadas que, fenotipicamente, apresentavam depósitos acidofílicos homogêneos de etiologia desconhecida na histopatologia do osso temporal (66,67). Encontrou-se prevalência maior do que 25% de pacientes com sintomas de doença de Ménière em famílias com mutação no gene COCH (68). A função desse gene permanece desconhecida, embora suspeite-se, por homologia com outras proteínas e pelo seu padrão de expressão nas estruturas de suporte da cóclea, que tenha importante papel na formação da matriz extra-celular.

Mutações no **DFNA5**, gene que recebeu mesmo nome da forma de surdez não-sindrômica autossômica dominante que produz, levaram à perda auditiva neurosensorial, especialmente em altas frequências, em uma família holandesa. Não se tem pistas sobre sua função até o momento (69).

Mutações no **KCNQ4**, gene da família dos codificantes dos canais de potássio, foram associadas à forma autossômica dominante progressiva de surdez, que inicia nas altas frequências, DFNA2 (70). Canais de potássio regulam sinalização elétrica e composição iônica de fluidos biológicos, como a endolinfa. Mutações em outros 3 genes conhecidos do ramo KCNQ da família dos canais de potássio causam arritmias cardíacas (em alguns casos associadas com surdez – síndrome de Jervell e Lange-Nielsen) e epilepsia neonatal (71,72). O produto do gene KCNQ4 provavelmente forme canais de potássio situados na superfície basolateral das células ciliadas (sua

expressão é limitada às células ciliadas externas), os quais permitem fluxo de potássio das células ciliadas para células de suporte. Das células de suporte, tais íons alcançam a estria vascular via junções do tipo "gap". Os íons potássio são então secretados da estria vascular para endolinfa através dos canais de potássio formados pelos produtos dos genes **KCNQ1** e **KCNE1**. Alterações na estrutura desses canais podem causar surdez por afetarem secreção de endolinfa (**KCNQ1**) ou através de mecanismo intrínseco às células ciliadas externas (**KCNQ4**).

Mutação no gene **OTOF**, que codifica proteína citosólica otoferlina, foi identificada como responsável pela forma DFNB9, forma de surdez pré-lingual de intensidade severa à profunda (73). Otoferlina interage com fosfolipídios de membrana plasmática e está envolvida com fusão de vesículas contendo neurotransmissores com a membrana plasmática. Na orelha interna de camundongos, o gene é expresso principalmente nas células ciliadas internas, o que parece confirmar seu papel na fusão das membranas de vesículas sinápticas (73).

O gene **COL11A2**, além de causar síndrome que combina osteocondrodisplasia e perda auditiva e forma não-ocular da síndrome de Sticker, foi isolado em duas famílias com surdez não-sindrômica autossômica dominante – DFNA 13 (74). A audição tipicamente está diminuída nas frequências médias e a perda não é progressiva. Provavelmente esse gene codifique forma de colágeno importante na formação e manutenção da estrutura da membrana tectórica. A microscopia eletrônica de cócleas de camundongos surdos graças à modificação genética feita no gene **COL11A2** mostra desorganização das fibrilas de colágeno formadoras da membrana tectórica (74).

Em maio de 2000, foi apresentado último gene não-sindrômico de transmissão autossômica de perda auditiva que se tem notícia (35). É o gene **TMPRSS3**,

responsável pela DFNB10. Na fonte disponível, não são dados maiores detalhes sobre estrutura e função deste gene.

Várias mutações em genes de DNA mitocondrial, genes **12S rRNA** e **tRNA<sup>(ser)</sup>** **UCN** também predisõem à perda auditiva relacionada com idade. Em particular, mutação A1555G no gene 12S rRNA foi relacionada com maior susceptibilidade à perda auditiva após uso de antibióticos aminoglicosídeos e pode ser importante causa de perda progressiva de audição em algumas populações, mesmo na ausência da exposição a aminoglicosídeos (75).

Resumindo, na cóclea, mutações de genes que codificam proteínas componentes do aparato de transdução, que afetam estrutura do estereocílio e da membrana tectórica, que estejam envolvidas na liberação da vesícula sináptica, ou que participem no transporte de potássio podem resultar em perda auditiva.

A clonagem de genes responsáveis por todas diferentes formas de perda auditiva, embora caminhe a passos largos, continua sendo grande desafio. Devido à grande heterogeneidade genética e clínica na apresentação da doença, a definição de intervalos genômicos associados com doença é mais facilmente realizada com estudo de grandes famílias onde surdez é segregada através de diferentes gerações. Uma vez identificados, estes intervalos ainda contêm grande número de genes, ou mesmo de transcritos ainda não identificados. Isto explica porque, à exceção dos 16 casos mencionados, todos genes responsáveis por estas condições ainda não foram seqüenciados. Com o recente término do projeto Genoma Humano, espera-se grande impulso no seqüenciamento genético.

### 2.2.2 - Forma sindrômica de perda auditiva hereditária

As formas ditas sindrômicas perfazem aproximadamente 30% dos casos de surdez em crianças (76) e o déficit auditivo é, na grande maioria, condutivo ou misto (condutivo + sensorineural). Mais de 200 síndromes envolvendo perda auditiva já foram descritas. Grande proporção destas consiste em defeitos na formação embriológica da orelha e aproximadamente 60 genes implicados nestas síndromes já foram mapeados no genoma humano. Mais da metade destes já foram clonados (77).

Uma das mais importantes contribuições da genética molecular no estudo das formas sindrômicas de surdez foi a demonstração de que mesmo síndromes clássicas podem ter um espectro de diferentes genótipos. A classificação clínica da Síndrome de Waardenburg a subdivide em 4 grupos: tipo I (com lateralização do canto médio do olho – “distopia canthorum”), tipo II (sem “distopia canthorum”), tipo III (anormalidades de membros superiores + tipo I) e tipo IV (doença de Hirschsprung + tipo II). Já a classificação molecular dessa síndrome a divide em 5 tipos, causados por 3 diferentes genes. O mesmo ocorre com a Síndrome de Usher que tem 3 tipos clínicos: tipo I (perda auditiva congênita profunda com labirintopatia), tipo II (perda auditiva “em declive” sem labirintopatia) e tipo III (perda auditiva progressiva com acometimento labiríntico variável). Entretanto, de acordo com classificação molecular, já são reconhecidos no mínimo 8 subtipos (vide quadro 2). O quadro 6 descreve resumidamente síndromes mais conhecidas, apresentando resumo do fenótipo, localização cromossômica e gene mutado causador (quando já descrito).

**Quadro 6.** Principais síndromes associadas com surdez.

<b>SÍNDROMES Fenótipo</b>	<b>CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR</b>	<b>LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA</b>	<b>GENE</b>
<b>WAARDENBURG</b>	Type I (WS1)	2q35	PAX3
"Distopia canthorum" + Heterocromia de íris + Mecha branca topete + Surdez NS	Type II (WS2) Klein-Waardenburg Waardenburg-Shah Waardenburg-Shah	3p14,1-p12,3 2q35 13q22 20q13.2-q13.3	MITF PAX3 EDNRB EDN3
<b>PENDRED</b> Bócio + Surdez NS		7q21-34	PDS
<b>ALPORT</b> Nefropatia + surdez NS	Autossômicas	2q36-q37	COLA3 COLA4 COLA5
<b>USHER</b>	ligada ao X USH1A USH1B USH1C USH1D USH1E USH1F USH2A USH3	Xq22 14q32 11q13,5 11p15,1 10q 21q 10 1q41 3q21-q25 8q13,3	? MYO7A ? ? ? ? ? ? EYA1
<b>BRANQUIO-OTO- RENAL</b> Cistos branquiais + nefropatias + surdez			
<b>JERVELL AND LANGE-NIELSEN</b>	JLNS1 JLNS2	11p15,5 21q22,1-q22,2	KVLQT1 KCNE1 (IsK)
Intervalo QT longo no ECG + surdez NS			
<b>TREACHER COLLINS</b> Hipoplasia da maxila Malformação orelha externa e média + fenda palatina + deslocamento infero- lateral das fissuras palpebrais.		5q32-q33,1	TREACLE
<b>HUNTER</b> Hipoacusia Zária ao acúmulo de mucopolissacarídeos		Xq28	Iduronato-2- sulfatase
<b>HURLER</b> Hipoacusia Zária ao acúmulo de mucopolissacarídeos		4p16,3	$\alpha$ -L- iduronidase
<b>BJORNSTAD</b> pili torti + surdez NS		2q34-q36	?

Genes responsáveis por surdez sindrômica codificam diversas moléculas, incluindo enzimas (78,79), fatores de transcrição (80,81,82), componentes do citoesqueleto (41) e componentes de matriz extracelular (83,84,85,86).

Ocorreram alguns progressos recentes no estudo das síndromes envolvendo tireoidopatias e perda auditiva. O exemplo clássico é o da síndrome de Pendred, síndrome autossômica recessiva onde mutações no gene PDS (que codifica proteína chamada pendrina) levam a anormalidades estruturais na orelha interna (malformação de Mondini e alargamento do aqueduto vestibular) e bócio (pacientes podem ser eutireoideos) (61). Há muito se suspeita que hormônios tireoideos tenham algum envolvimento no desenvolvimento da orelha interna, devido à associação clínica freqüente entre hipotireoidismo e perda auditiva. Um estudo em ratos demonstrou que gene codificante do receptor  $\beta$  do hormônio tireoideo está envolvido com maturação final do órgão de Corti, sendo essencial para desenvolvimento de função auditiva (87).

A síndrome de Alport é causada por mutação no gene que codifica tipos específicos de colágeno (COLA3, COLA4, COLA5), que estão expressos em várias partes da cóclea (86). A síndrome de Usher é devida à mutação no gene de tipo específico de miosina (MYO7A), expressa nas célula ciliadas, especialmente nos estereocílios (41). Convém lembrar que supostamente é o deslizamento de moléculas de miosina sobre eixo de actina do estereocílio o responsável pela tração de ligamentos apicais sobre canais iônicos, permitindo entrada de potássio para o meio intracelular. Mutações na proteína envolvida com canais de cloro e potássio causam síndrome de Jervell e Lange-Nielsen (KVLQT1) que associa surdez a intervalo QT longo no eletrocardiograma (72). Tais proteínas formadoras dos canais iônicos, principalmente os de potássio, estão fortemente expressas na estria vascular, elemento responsável pela secreção ativa, dependente de energia, de potássio para a endolinfa.

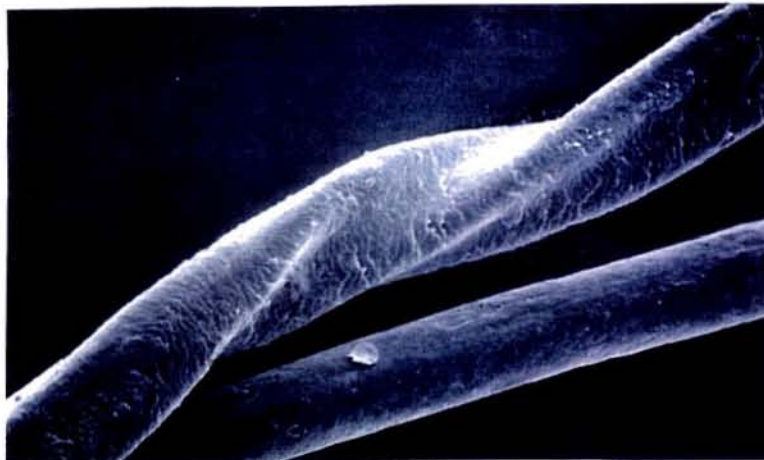
Até o presente, o grupo de síndromes auditivo-tegumentares (alterações de pele e fâneros associada com perda auditiva neurossensorial), é o melhor caracterizado. Cerca de 55 dessas síndromes foram descritas em humanos (88). A perda auditiva e a deficiência pigmentar nessas síndromes têm sido geralmente atribuídos a um defeito no desenvolvimento dos melanócitos. A maioria dos melanócitos derivam de progenitores na crista neural, os quais migram durante desenvolvimento e se fixam em uma variedade de tecidos, incluindo estria vascular do ducto coclear. Em adição aos genes Pax-e MITF, outros dois genes, EDNRB (codificando o receptor B de endotelina) e o EDN3 (codificando ligante à endotelina 3) também foram reconhecidos como responsáveis por outras duas formas de doenças de Waardenburg-Hirschprung (89,90). Esses genes estão envolvidos com migração de melanócitos e com sobrevivência dos mesmos nos diferentes tecidos.

É nesse grupo de síndromes auditivo-tegumentares que se insere a síndrome de Bjornstad. O livro de Gorlin e colaboradores, livro-texto clássico para estudo de perda auditiva hereditária e suas síndromes, traz descrição detalhada de cada uma das síndromes que envolvem surdez (91).

#### **2.2.2.1 – Síndrome de Bjornstad**

Em 1965, dermatologista norueguês Roar Th Bjornstad descreveu síndrome caracterizada por presença de "pili torti" (cabelos curtos e quebradiços) e perda auditiva pré-lingual neurossensorial. A síndrome ficou conhecida pelo seu nome e foi catalogada no "On-Line Mendelian Inheritance in Man" (OMIM) sob número 262000 (92). Na descrição original, Bjornstad apresentou 8 pacientes com "pili torti", dos quais 5 também sofriam de perda auditiva (93).

Schütz, em 1900, provavelmente tenha sido o primeiro a descrever cabelos torcidos ao longo de seu próprio eixo, sem entretanto usar o nome "pili torti" (94). Os termos "pili torti" e "twisted hairs" (cabelos torcidos) foram aplicados no mínimo 33 anos mais cedo do que descrição de Bjornstad (95) para descrever rara anomalia na qual bainha do cabelo é torcida  $180^{\circ}$  ao longo de seu eixo longitudinal, causando quebra nesse local (96) – vide figura 4.



**Figura 4.** Foto de microscopia eletrônica mostrando fio de cabelo normal e outro típico de "pili torti". Observe torção da bainha do cabelo ao redor de seu eixo longitudinal.

"Pili torti" pode ser congênito ou adquirido. A forma adquirida pode ocorrer na forma de alopecia localizada do tipo cicatricial (97), ou por carência nutricional, como nos casos associados com anorexia nervosa (98). A forma congênita pode ser isolada

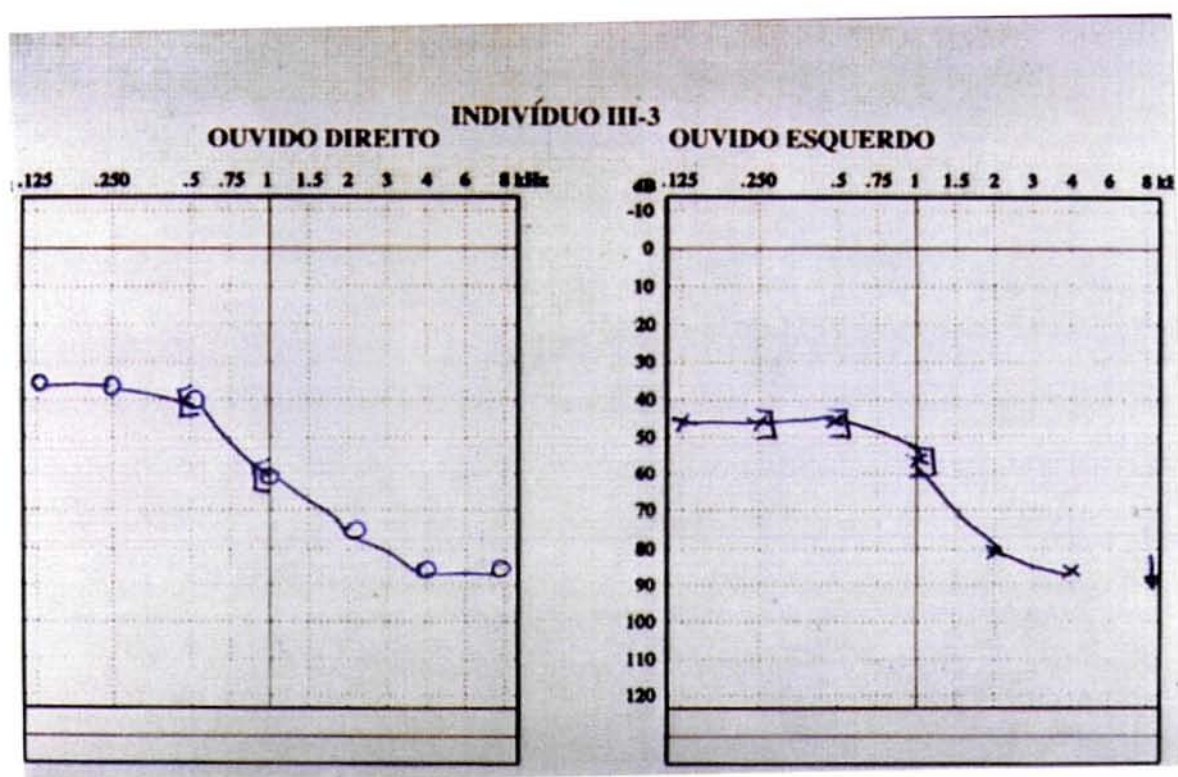


e determinada por gene autossômico dominante ou estar associada com várias síndromes raras, incluindo síndrome de Menkes, displasia ectodérmica, defeitos neurológicos e distúrbios metabólicos (99,100). A síndrome de Menkes é o principal diagnóstico diferencial nos casos de "pili torti" (101). Essa síndrome é secundária a defeito no metabolismo do cobre (déficit de cobre) e tem características distintas da síndrome de Bjornstad: transmissão é ligada ao X, associa-se com retardo de crescimento, provoca aparecimento de cabelos amarelados ou brancos e cursa com convulsões secundárias a degenerações cerebrais e cerebelares focais.

Já foram descritos na literatura 35 casos (20 femininos e 15 masculinos) de síndrome de Bjornstad em 21 famílias diferentes. Sete são noruegueses, 11 mexicanos, 5 alemães, 1 português e 4 franceses. Em 8 das 21 famílias, observam-se mais de uma pessoa com "pili torti" e perda auditiva (93,96,102-115), sendo que a família com maior número de afetados é a mexicana por nós descrita, com 8 membros com síndrome de Bjornstad (103). Embora haja dois relatos de "pili torti" e surdez sendo herdados através de padrão consistente com modo de transmissão autossômico dominante (96,108), padrão visto na maioria das famílias sugere modelo de transmissão autossômico recessivo (93,102,103,109).

Clinicamente, na síndrome de Bjornstad, "pili torti" é reconhecido durante segundo ano de vida (105). Tipicamente, pacientes não requerem cortes de cabelo, já que ocorre quebra capilar prematura quando cabelos ainda estão curtos (96). Em termos auditivos, não existe padrão de perda auditiva comum a todos pacientes. O que é comum a todos é a perda neurosensorial pré-lingual. Em termos de intensidade, existem casos com perdas leves e outros com perdas mais importantes, necessitando protetização. Nos 8 casos que estudamos, a perda não era progressiva e todos utilizavam aparelho de amplificação sonora individual. Em 2 casos, a perda era

profunda, e a comunicação se dava pela linguagem dos sinais. Nos 6 restantes, o exame audiométrico mostrou padrão consistente com perdas leves a moderadas nas freqüências mais graves, e moderadas a severas nas freqüências mais agudas (vide figura 5).



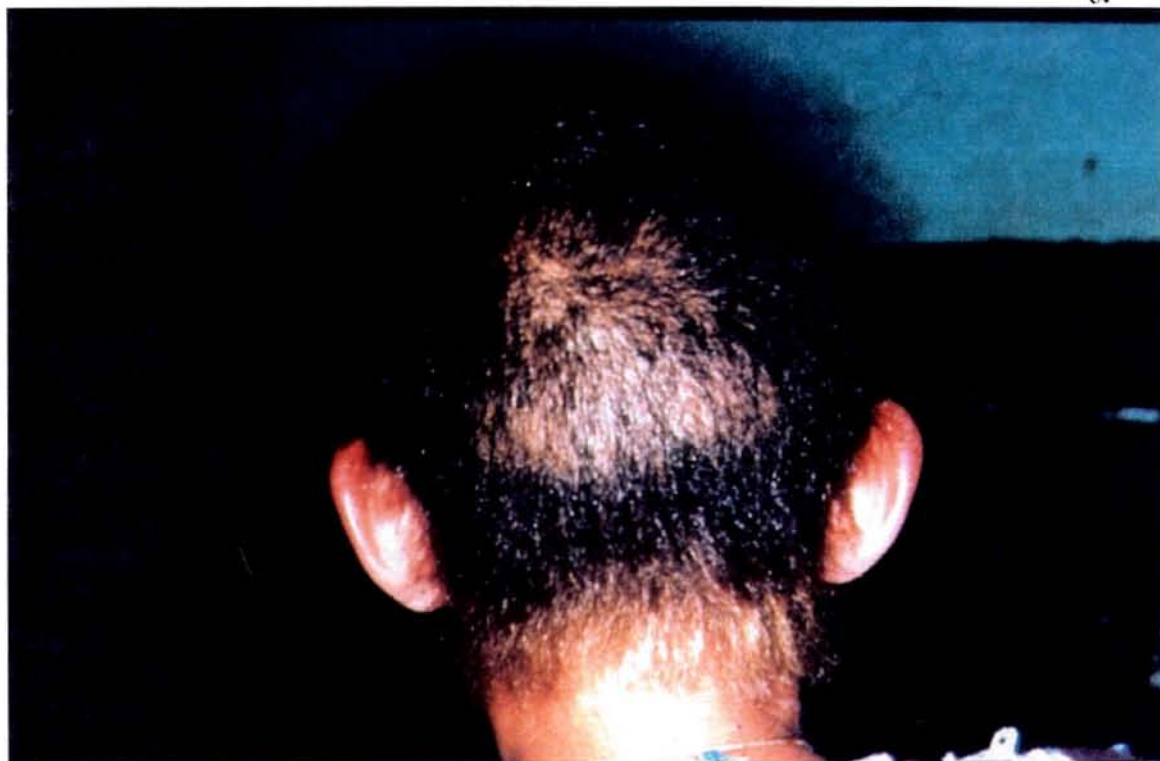
**Figura 5.** Padrão audiométrico mais encontrado nos pacientes da família mexicana com síndrome de Bjornstad. Perda auditiva leve à moderada em freqüências baixas e médias e moderada à profunda em freqüências altas.

Todos os 6 tinham desenvolvimento de fala e linguagem relativamente normais (103). A figura 6 demonstra o fenótipo de dois dos casos estudados, em visão frontal, e a figura 7 demonstra visão posterior de uma menina afetada.



**Figura 6.** Visão frontal de dois adultos afetados pela síndrome de Bjornstad, utilizando aparelhos de amplificação sonora individuais. Note, no indivíduo masculino, que pêlos do rosto são normais.

Alguns casos relatados na literatura demonstram achados associados. Dois irmãos relatados por Porter (107) e paciente descrito por van Buggenhout com síndrome de Bjornstad (112) também tinham retardo mental. Dois de 3 irmãos de outra família apresentaram hipogonadismo associado (104). No relato original de Bjornstad (93), paciente tinha hipoplasia de genitália interna. Por fim, paciente feminina apresentou surdez congênita combinada com "pili torti" e ictiose vulgar (114). Esse caso foi considerado como paciente com síndrome de Bjornstad que incidentalmente apresentou ictiose vulgar, já que ictiose é herdada de maneira autossômica dominante e "pili torti" associado com surdez segue padrão autossômico recessivo (114).



**Figura 7.** Visão da região posterior da cabeça de menina afetada. Note a escassez do cabelo, permitindo a visualização do couro cabeludo.

Embora a literatura seja rica em descrições clínicas de casos isolados e familiares de síndrome de Bjornstad, a base molecular da síndrome permaneceu desconhecida até 1998, quando mapeamos gene para região de aproximadamente 5 centiMorgans no braço longo do cromossomo 2, entre bandas 34 e 36 (103). Pela dificuldade na obtenção de mais pacientes afetados por essa rara síndrome, os progressos no isolamento do gene propriamente dito são lentos. Recentemente, com colaboração de pesquisadores noruegueses, que enviaram amostras sanguíneas de algumas famílias (2 pacientes) originais de Bjornstad, acrescidas de 2 outras de pacientes recentemente diagnosticados (2 pacientes afetados), o intervalo cromossômico foi diminuído para 1 cM. Estima-se que em prazo de 6 meses o gene já esteja seqüenciado (Jonathan Seidman, Harvard University, comunicação pessoal).

### **2.2.3 - Implicações clínicas e éticas dos avanços da genética molecular da surdez**

O diagnóstico de perda auditiva hereditária em uma família evoca grande número de emoções que passam por culpa, raiva, negação e aceitação (116).

Atualmente, como nem todas mutações que podem causar surdez estão identificadas, ainda está difícil rastreamento sistemático em pessoas com história familiar de perda auditiva, a menos nos poucos casos onde gene envolvido na afecção já tenha sido determinado. Ou seja, exclusão de determinada mutação potencialmente relacionada com surdez não diminui muito risco de determinado indivíduo com história familiar desenvolver perda auditiva no futuro, uma vez que outros defeitos podem estar implicados na gênese da perda auditiva da família analisada.

Já existem tentativas no sentido de se poder prever com mais precisão se determinado indivíduo, no contexto de sua família, herdou ou não defeito genético

causador da afecção. Chen et al. estudaram possibilidade de se prover diagnóstico pré-sintomático para indivíduos jovens pertencentes a famílias participantes do estudo onde a localização genômica do defeito causador da afecção (no caso perda auditiva não-sindrômica do tipo autossômica dominante) havia sido previamente determinada. Os resultados foram animadores (117).

Alguns autores advogam a testagem de indivíduos com perda auditiva induzida por aminoglicosídeos para presença da mutação mitocondrial A1555G, uma vez que sua presença permitiria aconselhamento de todos descendentes maternos. Sendo teste facilmente realizável e aconselhamento possível, esta prática poderia ser inclusive custo-efetiva (118).

Diagnóstico pré-natal também passa a ser possível, embora ainda seja motivo de controvérsia (119). Dúvidas sobre real validade desta aplicação tocam terreno ético e moral. Ponto central da discussão é a possibilidade ou não da interrupção da gestação quando de resultado não favorável nos testes de rastreamento genético. Da mesma forma, resultado “não-favorável” pode ser entendido no sentido inverso. É o que ocorre, por exemplo, nos EUA, onde alguns membros da comunidade surda respondem que preferem filhos surdos a ouvintes. A lógica adotada é de que surdez não é doença que requeira tratamento, mas sim mais um dos aspectos de uma cultura diferente. A comunidade surda tem linguagem única (sinais), assim como crenças, costumes e valores próprios. Membros dessa comunidade podem ter objetivos a serem alcançados diferentes dos do aconselhamento genético e não necessariamente vêem a surdez como condição que requeira tratamento.

Com identificação de novos genes responsáveis por perda auditiva a cada mês, testes diagnósticos pré-sintomáticos serão cada vez mais parte do dia-a-dia do clínico, de seus pacientes e das famílias destes. Cabe a cada um se preparar para que

avanços da genética médica sejam utilizados da melhor forma possível e não como instrumentos de discriminação ou abuso, como, por exemplo, na negação de cobertura por planos de saúde, na discriminação na obtenção de emprego, e nas consequências adversas sociais e pessoais que possam advir (120).

### 3 – OBJETIVOS



O artigo apresentado a seguir tem como objetivos:

### **3.1 - Principal**

Mapear a síndrome de Bjornstad

### **3.2 - Secundário**

Determinar forma de herança do gene da síndrome de Bjornstad, se autossômica recessiva ou autossômica dominante.

#### 4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann NY Acad Sci* 1991; 630: 16-31.
2. Davis AC. The prevalence of hearing impairment and reported hearing disability among adults in Great Britain. *Int J Epidemiol* 1989; 18: 911-17.
3. 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. (PHS) 90-1504.
4. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the US school-age population. *Am J Med Genet* 1993; 46: 486-91.
5. Proctor C. Diagnosis, prevention and treatment of hereditary sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1977; 87: S1-S60.
6. Hudspeth AJ. How hearing happens. *Neuron* 1997; 19: 947-50.
7. Parving A, Newton V. Guidelines for description of inherited hearing loss. *J Audiol Med* 1995; 4: 2-5.
8. Gordo A, Câmara CC, Scharlach RC, Chiari BM, Perissinoto J. Possibilidades e limites frente a deficiência auditiva – relato de caso. *Acta AWHO* 1999; 18: 42-7.
9. Ruben RJ. Eradication of communicative disorders: preventive medicine in the 21<sup>st</sup> century. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106 suppl. 168: 55-8.
10. Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1589-97.
11. Lubianca Neto JF, Pereira AC. O que há de novo no campo da genética molecular da surdez: descoberta de genes para surdez. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 1999; 65: 106-13.

12. Oliveira JAA. Fisiologia clínica da audição – cóclea ativa. In: Lopes Filho O, Campos CAH eds. Tratado de Otorrinolaringologia. Editora Roca, São Paulo, 1994: 510-30.
13. Nadol JB Jr. Hearing loss. *New Engl J Med* 1993; 329: 1092-1102.
14. Kurc M. O amplificador coclear. *Arquivos da Fundação Otorrinolaringologia* 1999; 3: 48-56.
15. Hudspeth AJ. How the ear's works work. *Nature* 1989; 341: 397-404.
16. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*, 3<sup>rd</sup> ed. Garland Publishing, New York 1994.
17. Pickles JO, Comis SD, Osborne MP. Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti and their possible relation to sensory transduction. *Hear Res* 1984; 15: 103-12.
18. Morgenstern C, Amano H, Orsulakova A. Ion transport in the endolymphatic space. *Am J Otolaryngol* 1982; 3: 323-27.
19. Willems PJ. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med* 2000; 342: 1101-9.
20. von Békésy G. *Experiments in Hearing*. New Yourk: McGraw-Hill 1960: 485-510.
21. Dallos P. The active cochlea. *J Nerosci* 1992; 12: 4575-85.
22. Dallos P. Outer hair cells: the inside story. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106: 16-22.
23. Russel IJ, Sellick PM. Intracellular studies of hair cells in the mammalian cochlea. *J Physiol* 1978; 284: 261-90.
24. Dallos P, Harris D. Properties of auditory nerve responses in absence of outer hair cells. *J Neurophysiol* 1978; 41: 365-83.
25. Kemp DT. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J Acoust Soc Am* 1978; 64: 1386-91.

26. Zurek PM. Spontaneous narrowband acoustic signal emitted by human ears. *J Acoust Soc Am* 1981; 69: 514-23.
27. Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, et al. Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 1985; 227: 194-6.
28. Slepecky N, Chamberlain SC. Immunoelectron microscopic and immunofluorescent localization of cytoskeletal and muscle-like contractile proteins in inner ear sensory hair cells. *Hear Res* 1985; 20: 245-60.
29. Kashar B, Brownell WE, Altschuler R, et al. Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature* 1986; 1986; 322: 365-7.
30. Kalinec F, Holley MC, Iwasa K, et al. A membrane-based force generation mechanism in auditory sensory cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8671-5.
31. Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 2000; 405: 149-55.
32. Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nature genetics* 1996; 14: 385-91.
33. Van Camp G, Willems PJ, Smith RJH. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 758-64.
34. Lubianca Neto JF, Eavey RD. Surdez hereditária. In Chinski A, Sih T eds. *II Manual de Otorrinolaringologia Pediátrica da IAPO*. Ateliê editorial, São Paulo 1999: 283-90.
35. Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. World Wide Web URL: <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh>, june 2000.
36. Jin H, May M, Tranebjaerg L, et al. A novel X-linked gene, DDP, show mutations in families with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness. *Nat Genet* 1996; 14: 177-80.

37. Probst FJ, Fridell RA, Raphael Y, et al. Correction of deafness in shaker-2 mice by na unconventional myosin in a BAC transgene. *Science* 1998; 280: 1444-7.
38. Wang A, Liang Y, Fridell RA, et al. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science* 1998; 280: 1447-51.
39. Weil D, Kussel P, Blanchard S, et al. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet* 1997; 16: 191-3.
40. Liu XZ, Walsh J, Tamagawa Y, et al. Autosomal dominant non-syndromic deafness (DFNA11) caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nature Genet* 1997; 17: 268-9.
41. Weil D, Blanchard S, Kaplan J, et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* 1995; 374: 60-1.
42. Steel KP, Brown SD. More deafness genes. *Science* 1998; 280: 1403.
43. Self T, Mahony M, Fleming J, Walsh J, Brown D, Steel KP. Shaker-1 mutations reveal roles for myosin VIIA in both development and function of cochlear hair cells. *Development* 1998; 125: 557-66.
44. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387: 80-3.
45. Denoyelle F, Lina-Granade G, Plauchu H, et al. Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature* 1998; 393: 319-20.
46. Morrel RJ, Kim HJ, Hood LJ, et al. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med* 1998; 339: 1500-5.

47. Estivill X, Fortina P, Surrey S, et al. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 1998; 351: 394-8.
48. Scott DA, Kraft ML, Stone EM, Sheffield VC, Smith RJH. Connexin mutations and hearing loss. *Nature* 1998; 391: 32.
49. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 2173-7.
50. Xia JH, Liu CY, Tang BS, et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat Genet* 1998; 20: 370-3.
51. Grifa A, Wagner CA, D'Ambrosio L, et al. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet* 1999; 23: 16-8.
52. Lynch ED, Lee MK, Morrow JE, Welch PL, Léon PE, King MC. Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene diaphanous. *Science* 1997; 278: 1315-8.
53. Léon PE, Raventos H, Lynch E, Morrow J, King M-C. The gene for an inherited form of deafness maps to chromosome 5q31. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5181-4.
54. Rosenfeld MG. POU-domain transcription factors: pou-er-ful developmental regulators. *Genes Dev* 1991; 5: 897-907.
55. de Kok YJ, van der Maarel SM, Bitner-Glindzicz M, et al. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science* 1995; 267: 685-8.
56. 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 DFN3 gene POU3F4. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1229-35.

57. Vahava O, Morell R, Lynch ED, et al. Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science* 1998; 279: 1950-4.
58. Verhoeven K, Van Laer L, Kirschhofer K, et al. Mutations in the human alfa-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nature Genet* 1998; 19: 60-2.
59. Mustapha M, Weil D, Chardenoux S, et al. An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 409-12.
60. Legan PK, Rau A, Keen JN, Richardson GP. The mouse tectorins: modular matrix proteins of the inner ear homologous to components of the sperm-egg adhesion system. *J Biol Chem* 1997; 272: 8791-801.
61. Everett LA, Glaser B, Beck JC, et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nature Genet* 1997; 17: 411-22.
62. Li XC, Everett LA, Lalwani AK, et al. A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nature Genet* 1998; 18: 215-7.
63. Scott DA, Wang R, Kreman Tm, Sheffield VC, Karnishki LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* 1999; 20: 440-3.
64. Robertson NG, Lu L, Heller S, et al. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet* 1998; 20: 299-303.
65. Manolis EN, Yandavi N, Nadol JB Jr, et al. A gene for non-syndromic autosomal dominant progressive postlingual sensorineural hearing loss maps to chromosome 14q12-13. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1047-50.



66. Khetarpal U, Schuknecht HF, Gacek RR, Holmes LB. Autosomal dominant sensorineural hearing loss. Pedigrees, audiologic findings, and temporal bone findings in two kindreds. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; 117: 1032-42.
67. Eavey RD, Manolis E, Lubianca J, Merchant S, Seidman JG, Seidman C. Mutations in COCH (formerly Coch5b2) cause DFNA9. *Adv Otorhinolaryngol* 2000; 56: 101-2.
68. Fransen E, Verstreken M, Verhagen WI, et al. High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with a mutation in the COCH gene. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1425-9.
69. Van Laer L, Huizing EH, Verstreken M, et al. Nonsyndromic hearing impairment is associated with mutation in DFNA5. *Nat Genet* 1998; 20:194-7.
70. Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, et al. CKNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 1999; 96: 437-46.
71. 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: 181-5.
72. Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Atkinson DL, Keating MT. Molecular basis of the long-QT syndrome associated with deafness. *N Engl J Med* 1997; 336: 1562-7.
73. Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, et al. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet* 1999; 21: 363-9.
74. McGuirt WT, Prasad SD, Griffith AJ, et al. Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nat Genet* 1999; 23: 413-9.

75. Estivill X, Govea N, Barcelo A, 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.
76. Reardon W. Genetic deafness. *J Med Genet* 1992; 29:521-6.
77. Lubianca Neto JF. Surdez hereditária. Recentes avanços da genética molecular da surdez. In Caldas N, Caldas Neto S, Sih T eds. *Otologia e audiologia em pediatria*. Cap. 28, Revinter, Rio de Janeiro 1999: 181-8.
78. Wilson PJ, Morris CP, Anson DS, et al. Hunter syndrome: isolation of an iduronate-2-sulfatase cDNA clone and analysis of patient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8531-5.
79. Scott HS, Anson DS, Orsborn AM, et al. Human alpha-L-iduronidase: cDNA isolation and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9695-9.
80. Tassabehji M, Read AP, Newton VE, et al. Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature* 1991; 355: 635-6.
81. Tassabehji M, Newton Ve, Read AP. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nature Genet* 1994; 8: 251-5.
82. Baldwin CT, Hoth CF, Amos JA, da-Silva EO, Milunsky A. An exonic mutation in the HuP2 paired domain gene causes Waardenburg's syndrome. *Nature* 1992; 355: 637-8.
83. Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, et al. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 1990; 248: 1224-6.
84. Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, Hoyhtya M, Shows TB, Tryggvason K. Identification of a distinct type IV collagen  $\alpha$  chain with restricted kidney distribution

- and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 1606-10.
85. Ahmad NN, Ala-Kokko L, Knowlton RG, et al. Stop codon in the procollagen II gene (COL2A1) in a family with the Stickler syndrome (arthro-ophthalmopathy). Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 6624-7.
86. Mochizuki T, Lemminki HH, Mariyama M, et al. Identification of mutations in the  $\alpha 3$  (IV) and  $\alpha 4$ (IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. Nature Genet 1994; 8: 77-81.
87. Forrest D, Erway LC, Ng L, Altschuler R, Curran T. Thyroid hormone receptor  $\beta$  is essential for development of auditory function. Nature Genet 1996; 13: 354-7.
88. Toriello HV. Genetic hearing loss associated with integumentary disorders. In Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM Jr. Oxford monographs on medical genetics n<sup>o</sup> 28. Oxford University Press, New York 1995:368-412.
89. Ederly P, Attie T, Amiel J, et al. Mutatin of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). Nature Genet 1996; 12: 442-4.
90. Hofstra RM, Osinga J, Tan-Sindhunata G, et al A homozygous mutation in the endothelin-3 gene associated with a combined Waardenburg type 2 and Hirschsprung phenotype (Shah-Waardenburg syndrome). Nature Genet 1996: 12: 445-7.
91. Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM Jr (eds) Hereditary hearing loss and its syndromes, 2<sup>nd</sup> ed. Oxford monographs on medical genetics n<sup>o</sup> 28. Oxford University Press, New York 1995.

92. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {262000}: last edited in 14/10/1998: World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
93. Bjornstad R. Pili torti and sensory-neural loss of hearing. Proc Fenno Scand Ass Derm, Copenhagen 1965: 3-12.
94. Schütz J. Ein Fall von Spindelhaaren (Pili moniliformes). Arch Derm Syph 1900; 53: 69-70.
95. Ronchese F. Twisted hairs (pili torti). Arch Derm Syph 1932; 26: 98-109.
96. Petit A, Dontenwille MM, Bardou CB, Civatte J. Pili torti with congenital deafness (Bjornstad's syndrome): report of three cases in one family, suggesting autosomal dominant transmission. Clin Exp Dermatol 1993; 18: 94-5.
97. Shapira SK, Neish AS, Pober BR. Unknown syndrome in sibs: pili torti, growth delay, developmental delay, and mild neurological abnormalities. J Med Genet 1992; 29: 509-10.
98. Lurie R, Danziger Y, Kaplan Y, Sulkes J, Abramson E, Mimouni M. Acquired pili torti – a structural hair shaft defect in anorexia nervosa. Cutis 1996; 57: 151-6.
99. Kurwa AR, Abdel-Aziz AH. Pili torti – congenital and acquired. Acta Derm Venereol (Stockh) 1973; 53: 385-92.
100. Birnbaum PS, Ibaden HP. Heritable disorders of the hair. Dermatol Clin 1987; 5: 137-53.
101. Menkes JH, Alter M, Steigleder GK, Weakly DR, Sung JH. A Sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. Pediatrics 1962; 29: 764-79.
102. Reed WB, Stone VM, Boder ER, Zirprakowski L. Hereditary syndromes with auditory and dermatological manifestations. Arch Dermatol 1967; 95: 456-61.

103. Lubianca Neto JF, Lu L, Eavey RD, et al. The Bjornstad syndrome (sensorineural hearing loss and pili torti) disease gene maps to chromosome 2q34-36. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1107-12.
104. Crandall BF, Samec L, Sparkes RS, Wright SW. A familial syndrome of deafness, alopecia, and hypogonadism. *J Pediat* 1973; 82: 461-5.
105. Robinson GC, Johnston MM. Pili torti and sensory neural hearing loss. *J Pediat* 1967; 70: 621-3.
106. Munro DD. Disorders of hair. In: Fitzpatrick TB, Arndt KA, Clark WH, Eisen AZ, van Scott EJ, Vaughan JH, eds. *Dermatology in general medicine*. New York: McGraw Hill 1971; 321-2.
107. Porter JE. Pili torti met neurologische doofheid. *Ned T Genesk* 1976; 120: 311.
108. Cremers CWRJ, Geerts SJ. Sensorineural hearing loss and pili torti. *Ann Otol Rhinol Laryng* 1979; 88: 100-4.
109. Voigtländer V. Pili torti with deafness (Bjornstad syndrome). Report of a family. *Dermatologica* 1979; 159: 50-4.
110. Scott MJ Jr, Bronson DM, Esterly NB. Bjornstad syndrome and pil torti. *Pediatr Dermatol* 1983; 1: 45-50.
111. Baptista A, Amado F, Resende C. Síndrome de Bjornstad. *Med Cutan Ibero Lat Am* 1989; 17: 28-31.
112. Van Buggenhout G, Trommelen J, Hamel B, Fryns JP. Bjornstad syndrome in a patient with mental retardation. *Genet Counsel* 1998; 9: 201-4.
113. Loche F, Bayle-Lebey P, Carriere JP, Bonafe JL, Bazex J, Schwarze HP. Pili torti with congenital deafness (Bjornstad syndrome): a case report. *Pediatric Dermatol* 1999; 16: 220-1.

114. Braun-Falco O, Landthaler M. Ichthyosis vulgaris, Taubeheit, Pili torti und Zahnanomalien. *Hautarzt* 1978; 29: 276-80.
115. Selvaag. Pili torti and sensorineural hearing loss. A followup of Bjornstad's original patients and a review of the literature. *Eur J Dermatol* 2000; 10: 91-7.
116. Sorkin DL. Inheriting hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 119: 1178-80.
117. Chen AH, Mueller RF, Prasad SD, et al. Presymptomatic diagnosis of nonsyndromic hearing loss by genotyping. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124: 20-4.
118. Ghodsian NF. Mitochondrial mutations and hearing loss: paradigm for mitochondrial genetics. *Am J Hum Genet* 198; 62: 15-19.
119. Goldstein DA. Ethical dilemmas in molecular genetics. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 119: 1183-6.
120. Weinberg JM. Breaking bonds: discrimination in the genetic revolution. *JAMA* 1992; 268: 1767.

**5 – ARTIGO ORIGINAL REDIGIDO EM INGLÊS**

## The Bjornstad Syndrome (Sensorineural Hearing Loss and Pili Torti) Disease Gene Maps to Chromosome 2q34-36

José Faibes Lubianca Neto,<sup>1,2,3</sup> Leonard Lu,<sup>1</sup> Roland D. Eavey,<sup>1</sup> Marco Antonio Macias Flores,<sup>4</sup> Raul Martinez Caldera,<sup>4</sup> Somkiat Sangwatanaroj,<sup>2</sup> Jean Jacques Schott,<sup>2</sup> Barbara McDonough,<sup>2</sup> Jose Ignatio Santos,<sup>5</sup> Christine E. Seidman,<sup>2</sup> and J. G. Seidman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Otolaryngology, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, and Department of Otolaryngology, Harvard Medical School, and <sup>2</sup>Department of Genetics, Harvard Medical School, and Howard Hughes Medical Institute, Boston; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Fundacao Faculdade Federal de Ciencias Medicas de Porto Alegre, and Otorhinolaryngologic Service of Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; <sup>4</sup>Escuela de Medicina, Universidad Autonoma de Zacatecas, Zacatecas, Mexico; and <sup>5</sup>Department of Experimental Medicine, National Autonomous University of Mexico, and National Child Health Ministry, Mexico City

### Summary

We report that the Bjornstad syndrome gene maps to chromosome 2q34-36. The clinical association of sensorineural hearing loss with pili torti (broken, twisted hairs) was described >30 years ago by Bjornstad; subsequently, several small families have been studied. We evaluated a large kindred with Bjornstad syndrome in which eight members inherited pili torti and prelingual sensorineural hearing loss as autosomal recessive traits. A genomewide search using polymorphic loci demonstrated linkage between the disease gene segregating in this kindred and *D2S434* (maximum two-point LOD score = 4.98 at  $\theta = 0$ ). Haplotype analysis of recombination events located the disease gene in a 3-cM region between loci *D2S1371* and *D2S163*. We speculate that intermediate filament and intermediate filament-associated proteins are good candidate genes for causing Bjornstad syndrome.

### Introduction

The incidence of severe prelingual hearing impairment is ~1/1,000 births (Morton 1991). In developed countries, ~60% of these cases are thought to have a genetic origin (Marazita et al. 1993), with ~30% occurring as part of a syndrome (Reardon 1992). The genetics of hearing loss is complex. Mutations at >40 loci can cause nonsyndromic deafness (autosomal and sex linked). In addition, there are >300 syndromes associated with

hearing loss, and the disease genes responsible for a few of them have been identified (Gorlin, Toriello, and Cohen 1995; Van Camp and Smith 1998). Mutations in myosin 7A, Pendrin, PAX3, and COL 4A have been shown to cause Usher 1B, Pendred, Waardenburg, and Alport syndromes, respectively (Petit 1996). However, the mutated genes responsible for many syndromes associated with deafness have yet to be identified.

In 1965, Bjornstad described a new syndrome characterized by the presence of pili torti (brittle, broken hair) and congenital sensorineural hearing loss (designated "Bjornstad syndrome"; OMIM 262000). In the initial description of several families, five patients demonstrated both pili torti and sensorineural hearing loss (Bjornstad 1965). The terms "pili torti" and "twisted hair" had already been applied 33 years earlier (Ronchese 1932) to describe a rare hair abnormality in which the hair shafts are flattened at irregular intervals and twisted through 180° about the axes, causing them to break spontaneously (Petit et al. 1993). Pili torti may be congenital or acquired (the latter form secondary to patchy alopecia from a variety of causes). The congenital form may be isolated and determined by an autosomal dominant gene or associated with various rare syndromes, including Menkes syndrome, ectodermal dysplasia, neurological defects, and metabolic disturbances (Kurwa and Abdel-Aziz 1973; Birnbaum and Baden 1987). Pili torti, which may involve all or part of the scalp, is usually recognized during the 2d year of life (Robinson and Johnston 1967). Typically, hair trimming is not required, because it fractures at a short length (Petit et al. 1993).

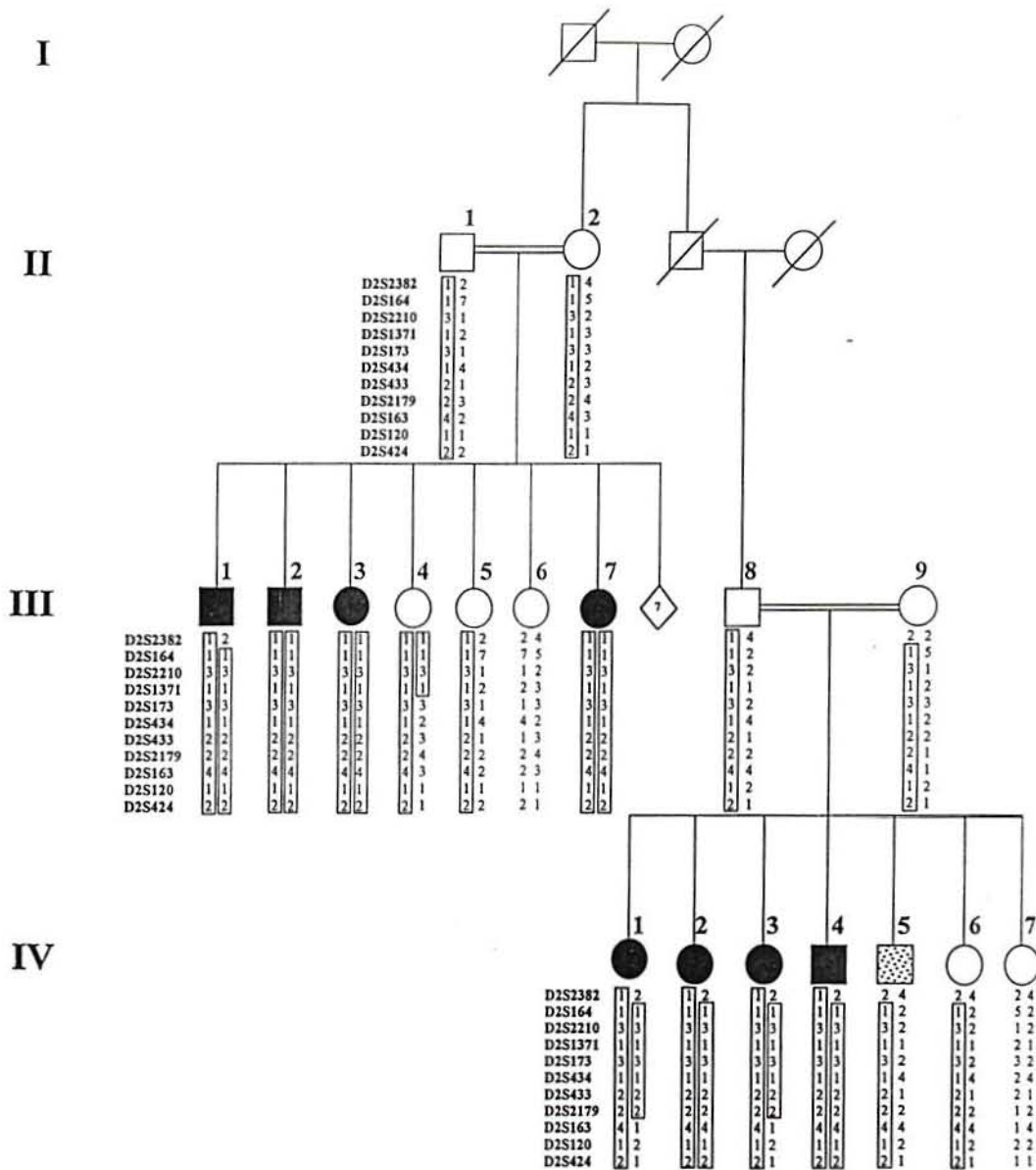
Twenty-one cases of Bjornstad syndrome have been described (Bjornstad 1965; Reed et al. 1967; Robinson and Johnston 1967; Munro 1971; Cremers and Geerts 1979; Voigtlander 1979; Scott et al. 1983; Petit et al. 1993). Ten of these cases were familial (Reed et al. 1967; Cremers and Geerts 1979; Voigtlander 1979; Petit et al. 1993), with the largest families composed of three af-

Received December 19, 1997; accepted for publication March 6, 1998; electronically published April 10, 1998.

Address for correspondence and reprints: Jonathan G. Seidman, Department of Genetics, Harvard Medical School, 200 Longwood Avenue, Boston, MA 02115. E-mail: Seidman@rascal.med.harvard.edu

© 1998 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.  
0002-9297/98/6205-0016\$02.00





**Figure 1** Pedigree of the kindred with Bjornstad syndrome. Open symbols = unaffected; solid symbols = affected; stippled = unknown clinical status; squares = men; circles = women; diamond = siblings of generation III not studied; double lines indicate consanguinity (in both cases, the marriages occurred between second cousins); symbols representing deceased individuals are slashed.

ected members (Reed et al. 1967; Petit et al. 1993). Although there are two reports of pili torti and deafness being inherited in a pattern consistent with an autosomal dominant mode of transmission (Cremers and Geerts 1979; Petit et al. 1993), the pattern seen in most families suggests an autosomal recessive mode of inheritance (Bjornstad 1965; Reed et al. 1967; Voigtlander 1979).

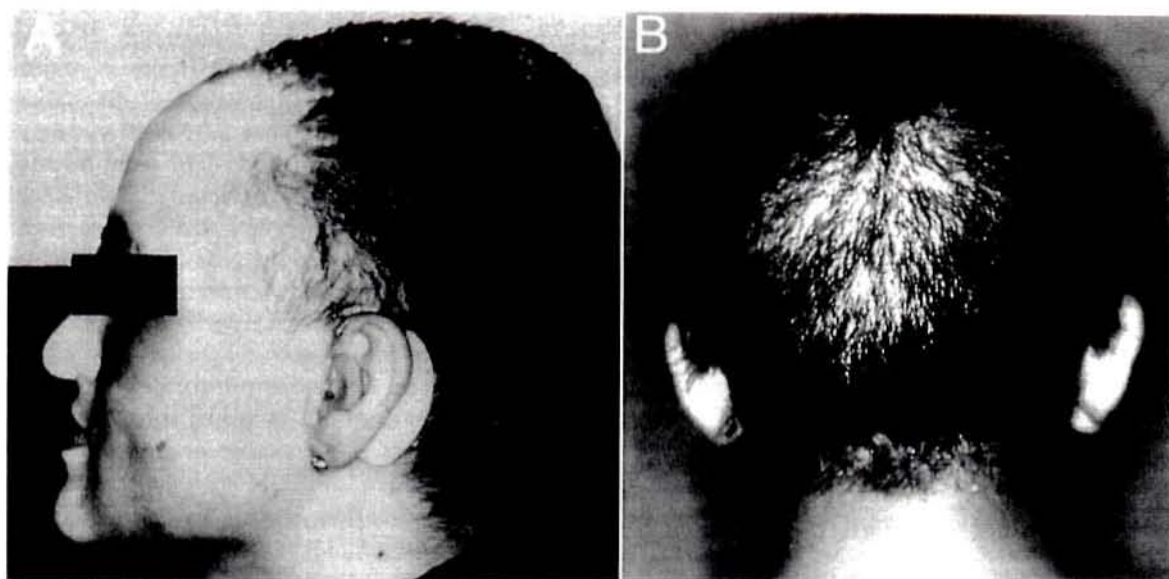
Despite detailed clinical descriptions of this disorder, the molecular cause of Bjornstad syndrome remains unknown. To elucidate the underlying defect and inheritance of this syndrome, we performed a genetic linkage

study in a large family with eight affected members. Our analysis demonstrated that the locus responsible for Bjornstad syndrome maps to chromosome 2q34-36.

**Subjects and Methods**

*Patients*

This study was reviewed by and conducted in accordance with the policy of the Institutional Review Board of the Massachusetts Eye and Ear Infirmary. All family



**Figure 2** Photograph of an affected member. A, Characteristic short, frizzled hairs and the use of a hearing aid. B, Posterior view of the patient, showing sparse and short hair.

members of legal age signed informed consent forms to participate in this study. Eighteen family members from three generations of a Mexican family (mixed Spanish and native Indian heritage) were evaluated (by J.F.L.N. and M.A.M.F.) with a questionnaire (to assess other known causes and risk factors for hearing loss), a limited physical examination including auscultation and fundoscopy, and a comprehensive otolaryngologic evaluation (exam, audiogram, and vestibular testing). Pure-tone audiometry was performed (by R.M.C.) with air conduction at 250, 500, 1,000, 2,000, 4,000, 6,000, and 8,000 Hz and with bone conduction at 500, 1,000, 2,000, and 4,000 Hz. Hair and blood samples were obtained for microscopy and genetic analyses, respectively, and were transported into the United States with knowledge of the Mexican Health Ministry. Family members with prelingual hearing loss and pili torti were diagnosed with Bjornstad syndrome.

#### Genetic Analyses

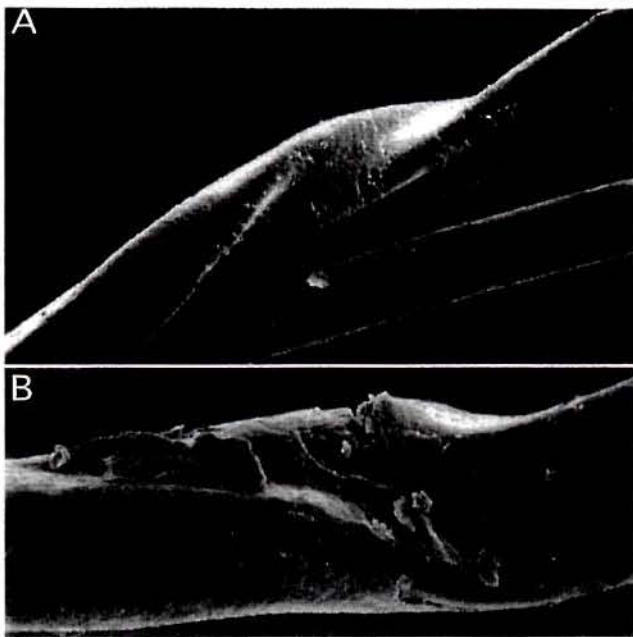
Karyotype analyses were performed on samples from two affected individuals (III-1 and IV-1, fig. 1) as described by Hook (1977). Genomic DNA was extracted from whole blood samples by standard techniques (Tanigawa et al. 1990), and diluted to 50 ng/liter for amplification by PCR with fluorescein-labeled primers from the Cooperative Human Linkage Center Human Screening Set/Weber Version 8 (Research Genetics). The volumes of final reactions were 5  $\mu$ l and contained 10 ng of template genomic DNA, 0.25 U of *Taq* polymerase, 2 pmol of forward and reverse primers, 0.2 mM deox-

ynucleotides, and 2.5 mM  $MgCl_2$ ; 1  $\times$  Cetus PCR buffer was used. Samples were denatured at 95°C for 10 min, followed by PCR reactions (10 cycles: 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 1 min; 20 cycles: 89°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 1 min). The pooled products were supplemented with Tamra red-labeled internal-size standards and were electrophoresed on an Applied Biosystems model 377 Sequencer and analyzed by Genescan version 2.1 peak calling software and by the Applied Biosystems Genotyper version 2.0 program.

Additional polymorphic markers from Research Genetics were tested to confirm the linkage, narrow the disease interval, and construct a haplotype. The PCRs were performed with 3  $\mu$ l (150 ng) of DNA in a 7- $\mu$ l reaction mixture containing 1  $\mu$ l 10  $\times$  Cetus buffer (100 nM Tris-HCL, pH 8.3, 500 mM KCl, and 25 nM  $MgCl_2$ ), 1  $\mu$ l of nucleotide mix (1.25 mM each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP); 2 pmol of forward ( $\gamma^{32}P$ -labeled) and 2 pmol of reverse primers; and 1 U (0.2 l) *Taq* polymerase. Thirty-two cycles of amplification were completed at 94°C for 20 s, 55–58°C for 30 s, and 72°C for 30–45 s. Reaction products were separated on 6% denaturing polyacrylamide gels (7.7 M urea) and analyzed by autoradiography.

#### Linkage Analyses

Two-point LOD scores were performed between the disease gene and each marker, using the MLINK (version 5.1) program, assuming allele frequencies derived from 25 unrelated individuals. The Bjornstad syndrome gene mutation (both pili torti and sensorineural hearing loss)



**Figure 3** Scanning electron micrograph of hairs. A, Hair twisted 180° on its own axis (X200). B, Broken hair at a twist (X500).

was assumed to be a fully penetrant under a recessive model. The Bjornstad syndrome gene frequency was estimated at .001 for LOD score calculations. Equal recombination frequencies between males and females were assumed.

#### Scanning Electron Microscopy

Hair samples were mounted on conductive carbon tape, sputter coated with gold/paladium, and viewed with an Amray 1000A scanning electron microscope.

## Results

#### Clinical Evaluations

Eight individuals in one large kindred (designated "family BS-1") were diagnosed as affected with Bjornstad syndrome on the basis of hair and hearing analysis. All affected individuals had nonprogressive prelingual hearing loss and used hearing aids. Two used sign language for communication (IV-1 and IV-4) and had audiometric profiles of profound sensorineural deafness. The audiological examination in the remaining six demonstrated a pattern consistent with mild to moderate hearing impairment in lower to middle frequencies and moderate to severe impairment in higher frequencies. These six individuals had relatively normal language and speech.

All eight affected individuals had hair abnormalities involving the entire scalp that were usually recognized

by the parents during the 2d year of life. Hair was sparse, coarse, dry, lusterless, and fragile (fig. 2). Affected individuals had never required haircuts. A scanning electron micrograph of a scalp hair sample from one affected individual is shown in figure 3. Eyebrows and eyelashes and axillary, pubic, and body hair were normal.

The hormonal status of affected individuals appeared normal. All affected women denied menstrual abnormalities; two girls (ages <14 years) had secondary sexual characteristics that were normal for age. One affected male (individual III-1) is married and has two unaffected children (data not shown).

There was no history of pili torti and congenital sensorineural hearing loss in other surviving or deceased family members. Remarkable findings in other family members included one child with isolated and profound sensorineural hearing loss (individual IV-5, fig. 1) necessitating sign language; one adult (individual II-1) had vitiligo of both hands. Histories and physical examinations were otherwise unremarkable in both affected and unaffected family members. Neither tinnitus nor dizziness was reported by any family member. There were no nail or teeth malformations and no individual had a white forelock. No nystagmus, pinna malformations, or seventh cranial nerve dysfunction was observed.

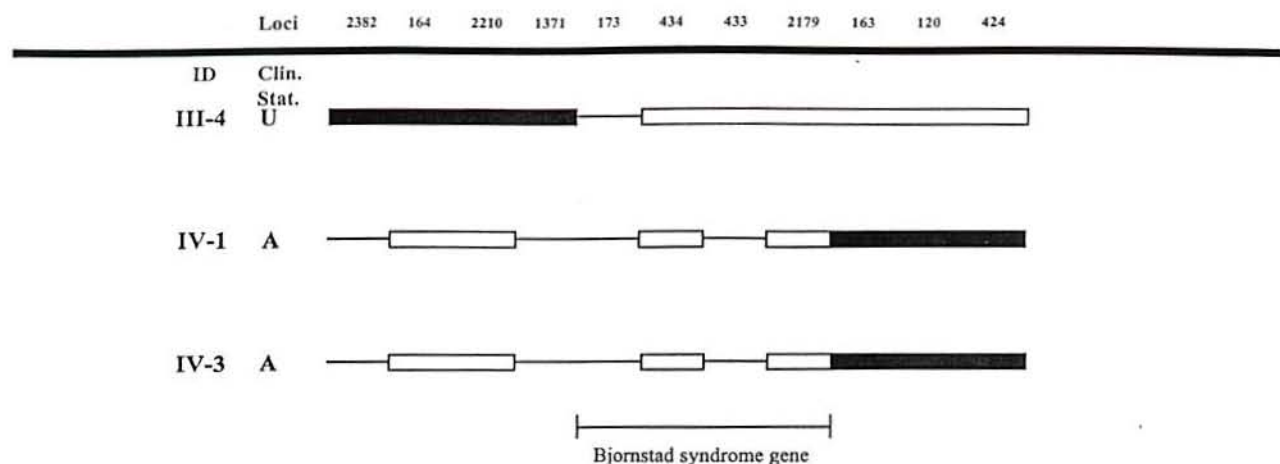
#### Genetic Studies

Pedigree analyses were consistent with autosomal recessive transmission of Bjornstad syndrome in family BS-1 (fig. 1). Karyotype analyses were performed on samples from individuals III-1 and IV-1 and revealed no abnormalities. Genetic studies were performed with DNA samples from 18 individuals. Because Bjornstad syndrome

**Table 1**

Linkage between the Disease Gene and Chromosome 2 Loci

LOCUS	LOD SCORE AT $\theta =$					
	0	.01	.05	.10	.20	.30
D2S2382	—∞	-.79	.33	.58	.43	.04
D2S164	—∞	2.88	3.23	3.07	2.38	1.49
D2S2210	—∞	2.85	3.18	2.99	2.26	1.32
D2S1371	—∞	1.71	2.13	2.07	1.61	.96
D2S173	2.49	2.44	2.25	2.01	1.50	.95
D2S434	4.98	4.88	4.49	3.99	2.92	1.77
D2S433	4.04	3.97	3.65	3.25	2.39	1.48
D2S2179	—∞	1.44	1.88	1.84	1.41	.84
D2S163	—∞	-.38	.78	1.07	1.01	.66
D2S120	—∞	-1.44	-.20	.20	.40	.33
D2S424	—∞	-.38	.78	1.07	1.01	.67
D2S2372	—∞	1.92	2.34	2.27	1.80	1.16
D2S313	—∞	-1.3	.48	.97	1.02	.64
D2S360	—∞	-.46	.72	1.04	1.05	.76
D2S351	—∞	-1.12	.67	1.18	1.24	.87
D2S1363	—∞	-1.29	.48	.96	.99	.59



**Figure 4** Schematic representation of the genotypes of three individuals who were discordant with clinical status in the 5-cM interval between *D2S2382* and *D2S424*. Pedigree identification numbers (ID) and clinical status (clin. stat.: U = unaffected; A = affected) are shown. Black filled bars represent nonconcordance between a DNA locus and disease status; white bars represent concordance; lines represent uninformative genotype. The 3-cM interval containing the Bjornstad syndrome gene is shown. The locations of loci *D2S2382*, *D2S164*, *D2S2210*, *D2S1371*, *D2S173*, *D2S434*, *D2S2179*, *D2S163*, *D2S120*, and *D2S424* are taken from the chromosome 2 gene map. The distances between these loci are not drawn to scale.

involves both sensorineural hearing loss and pili torti, individual IV-5, who had hearing loss but normal hair, was considered as having an unknown clinical status for the purposes of LOD score calculations.

A genomewide search was performed using polymorphic loci. Evidence of linkage was initially detected between the Bjornstad syndrome gene and *D2S434* (LOD score = 4.98;  $\theta = 0$ ). Linkage between the disease gene and other chromosome 2q loci was then analyzed. Two-point LOD scores obtained with 16 polymorphic loci are shown in table 1. On the basis of linkage analyses with the chromosome 2 anchor locus, *D2S434*, the Bjornstad disease gene was localized to chromosome 2q34-36.

To refine further the location of the disease locus, haplotypes of three individuals who exhibited recombination across this region were studied (fig. 4). The genotypes of individuals III-4, IV-1, and IV-3 defined recombination events and indicated that the disease locus resided in the 3-cM interval between *D2S1371* and *D2S163*.

## Discussion

We report that the recessive gene mutation responsible for Bjornstad syndrome in one large kindred maps to chromosome 2q34-36. All affected individuals with both pili torti and sensorineural hearing loss were homozygous for alleles between *D2S1371* and *D2S163*. This interval excludes the nearby *PAX3* gene, which is mutated in disorders (Waardenburg syndrome and crani-

ofacial-deafness-hand syndrome) that share some clinical features with Bjornstad syndrome (Tassabehji et al. 1992; Asher et al. 1996).

Clinical analyses of seven heterozygous disease gene carriers exhibited neither hearing nor hair abnormalities, but one individual carried the disease haplotype and had profound prelingual hearing loss. However, his hair texture, strength, and morphology were normal. Although his hearing loss might be accounted for by the disease allele, we suspect that another etiology caused his deafness. Evaluations of other Bjornstad syndrome families should help to determine whether Bjornstad syndrome gene mutations cause other hearing defects.

Hair consists of 50–100 proteins (Rogers and Powell 1993), of which keratins and intermediate filament-associated proteins (IFAP) predominate (Emonet et al. 1997). Transgenic mice overexpressing IFAP gene products have brittle, easily fractured hair (Rogers and Powell 1993), a finding that further supports the model that abnormalities in these proteins can alter hair structure. Defects in keratins, IFAP, or the enzymes involved in posttranslational modification of these molecules might be expected to cause the ultrastructural defects of hair in Bjornstad syndrome.

Sensorineural deafness and pili torti in Bjornstad syndrome could be independent phenotypes that result from the coinheritance of closely linked gene defects. Although our studies do not exclude the possibility of a contiguous gene syndrome, the recognized immunoreactivity of cytokeratins and other IFAPs in the cochlea (Anniko et al. 1990; Bauwens et al. 1991) makes it ap-

peeling to consider a single-gene defect that accounts for both phenotypes. Genes encoding the major structural components of hair (cytokeratins and IFAPs) therefore appear to be particularly good candidates for mutations that account for the distinct manifestations of this disorder.

At present, only villin encoded on chromosome 2q35 (Rousseau-Merck et al. 1988), colocalizes to the disease gene interval defined in this study (Schuler et al. 1996). Although this actin-binding protein is widely expressed in microvilli (Hofer and Drenckhahn 1996), villin has not been found in the specialized microvilli, known as "stereocilia," of the inner ear (Flock et al. 1982; Alberts et al. 1994). We therefore anticipate that ongoing analyses of the *D2S1371* and *D2S163* interval will lead to the identification of a gene that has a critical role in the structure of scalp hair and inner-ear cells.

## Acknowledgments

J.F.L.N. was sponsored by a scholarship from Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior, Brazil. This work was supported in part by grants from the Howard Hughes Medical Institute to C.E.S. and J.G.S.

## References

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) *Molecular biology of the cell*, 3d ed. Garland, New York
- Anniko M, Arnold W, Thornell LE, Virtanen I, Ramaekers FC, Pfaltz CR (1990) Regional variations in the expression of cytokeratin proteins in the adult human cochlea. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 247:182-188
- Asher JH Jr, Sommer A, Morell R, Friedman TB (1996) Missense mutation in the paired domain of PAX3 causes craniofacial-deafness-hand syndrome. *Hum Mutat* 7:30-35
- Bauwens LJ, Veldman JE, Bouman H, Ramaekers FC, Huizing EH (1991) Expression of intermediate filament proteins in the adult human cochlea. *Ann Otol Rhino Laryngol* 100: 211-218
- Birnbaum PS, Baden HP (1987) Heritable disorders of the hair. *Dermatol Clin* 5:137-153
- Bjornstad RT (1965) Pili torti and sensory-neural loss of hearing. Paper presented at the 17th Combined Scandinavian Dermatological Association Meeting, Copenhagen, Denmark, May 27-29
- Cremers CW, Geerts SJ (1979) Sensorineural hearing loss and pili torti. *Ann Otol* 88:100-104
- Emonet N, Michaille JJ, Dhouailly D (1997) Isolation and characterization of genomic clones of human sequences presumably coding for hair cysteine-rich proteins. *J Dermatol Sci* 14:1-11
- Flock A, Bretscher A, Weber K (1982) Immunohistochemical localization of several cytoskeletal proteins in inner ear sensory and supporting cells. *Hear Res* 7:75-89
- Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM (eds) (1995) *Hereditary hearing loss and its syndromes*, 2d ed. Oxford University Press, Oxford
- Hofer D, Drenckhahn D (1996) Cytoskeletal differences between stereocilia of the human sperm passageway and microvilli/stereocilia in other locations. *Anat Rec* 245:57-64
- Hook EB (1977) Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95%, and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet* 29:94-97
- Kurwa AR, Abdel-Aziz AH (1973) Pili torti—congenital and acquired. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 53:385-392
- Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE (1993) Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the US school-age population. *Am J Med Genet* 46:486-491
- Morton NE (1991) Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann NY Acad Sci* 630:16-31
- Munro DD (1971) Disorders of the hair. In: Fitzpatrick TB, Arndt KA, Clark WH, Eisen AZ, VanScott EJ, Vaughan JH (eds) *Dermatology in general medicine*. McGraw-Hill, New York, pp 395-418
- Petit A, Dontenwille MM, Bardon CB, Civatte J (1993) Pili torti with congenital deafness (Bjornstad's syndrome): report of three cases in one family, suggesting autosomal dominant transmission. *Clin Exp Dermatol* 18:94-95
- Petit C (1996) Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nat Genet* 14:385-391
- Rearson W (1992) Genetic deafness. *J Med Genet* 29:521-526
- Reed WB, Stone VM, Boder E, Ziprkowski L (1967) Hereditary syndromes with auditory and dermatological manifestations. *Arch Dermatol* 95:456-461
- Robinson GC, Johnston MM (1967) Pili torti and sensory neural hearing loss. *J Pediatr* 70:621-623
- Rogers GE, Powell BC (1993) Organization and expression of hair follicle genes. *J Invest Dermatol* 101 Suppl:50S-55S
- Ronchese F (1932) Twisted hairs (pili torti). *Archives of Dermatology and Syphilology* 26:98-109
- Rousseau-Merck MF, Simon-Chazottes D, Arpin M, Pringault E, Louvard D, Guenet JL, Berger R (1988) Localization of the villin gene on human chromosome 2q35-q36 and on mouse chromosome 1. *Hum Genet* 78:130-133
- Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, White RE, et al (1996) A gene map of the human genome. *Science* 274:540-546
- Scott MJ, Bronson DM, Esterly NB (1983) Bjornstad syndrome and pili torti. *Pediatr Dermatol* 1:45-50
- Tanigawa G, Jarcho JA, Kass S, Solomon SD, Vosberg HP, Seidman JG, Seidman CE (1990) A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: an  $\alpha/\beta$  cardiac myosin heavy chain hybrid gene. *Cell* 62:991-998
- Tassabehji M, Read AP, Newton VE, Harris R, Balling R, Guss P, Strachan T (1992) Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the PAX3 paired box gene. *Nature* 355:635-636
- Van Camp G, Smith RJH (1998) Hereditary hearing loss homepage. <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh>
- Voigtlander V (1979) Pili torti with deafness (Bjornstad syndrome): report of a family. *Dermatologica* 159:50-54

**6 – VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO ORIGINAL**

**GENE PARA SÍNDROME DE BJORNSTAD (PERDA AUDITIVA NEUROSENSORIAL E *PILI TORTI*) LOCALIZA-SE NO CROMOSSOMO 2q34-36**

José Faibes Lubianca Neto, <sup>1, 2, 3</sup> Leonard Lu, <sup>1</sup> Roland D. Eavey, <sup>1</sup> Marco Antônio Macias Flores, <sup>4</sup> Raul Martinez Caldera, <sup>4</sup> Somkiat Sangwatanaroj, <sup>2</sup> Jean Jacques Schott, <sup>2</sup> Barbara McDonough, <sup>2</sup> Jose Ignatio Santos, <sup>5</sup> Cristine E. Seidman, <sup>2</sup> Jonathan G. Seidman <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Otolaryngology, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, e Department of Otolaryngology and Laryngology, Harvard Medical School, e <sup>2</sup> Department of Genetics, Harvard Medical School, and Howard Hughes Medical Institute, Boston; <sup>3</sup> Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, e Serviço de Otorrinolaringologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil; <sup>4</sup> Escuela de Medicina, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, Mexico; e <sup>5</sup> Department of Experimental Medicine, National Autonomous University of Mexico, e National Child Health Ministry, Mexico City.

## RESUMO

Relata-se que gene da síndrome de Bjornstad localiza-se no cromossomo 2q34-36. Associação clínica de perda auditiva neurossensorial com *pili torti* (cabelos quebradiços e torcidos) foi descrita há mais de 30 anos por Bjornstad; subseqüentemente, várias pequenas famílias foram estudadas. Nós avaliamos uma grande família com síndrome de Bjornstad na qual 8 membros herdaram *pili torti* e perda auditiva neurossensorial pré-lingual como traço autossômico recessivo. Pesquisa ao longo do genoma usando *loci* polimórficos demonstrou ligação entre gene da doença segregando nessa família e *D2S434* (escore *LOD* máximo: 4,98 em  $\theta = 0$ ). Análise haplotípica de eventos recombinantes localizou gene da doença em região de 3 *cM* entre *loci* *D2S1371* e *D2S163*. Especulamos que filamentos intermediários e proteínas associadas a filamentos intermediários são bons genes candidatos para causar síndrome de Bjornstad.



## INTRODUÇÃO

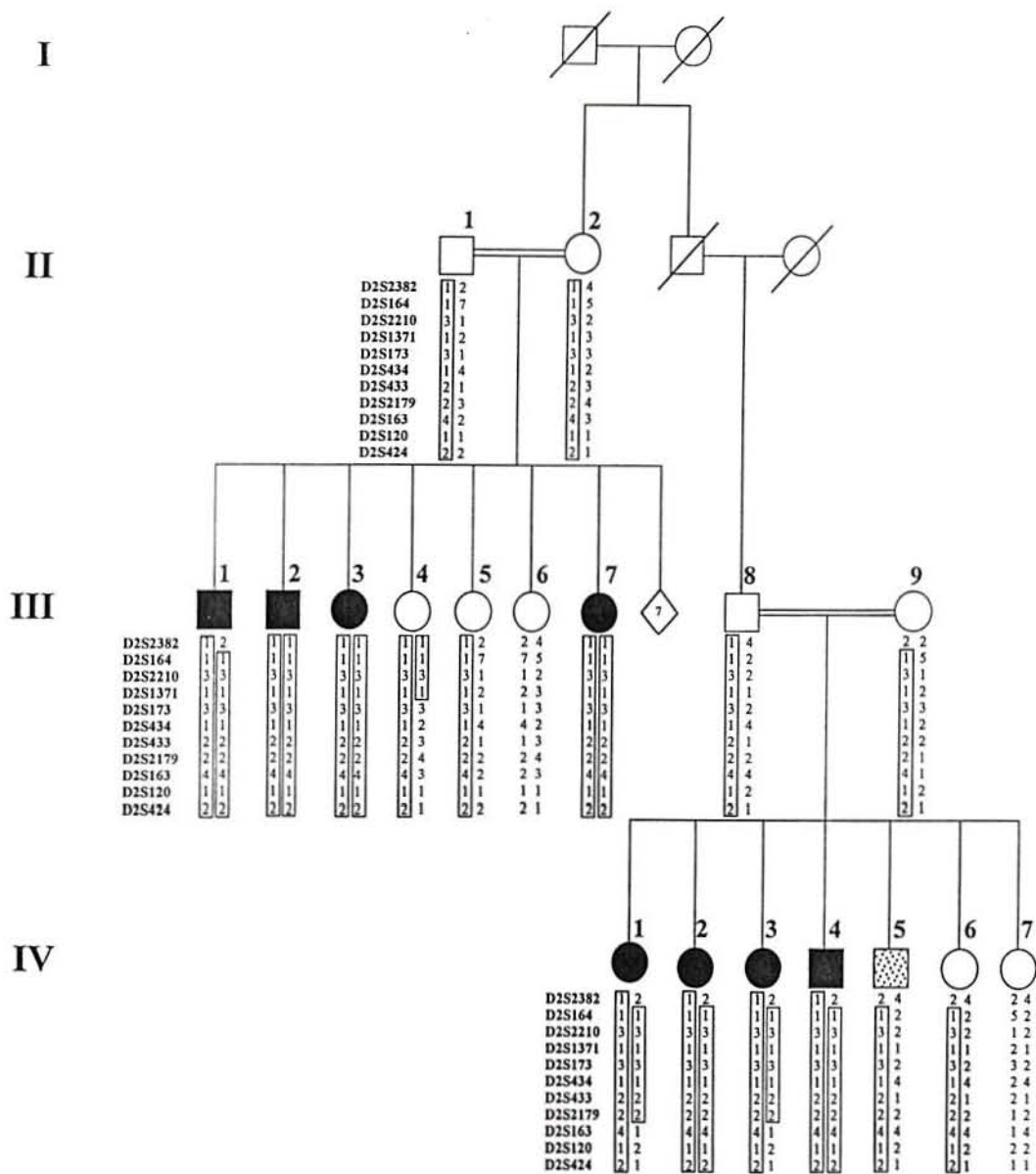
A incidência de perda auditiva pré-lingual severa é de aproximadamente 1/1000 nascimentos (Morton 1991). Em países desenvolvidos, por volta de 60% desses casos têm origem genética (Marazita et al. 1993), sendo que 30% ocorrem como parte de uma síndrome (Reardon 1992). A genética da perda auditiva é complexa. Mutações em mais de 40 *loci* podem causar surdez não-sindrômica (autossômica e ligada ao X). Em adição, há mais de 300 síndromes associadas com surdez e poucas dessas síndromes já tiveram genes responsáveis identificados (Gorlin, Toriello e Cohen 1995; Van Camp e Smith 1998). Mutações na miosina 7 A, PDS, PAX3 e COL 4 A foram demonstradas como causadoras das síndromes de Usher 1B, Pendred, Waardenburg e Alport, respectivamente (Petit 1996). Entretanto, genes mutados responsáveis por muitas outras síndromes associadas com surdez ainda não foram identificados.

Em 1965, Bjornstad descreveu nova síndrome caracterizada pela presença de *pili torti* (cabelo curto, quebradiço) e perda auditiva congênita neurosensorial (designada "síndrome de Bjornstad"; OMIM 262000). Na descrição inicial de várias famílias, cinco pacientes demonstraram *pili torti* e perda auditiva neurosensorial (Bjornstad 1965). Os termos *pili torti* e "cabelo torcido" já tinham sido aplicados 33 anos mais cedo (Ronchese 1932) para descrever uma rara anormalidade de cabelo na qual os fios de cabelo estão achatados a intervalos irregulares e torcidos aproximadamente 180 graus ao longo de seus eixos, causando sua quebra espontânea (Petit et al. 1993). *Pili torti* pode ser congênito ou adquirido (o último secundário à alopecia de várias causas). A forma congênita pode ser isolada e determinada por gene autossômico dominante ou associada com várias síndromes raras, incluindo síndrome de Menkes, displasias ectodérmicas, defeitos neurológicos e distúrbios metabólicos (Kurwa e Abdel-Aziz 1973; Birbaum e Baden 1987). *Pili torti* pode envolver todo escalpo ou apenas

parte dele, sendo geralmente reconhecido no 2º ano de vida (Robinson e Johnston 1967). Tipicamente, o corte de cabelo não é necessário, pois o cabelo quebra-se quando atinge um pequeno comprimento (Petit et al. 1993).

Vinte e um casos de síndrome de Bjornstad foram descritos até hoje (Bjornstad 1965; Reed et al 1967; Robinson e Johnston 1967; Munro 1971; Cremers e Geerts 1979; Voigtlander 1979; Scott 1983; Petit et al. 1993). Dez deles são casos familiares (Reed et al. 1967; Cremers e Geerts 1979; Voigtlander 1979; Petit et al. 1993), com as maiores famílias compostas de três membros afetados cada (Reed et al. 1967; Petit et al. 1993). Embora haja dois relatos de *pili torti* e surdez sendo herdados de uma forma consistente com modo de transmissão autossômico dominante (Cremers e Geerts 1979; Petit et al. 1993), o padrão visto na maioria das famílias sugere um modo de herança autossômico recessivo (Bjornstad 1965; Reed et al. 1967; Voigtlander 1979).

Embora haja descrições clínicas detalhadas dessa desordem, a causa molecular da síndrome de Bjornstad permanece desconhecida. Para elucidar o defeito subjacente e a forma de herança dessa síndrome, realizou-se estudo de ligação em uma grande família com 8 indivíduos afetados. A análise demonstrou que o *locus* responsável pela síndrome de Bjornstad localiza-se no cromossomo 2q34-36.



**Figura 1.** Árvore genealógica da família com síndrome de Bjornstad. Símbolos escuros = não afetados; símbolos claros = afetados; símbolo achurado = condição clínica desconhecida; quadrados = homens; círculos = mulheres; diamante = irmãos da 3ª geração não estudados; linha dupla indica consangüinidade (em ambos casos, os casamentos ocorreram entre primeiros de 2º grau); indivíduos mortos estão indicados por linha diagonal.

## PACIENTES E MÉTODOS

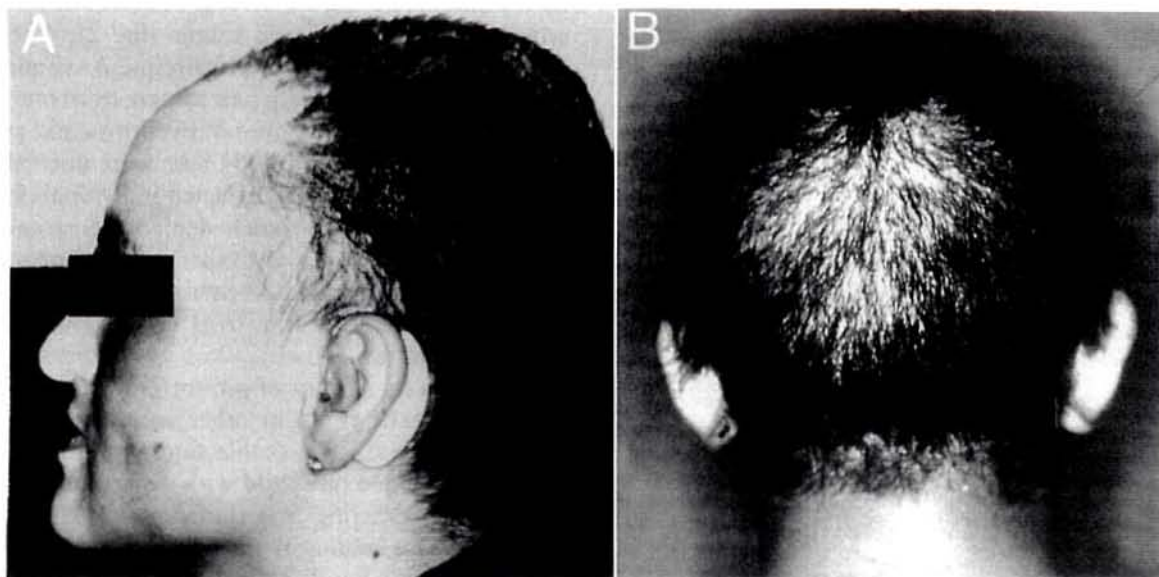
### Pacientes

Esse estudo foi revisto e conduzido de acordo com Normas Institucionais e da Comissão de Ética do Massachusetts Eye and Ear Infirmary. Todos membros da família maiores de idade assinaram consentimentos informados para participar nesse estudo. Dezoito indivíduos de três gerações de uma família mexicana (origem mista de espanhóis e índios nativos) foram avaliados (por JFLN e MAMF) através de questionário (para acessar outras causas conhecidas e fatores de risco para perda auditiva), exame físico limitado incluindo ausculta e fundoscopia, e avaliação otorrinolaringológica completa (exame físico, audiometria e testes vestibulares). Audiometria tonal foi feita (por RMC) com condução aérea testada em 250, 500, 1000, 2000, 4000, 6000 e 8000 Hz e com condução óssea testada em 500, 1000, 2000 e 4000 Hz. Amostras de sangue e de cabelo foram obtidas para análise genética e para microscopia eletrônica, respectivamente, e foram transportadas para os Estados Unidos com conhecimento do Ministério da Saúde do México. Membros da família com perda auditiva neurossensorial pré-lingual e *pili torti* foram diagnosticados como afetados pela síndrome de Bjornstad.

### Análise Genética

Análise do cariótipo foram feitas em amostras de dois indivíduos afetados (III-1 e IV-1, fig. 1), conforme descrito por Hook (Hook, 1977). DNA genômico foi extraído de sangue total por técnicas rotineiras do laboratório (Tanigawa et al. 1990) e diluídas até a concentração de 50 ng/l para amplificação pela reação em cadeia de polimerase (PCR) com oligonucleotídeos de amplificação marcados com fluoresceína do Centro

Cooperativo de Estudos de Ligação em Humanos ("Cooperative Human Linkage Center Human Screening Set / Weber Version 8 (Research Genetics®)").



**Figura 2.** Fotografia de um membro afetado. A, cabelos curtos característicos e uso de prótese de amplificação sonora. B, visão posterior do paciente, mostrando o cabelo esparso, curto.

O volume final das reações foi de 5  $\mu$ l e continham 10 ng de DNA genômico, 0,25 U de *Taq* DNA polimerase, 2 pmol de oligonucleotídeos de amplificação anterógrados e retrógrados, 0,2 mM de deoxinucleotídeos e 2,5 mM de  $MgCl_2$ ; tampão específico para PCR recomendado pelo fabricante em concentração 1x (1x *Cetus* PCR buffer) foi utilizado. Amostras foram desnaturadas a 95 °C por 10 min, seguidos por reações de PCR (10 ciclos: 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 1 min; 20 ciclos: 89 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 1 min). Os produtos misturados foram suplementados com marcadores de peso molecular internos marcados com vermelho

Tamra e foram submetidos à eletroforese em seqüenciador automatizado (*Applied Biosystems model 377*), analisados pelo programa *Genescan v. 2.1* de leitura de eletroferograma, e pelo programa *Applied Biosystems Genotyper v. 2.0*.

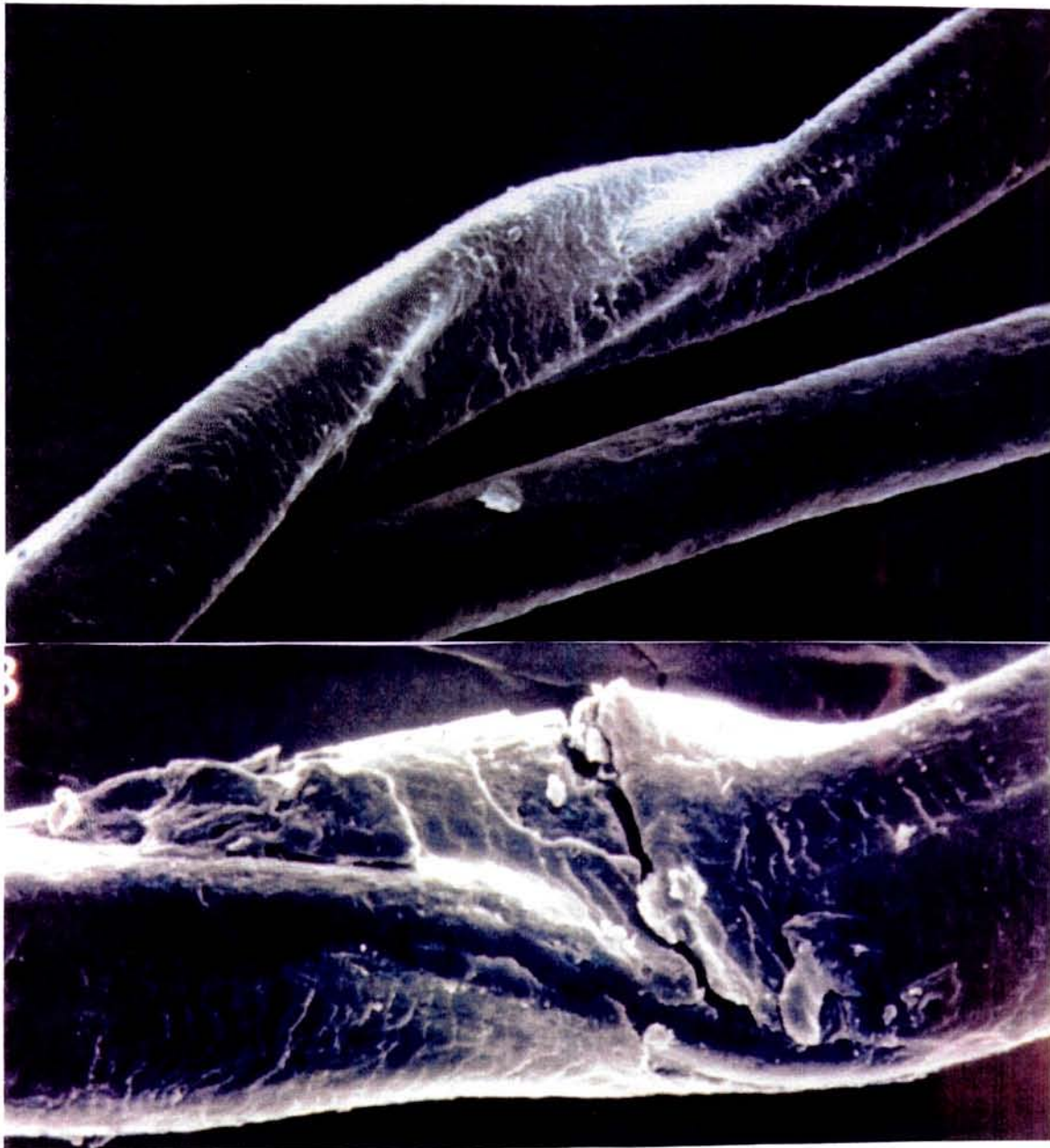
Marcadores polimórficos adicionais da *Research Genetics*<sup>®</sup> foram testados para confirmar ligação, diminuir o intervalo de doença e construir um haplótipo. As PCRs foram feitas com 3 $\mu$ l (150ng) de DNA em 7 $\mu$ l de mistura de reatores contendo 1 $\mu$ l de tampão específico para PCR recomendado pelo fabricante na concentração 10X (100 nM Tris-HCL, pH 8,3, 500 mM KCl e 25 nM MgCl<sub>2</sub>), 1 $\mu$ l de mistura de nucleotídeos (1.25 mM cada de dATP, dCTP, dGTP, and dTTP); 2 pmol de oligonucleotídeos de amplificação anterógrados (marcados radioativamente com  $\gamma$  <sup>32</sup>P) e 2 pmol oligonucleotídeos de amplificação retrógrados; e 1U (0.2 $\mu$  l) de polimerase *Taq*. Completaram-se 32 ciclos de amplificação a 94 °C por 20 s, 55-58 °C por 30 s, e 72 °C por 30-45 s. Os produtos da reação foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% (7.7 M de uréia) e analisados por auto-radiografia.

### **Análise de Ligação**

Escores *LODs* foram calculados entre o gene da doença e cada marcador, usando programa *MLINK (version 5.1)*, assumindo-se freqüência de alelos derivada de 25 indivíduos não-relacionados com a família. Mutação no gene da síndrome de Bjornstad (tanto *pili torti* como perda auditiva) foi considerada como totalmente penetrante sob um modelo recessivo. Freqüência do gene da síndrome de Bjornstad foi estimado em 0,001 para cálculos de escore *LOD*. Assumiu-se igual freqüência de recombinações entre homens e mulheres.

### Microscopia eletrônica

Amostras de cabelo foram montadas em fita adesiva de carbono, cobertas por ouro/paládio, e visualizadas com microscópio eletrônico *Amray 1000A*.



**Figura 3.** Foto de microscopia de varredura do cabelo. A, cabelo torcido 180° no seu próprio eixo (X200); B, fratura do cabelo em uma dessas torções (X500).

## RESULTADOS

### Avaliações Clínicas

Oito indivíduos em uma grande família (designada “família BS-1”) foram diagnosticados como afetados pela síndrome de Bjornstad, baseando-se em análises de cabelos e da audição. Todos indivíduos afetados tiveram perda auditiva neurossensorial pré-lingual não-progressiva e usavam aparelhos de amplificação sonora. Dois utilizavam linguagem de sinais para comunicação (IV-1 e IV-4) e tinham perfis audiométricos de surdez neurossensorial profunda. Os exames audiométricos dos restantes 6 afetados demonstram um padrão consistente de perda auditiva leve à moderada em baixas e médias frequências e moderada à severa em frequências mais altas. Todos esses 6 pacientes tinham linguagem oral relativamente normal.

Todos 8 afetados tinham anormalidades no cabelo envolvendo todo escalpo, que tinham sido notadas pelos pais no 2<sup>o</sup> ano de vida. O cabelo era esparso, curto, seco, sem brilho e frágil (Figura 2). Os pacientes nunca necessitaram de corte de cabelo. A aparência microscópica típica do cabelo de um dos afetados é mostrada na Figura 3. Sobrancelhas, cílios e pêlos axilares, pubianos e corporais eram normais.

O estado hormonal dos indivíduos afetados pareceu normal. Todas mulheres afetadas negaram anormalidades menstruais; duas garotas (idade < 14 anos) tinham características sexuais secundárias normais para idade. Um homem afetado (indivíduo III-1) é casado e tem dois filhos não afetados (dados não mostrados). Não houve história de *pili torti* ou perda auditiva pré-lingual em outros membros vivos ou mortos da família. Achados significativos em outros familiares incluíram uma criança com perda auditiva neurossensorial profunda isolada (indivíduo IV-5, fig. 1) que necessitava linguagem de sinais; um adulto (indivíduo II-1) tinha vitiligo em ambas as mãos. História



e exame físico foram de resto normais tanto nos afetados como nos não-afetados. Zumbidos ou tonturas não foram relatados por qualquer membro da família. Não havia malformações dentárias ou de unhas e nenhum indivíduo tinha topete branco na cabeça. Também não foram observados nistagmo, malformações de orelha externa ou disfunção de sétimo nervo craniano.

### **Estudos Genéticos**

A análise da árvore genealógica foi consistente com modo de transmissão autossômico recessivo da síndrome de Bjornstad na família BS-1 (Fig. 1). Foram feitas análise do cariótipo dos indivíduos III-1 e IV-1 que não revelaram anormalidades. Estudos genéticos foram feitos com amostras de DNA de 18 indivíduos. Devido ao fato de que síndrome de Bjornstad envolve tanto surdez neurossensorial como *pili torti*, o indivíduo IV-5, que tinha perda auditiva, mas cabelo normal, foi considerado como tendo condição clínica desconhecida para propósito de cálculo de escores *LOD*.

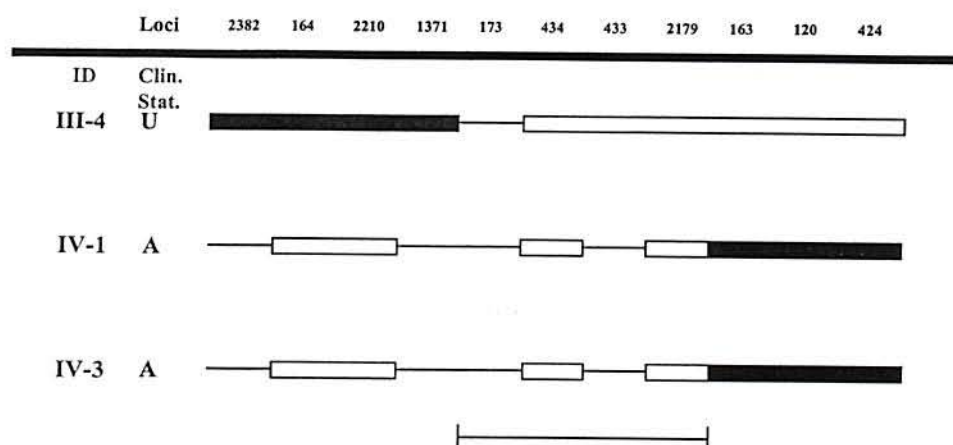
A busca ao longo de todo genoma foi feita usando *loci* altamente polimórficos. Evidência de ligação foi detectada inicialmente entre o *locus* da síndrome de Bjornstad com marcador *D2S434* (escore *LOD*: 4,98 em  $\theta = 0$ ). Analisou-se, então, ligação entre gene da doença e outros *loci* do cromossomo 2q. Escores *LODs* obtidos com 16 marcadores polimórficos são mostrados na Tabela 1. Baseando-se na ligação do *locus* de doença e marcador âncora do cromossomo 2, *D2S434*, o gene foi localizado para o cromossomo 2q34-36.

**Tabela 1.** Ligação entre o gene da doença e os *loci* do cromossomo 2.

LOCUS	Escore					
	LODs em					
	$\theta =$					
O	0,01	0,05	0,10	0,20	0,30	
D2S2382	-∞	-,79	,33	,58	,43	,04
D2S164	-∞	2,88	3,23	3,07	2,38	1,49
D2S2210	-∞	2,85	3,18	2,99	2,26	1,32
D2S1371	-∞	1,71	2,13	2,07	1,61	,96
D2S173	2,49	2,44	2,25	2,01	1,50	,95
D2S434	4,98	4,88	4,49	3,99	2,92	1,77
D2S433	4,04	3,97	3,65	3,25	2,39	1,48
D2S2179	-∞	1,44	1,88	1,84	1,41	,84
D2S163	-∞	-,38	,78	1,04	1,01	,66
D2S120	-∞	-1,44	-,20	,20	,40	,33
D2S424	-∞	-,38	,78	1,07	1,01	,67
D2S2372	-∞	1,92	2,34	2,27	1,80	1,16
D2S313	-∞	-1,3	,48	,97	1,02	,64
D2S360	-∞	-,46	,72	1,04	1,05	,76
D2S351	-∞	-1,12	,67	1,18	1,24	,87
D2S1363	-∞	-1,29	,48	,96	,99	,59

Para refinar ainda mais o *locus* de doença, os haplótipos de 3 indivíduos que exibiram recombinações ao longo dessa região foram analisados (Fig. 4). Os genótipos

dos indivíduos III-4, IV-1 e IV-3 definiram eventos recombinantes e indicaram que o locus da doença estava dentro de um intervalo de 3 cM entre os loci *D2S1371* e *D2S163*.



**Figura 4.** Representação esquemática dos genótipos de 3 indivíduos que foram discordantes com a condição clínica no intervalo de 5cM entre *D2D2382* e *D2S424*. São mostrados números de identificação (ID) na árvore genealógica e a condição clínica (Cond. Clin.; NA, não afetado; A, afetado). Barras pretas representam discordância entre locus de DNA e condição clínica; barras com preenchimento branco representam concordância; linhas representam genótipo não-informativo. O intervalo de 3cM contendo gene da síndrome de Bjornstad é mostrado. A localização dos loci *D2S2382*, *D2S164*, *D2S2210*, *D2S1371*, *D2S173*, *D2S434*, *D2S2179*, *D2S163*, *D2S120*, e *D2S424* foram retiradas do mapa genético do cromossomo 2. Distâncias entre esse loci não estão desenhadas em escala.

## DISCUSSÃO

Relata-se que mutação genética recessiva responsável pela síndrome de Bjornstad em grande família mexicana localiza-se no cromossomo 2q34-36. Todos indivíduos afetados com *pili torti* e perda auditiva neurossensorial foram homozigóticos para alelos entre *D2S1371* e *D2S163*. Esse intervalo exclui o vizinho gene *PAX3*, que está mutado em desordens (síndrome de Waardenburg e síndrome craniofacial-surdez-mão) que compartilham algumas características clínicas com síndrome de Bjornstad (Tassabehji et al. 1992; Asher et al. 1996).

Análises clínicas de 7 portadores heterozigóticos do gene da doença não identificaram anormalidades auditivas ou capilares, mas um indivíduo carregando o haplótipo de doença tinha surdez pré-lingual neurossensorial profunda. Entretanto, a textura, resistência e morfologia do cabelo desse indivíduo eram normais. Embora sua perda auditiva possa ser devida ao alelo de doença, suspeita-se que outra etiologia causou sua surdez. Avaliações de outras famílias com síndrome de Bjornstad deverão ajudar a determinar se mutações no gene da síndrome de Bjornstad podem causar outros defeitos auditivos.

O cabelo consiste de 50-100 proteínas (Rogers e Powell 1993), das quais queratinas e filamentos intermediários associados a proteínas (FIAP) predominam (Emonet et al. 1997). Camundongo transgênico superexpressando produtos de genes de FIAPs têm pêlos frágeis, quebradiços (Rogers e Powell 1993), achado que apóia ainda mais modelo que anormalidades nessas proteínas podem alterar estrutura capilar. Pode-se esperar que defeitos em queratinas, FIAPs ou em enzimas envolvidas com modificações pós-transducionais dessas moléculas possam causar defeitos ultra-estruturais do cabelo na síndrome de Bjornstad.

Surdez neurossensorial e *pili torti* na síndrome de Bjornstad podem ser fenótipos independentes que resultem de co-heranças de defeitos genéticos proximamente ligados. Embora nossos estudos não excluam a possibilidade de síndrome de gene contíguo, a reconhecida imunorreatividade de citoqueratinas e outros FIAPs na cóclea (Anniko et al. 1990; Bauwens et al. 1991) faz-nos considerar como mais provável defeito de gene único que seja responsável por ambos fenótipos. Dessa forma, genes codificando componentes estruturais maiores do cabelo (citoqueratinas e FIAPs) parecem ser bons genes candidatos para mutações que causam distintas manifestações dessa desordem.

Até o presente, somente vilina codificada no cromossomo 2q35 (Rosseau-Merck et al. 1988), localiza-se no intervalo do gene da doença definido nesse estudo (Schuler et al. 1996). Embora essa proteína ligadora da actina seja largamente expressada nas microvilosidades (Hofer e Dreckhahn 1996), a vilina não foi encontrada em microvilosidades especializadas, conhecidas como “estereocílios”, da orelha interna (Flock et al. 1982; Alberts et al. 1994). Assim, antecipa-se que análises em andamento do intervalo entre *D2S1371* e *D2S163* levarão à identificação do gene que tem papel crítico na estrutura do cabelo do escalpo e na estrutura das células da orelha interna.

**AGRADECIMENTOS**

Dr. José Faibes Lubianca Neto recebeu bolsa de doutorado sanduíche da CAPES, Brasília - Brasil. Esse trabalho foi financiado, em parte, por fundos de pesquisa do Howard Hughes Medical Institute para C.E.S. e J.G.S.

## REFERÊNCIAS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) *Molecular Biology of the Cell*, 3<sup>rd</sup> ed. Garland Publishing, New York.

Anniko M, Arnold W, Thornell LE, Virtanen I, Ramaekers FC, Pfaltz CR (1990) Regional variations in the expression of cytokeratin proteins in the adult human cochlea. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 247: 182-188.

Asher JH Jr, Sommer A, Morell R and Friedman TB (1996) Missense mutation in the paired domain of PAX3 causes craniofacial-deafness-hand syndrome. *Hum Mutat* 7:30-35.

Bauwens LJ, Veldman JE, Bouman H, Ramaekers FC, Huizing EH (1991) Expression of intermediate filament proteins in the adult human cochlea. *Ann Otol Rhino Laryngol* 100: 211-218.

Birnbaum PS, Baden HP (1987) Heritable disorders of the hair. *Dermatol Clin* 5: 137-153.

Bjornstad RT (1965) *Pili torti* and sensory-neural loss of hearing. Paper presented at the 17<sup>th</sup> Combined Scand Dermatol Assoc Meeting, Copenhagen, Denmark: 27-29.

Cremers CWRJ and Geerts SJ (1979) Sensorineural hearing loss and pili tori. *Ann Otol* 88:100-104.

Emonet N, Michaille JJ, Dhouailly D (1997) Isolation and characterization of genomic clones of human sequences presumably coding for hair cysteine-rich proteins. *J Dermatol Sci* 14: 1-11.

Flock A, Bretscher A and Weber K (1982) Immunohistochemical localization of several cytoskeletal proteins in inner ear sensory and supporting cells. *Hear Res* 6:75-89.

Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM (eds) (1995) *Hereditary hearing loss and its syndromes*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford.

Hofer D and Drenckhahn D (1996) Cytoskeletal differences between stereocilia of the human sperm passageway and microvilli/stereocilia in other locations. *The Anatomical Record* 245:57-64.

Hook EB (1977) Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet* 29:94-97.

Kurwa AR, Abdel-Aziz AHM (1973) *Pili torti* - congenital and acquired. *Acta Dermatovener (Stockholm)* 53:385-392.

Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE (1993) Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the US school-age population. *Am J Med Genet* 46:486-491.



Morton NE (1991) Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann NY Acad Sci* 630:16-31.

Munro DD (1971) Disorders of the hair. In Fitzpatrick, Arndt, Clark, Eisen, VanScott, and Vaughan (eds) *Dermatology in general medicine*. McGraw-Hill, New York.

Petit A, Dontenwille MM, Blanchet-Bardon C, Civatte J (1993) *Pili torti* with congenital deafness (Bjornstad's syndrome) - report of three cases in one family, suggesting autosomal dominant transmission. *Clin Exp Dermatol* 18:94-95.

Petit C (1996) Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nature genetics* 14:385-391.

Reardon W (1992) Genetic deafness. *J Med Genet* 29:521-526.

Reed WB, Stone VM, Boder E and Ziprkowski L (1967) Hereditary syndromes with auditory and dermatological manifestations. *Arch Dermatol*, 95:456-461.

Robinson GC, Johnston MM (1967) *Pili torti* and sensory neural hearing loss. *J Pediatr* 70:621-623.

Rogers GE, Powell BC (1993) Organization and expression of hair follicle genes. *J Invest Dermatol* 101 Suppl: 50S-55S.

Ronchese F (1932) Twisted hairs (*pili torti*). *Arch Dermat & Syph* 26:98-109.

Rousseau-Merck MF, Simon-Chazottes D, Arpin M, Pringault E, Louvard D, Guenet JL and Berger R (1988) Localization of the villin gene on human chromosome 2q35-q36 and on mouse chromosome 1. *Hum Genet* 78:130-133.

Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, White RE, et al. (1996) A Gene Map of the Human Genome. *Science* 274: 540-546.

Scott MJ, Bronson DM and Esterly NB (1983) Bjornstad syndrome and *pili torti*. *Pediatr Dermatol* 1:45-50.

Tanigawa G, Jarcho JA, Kass S, Solomon SD, Vosberg HP, Seidman JG and Seidman CE (1990) A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: An  $\alpha/\beta$  cardiac myosin heavy chain hybrid gene. *Cell* 62:991-998.

Tassabehji M., Read AP, Newton VE, Harris R, Balling R, Guss P and Strachan T (1992) Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature* 355:635-636.

Van Camp G, Smith RJH (1998) Hereditary hearing loss homepage. <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh>.

Voigtlander V (1979) Pili torti with deafness (Bjornstad syndrome). Report of a family. *Dermatologica* 159:50-54.

