

Frequência da Mutação Mitochondrial C1494T, do Gene *MT-RNR1*, em Coortes de Ouvintes e Surdos Brasileiros

Frequency of Mitochondrial Mutation C1494T, of the Gene *MT-RNR1*, in Cohorts of Brazilian Hearing and Deaf People

CAMILLA BORGES GAZOLLA¹
ELISA UNAYA²
DANIELLE TOLOMEOTTI³
VALTER AUGUSTO DELLA-ROSA⁴

RESUMO

Introdução: Fatores ambientais e genéticos, ou mesmo a interação destes, podem ser causadores da surdez sendo a mesma o déficit sensorial mais frequente em humanos, sendo estimado que um a cada 500 recém-nascidos tenha perda auditiva bilateral permanente, e que esta incidência aumente para 3,5:1000 em indivíduos na adolescência. Determinados fatores ambientais podem ser potencializados, quando determinadas mutações estão presentes no genoma. É amplamente conhecida que a utilização de antibióticos aminoglicosídeos pode originar a surdez; especialmente quando o sujeito possuir mutações mitocondriais predisponentes. A mutação C1494T do gene mitocondrial *MT-RNR1*, o qual é responsável pela formação da subunidade 12S do RNA ribossômico (12S rRNA), tem sido descrita associada à perda auditiva pelo uso de antibióticos aminoglicosídeos. **Objetivo:** É o de investigar a prevalência da mutação mitocondrial C1494T do gene *MT-RNR1* em coortes de sujeitos ouvintes e surdos, das regiões Norte e Nordeste do Estado do Paraná, Brasil. **Material e Método:** Foram investigados 80 sujeitos ouvintes saudáveis e 80 surdos que apresentavam surdez pré-lingual, não síndromica, de etiologia desconhecida, sendo casos isolados dentro das famílias. Foi utilizada a técnica de PCR para amplificação da região, de um fragmento de 936 pb, na posição 1494, do gene *MT-RNR1* seguido de digestão pela enzima de restrição *Hph I*. **Resultados:** A mutação C1494T não foi encontrada nas amostras de sujeitos ouvintes e de surdos. **Conclusões:** A mutação C1494T do gene *MT-RNR1* pode ser considerada ausente ou rara nas populações de sujeitos ouvintes e surdos das regiões Norte e Nordeste do estado do Paraná, Brasil.

DESCRIPTORIOS

Surdez. Genes Mitocondriais. Perda Auditiva.

ABSTRACT

Introduction: Deafness is the most common sensory deficit in humans, which may be caused by environmental and genetic factors or even by a combination of both. It has been estimated that one in every 500 newborns has bilateral permanent hearing loss, and this incidence increases to 3.5:1,000 individuals in adolescence. Certain environmental factors may be enhanced when specific mutations are present in the genome. It is widely known that the use aminoglycoside antibiotics may lead to hearing loss, especially if the individual has predisposing mitochondrial mutations. Mutation C1494T of the mitochondrial gene *MT-RNR1* which causes the formation of the subunit 12S of the ribosome RNA (12S rRNA), has been associated with hearing loss due to the use of aminoglycoside antibiotics. **Objective:** This study investigates the occurrence of mitochondrial mutation C1494T in the gene *MT-RNR1* in cohorts of hearing and deaf people in northern and northwestern regions of Paraná state, Brazil. **Material and Methods:** Eighty hearing people and eighty deaf people were analyzed. The latter were characterized as pre-lingual, non-syndromic, of unknown etiology, being isolated cases within the family. PCR technique was used for amplification of the fragment 936 bp of the gene *MT-RNR1* at position 1494, followed by digestion with restriction enzyme *Hph I*. **Results:** Mutation C1494T was not detected in the samples of hearing and deaf people. **Conclusions:** Mutation C1494T of the gene *MT-RNR1* may be absent or rare in populations of hearing and deaf people in northern and northwestern regions of Paraná state, Brazil.

DESCRIPTORS

Deafness. Hearing Loss. Mitochondrial Genes.

1 Graduanda em Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR, Brasil.

2 Especialista em Biotecnologia - Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular Universidade Estadual de Maringá. Maringá/PR, Brasil.

3 Mestre em Genética e Melhoramento - Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular Universidade Estadual de Maringá. Maringá/PR, Brasil.

4 Doutor em Genética - Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular Universidade Estadual de Maringá. Maringá/PR, Brasil.

Fatores ambientais e genéticos, ou mesmo a interação destes, podem ocasionar surdez. A surdez é o déficit sensorial mais frequente em humanos¹, sendo estimado que um recém-nascido em 500 tenha perda auditiva bilateral permanente, e que esta incidência aumente para 3,5:1.000 em indivíduos na adolescência². Dentre os fatores ambientais predisponentes à surdez, se destacam as drogas ototóxicas, tais como os antibióticos aminoglicosídeos, descobertos nos anos de 1940, utilizados amplamente no tratamento da tuberculose e de infecções bacterianas. O grupo dos antibióticos aminoglicosídeos inclui: a gentamicina, a tobramicina, a ampicacina, a netilmicina, a canamicina, a estreptomomicina, a paromomicina e a neomicina, que são utilizados, principalmente, no tratamento de infecções causadas por bactérias aeróbicas gram-negativas³. A ototoxicidade dos aminoglicosídeos é uma das causas mais comuns de surdez adquirida⁴.

A surdez, de etiologia genética, pode ser dividida em surdez síndrômica (~30%) e não síndrômica (~70%). Genes, no DNA nuclear, associados à surdez não síndrômica são transmitidos por herança autossômica recessiva (~58%), por herança autossômica dominante (~38%) e herança ligada ao cromossomo ao X (~4%)⁵. Além dos genes no DNA nuclear são ainda encontrados no DNA mitocondrial dois genes associados à surdez, transmitidos por herança materna, também conhecida como herança mitocondrial, sendo o gene *MT-RNR1* (*mitochondrially encoded 12S rRNA*) responsável pela formação da subunidade 12S do RNA ribossômico (12S rRNA) e o gene *MT-TS1*, responsável pela formação do RNA transportador da serina (tRNA ser^(UCN)).

A mutação C1494T no gene *MT-RNR1* foi primeiramente descrita em uma grande família chinesa com surdez não síndrômica, decorrente de herança materna, induzida pelo uso de antibióticos aminoglicosídeos⁶ e; subsequentemente descrita em outras genealogias chinesas^{7,8,9,10}, em três famílias espanholas¹¹ e; em um estudo de rastreamento na população chinesa, sendo a maioria da etnia Han¹². A mutação C1494T resulta da troca do nucleotídeo citosina (C) por uma timina (T) na posição 1494 do gene *MT-RNR1*. A posição 1494 em humanos equivale a 1409 do 16S rRNA da *E.coli* e está

localizada na penúltima hélice do gene mitocondrial 12S rRNA (sítio A), região altamente conservada do gene, sendo o alvo principal para a ototoxicidade aos aminoglicosídeos¹³. Essa mutação produz uma deficiência respiratória celular e pode resultar na diminuição da produção de ATP na célula coclear que é essencial para o funcionamento da audição^{7,14}. Como a cóclea é altamente sensível às disfunções mitocondriais¹⁵, estas disfunções, oriundas das mutações, são frequentemente acompanhadas da perda auditiva neurosensorial.

Além da mutação C-T na posição 1494, são descritas mais duas regiões (A1555G e 961 del T ou T-C) no gene *MT-RNR1*, predispondo indivíduos à perda de audição irreversível, se tratados com antibióticos aminoglicosídeos⁵.

São poucos ainda os estudos sobre a frequência da mutação C1494T, em diferentes populações, sendo a maioria realizada em estudos multicêntricos. Um estudo chinês revelou que a mutação mitocondrial C1494T no gene *MT-RNR1* é rara, sendo detectada em 13 sujeitos de uma amostra de 3.133 surdos (0,4%) provenientes de 27 regiões da China, com a maioria dos sujeitos pertencentes à etnia Han¹². Em outro estudo, na população Espanhola, a mutação C1494T foi confirmada em 17 indivíduos, de três diferentes famílias, em uma amostra de 1.339 sujeitos (1,2%)¹¹. No entanto, a mutação C1494T não foi encontrada em surdos ou ouvintes de outras etnias^{16,17, 18,19,20}.

Postal *et al.*²¹, em um estudo brasileiro, com amostra de sujeitos ouvintes e surdos expostos e não expostos a aminoglicosídeos não encontraram a mutação C1494T. O conhecimento da frequência de mutações mitocondriais em diferentes regiões, especialmente em populações com alta miscigenação, como é o caso do Brasil, é importante para a compreensão da etiologia da surdez não síndrômica, bem como, para uma prática clínica segura, na administração de antibiótico aminoglicosídeos, aos sujeitos portadores de tais mutações, que predispõe a surdez.

Conhecer a prevalência da mutação C1494T no gene *MT-RNR1*, poderá auxiliar no estabelecimento de diretrizes para investigação molecular da surdez não síndrômica, de etiologia desconhecida, na prática clínica. O objetivo visa conhecer a prevalência dessa mutação mitocondrial em coortes de sujeitos ouvintes e surdos com o intuito de verificar se esta mutação ocorre nas regiões Norte e Nordeste do estado do Paraná, Brasil.

METODOLOGIA

Seleção de amostras

Foram selecionadas amostras de DNA, previamente extraídas e estocadas de sujeitos ouvintes e surdos, brasileiros, provenientes das regiões Norte e Noroeste do estado do Paraná, Brasil. A coorte de sujeitos ouvintes foi composta de 80 sujeitos saudáveis, sendo 32 do sexo masculino e 48 do sexo feminino, com idades variando entre 18 e 58 anos, com média de idade igual a 26,3 anos para o sexo feminino e 26,1 anos para o sexo masculino. A coorte de surdos foi composta de 80 surdos, sendo 40 do sexo feminino e 40 do sexo masculino, com idades variando entre um mês a 69 anos, com média de idade igual a 12,02 anos para o sexo feminino e 12,62 anos para o sexo masculino, os quais apresentam surdez pré-lingual e não sindrômica, de etiologia desconhecida. Em nenhum dos sujeitos surdos houve história confirmada de exposição aos aminoglicosídeos. Os sujeitos já haviam sido submetidos à triagem para as mutações 35delG, 167delT e 235delC no gene *GJB2* e A1555G no gene *MT-RNR1* (12SrRNA) e A7445G no gene *MT-TS1* (tRNA^{ser}^(UCN)) e apresentaram resultados negativos.

Aspectos Éticos

O desenho do estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos da UEM com o protocolo CAAE nº 02378412.1.0000.0104 e aprovado. Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Análise Molecular

Foi utilizada a técnica de PCR padrozinada por Wang *et al.*²². A técnica consiste na amplificação de um fragmento de 936 pb seguido de digestão pela enzima

de restrição *Hph* I. A reação de amplificação foi realizada utilizando de 100 a 200 ng de DNA genômico; 0,4 μM de cada “*primer*” L1156 5'-GAACACTACGA-GCCACAGC-3' e H2053 5'-TTAGAGGGTTCT-GTGGGCAAA-3'; 1U de Taq polimerase; 1,5 mM MgCl₂, tampão de PCR 10x (Tris-HCl 10 mM pH 8,8) e 0,2 mM de solução de dNTPs, em um volume final de 25 μl. Para cada grupo de amostra foi feita uma reação controle com sujeito ouvinte e uma reação sem DNA. A reação foi submetida às seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto; anelamento a 58°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto; com extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto da amplificação foi clivado *overnight*, a 37°C, com a enzima de restrição em um volume de 20 μl, consistindo de 10 μl do produto do PCR e 2 μl da enzima *Hph* I (New England Biolabs). Os produtos da clivagem dos alelos quando cortados com enzima *Hph* I, geram para o alelo normal (1494C) quatro fragmentos (55, 90, 255 e 536 pb) e para o alelo mutante (1494T) três fragmentos (55, 90 e 791 pb). Os fragmentos de 55 e 90 pb servem como controles internos das amplificações dos alelos normal e mutante. Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídio.

RESULTADOS

A mutação C1494T no gene *MT-RNR1* utilizando-se a técnica de PCR de Wang *et al.*¹⁹, não foi encontrada na coorte de 80 sujeitos ouvintes, de ambos os sexos, bem como, na coorte de 80 sujeitos com surdez não sindrômica, de ambos os sexos. A Figura 1 ilustra os resultados obtidos com amostras de DNA em oito surdos e um ouvinte.

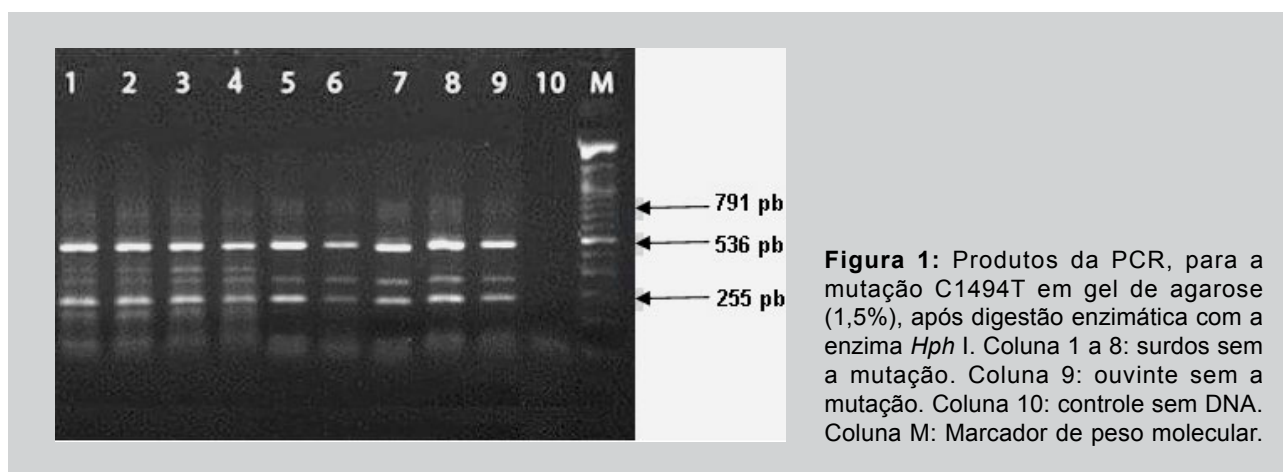


Figura 1: Produtos da PCR, para a mutação C1494T em gel de agarose (1,5%), após digestão enzimática com a enzima *Hph* I. Coluna 1 a 8: surdos sem a mutação. Coluna 9: ouvinte sem a mutação. Coluna 10: controle sem DNA. Coluna M: Marcador de peso molecular.

DISCUSSÃO

Este estudo buscou investigar a ocorrência da mutação mitocondrial C1494T no gene *MT-RNR1* em coortes de sujeitos ouvintes e surdos com a finalidade de verificar se esta mutação ocorre nas regiões Norte e Noroeste, do estado do Paraná, Brasil, para auxiliar no estabelecimento de diretrizes da investigação molecular da surdez, não síndrômica, de etiologia desconhecida na prática clínica.

A mutação C1494T foi identificada primeiramente por Zhao *et al.*⁶ em uma grande família chinesa, na qual todos os indivíduos que tinham a mutação apresentavam surdez, dentre estes haviam indivíduos que tinham sido expostos aos aminoglicosídeos e outros não. Em outro estudo Zhao *et al.*⁷ afirmam que a mutação C1494T leva a uma disfunção mitocondrial na qual os aminoglicosídeos modulam a expressão fenotípica da mesma, sugerindo fortemente que a mutação sozinha é insuficiente para produzir o fenótipo de surdez. Assim, é possível que os surdos com a mutação C1494T devem ter sido expostos em algum período de suas vidas aos aminoglicosídeos, justificando-se uma boa anamnese, incluindo a herança materna da surdez e a investigação do uso de aminoglicosídeos, que pode se perder ao longo de suas vidas.

No presente estudo esta mutação não foi encontrada na coorte de 80 sujeitos ouvintes, de ambos os sexos. Um estudo brasileiro relatou dados semelhantes em amostra com 20 sujeitos ouvintes²¹. Outros estudos, com ouvintes, em diferentes países, como o de Rodriguez-Ballesteros *et al.*¹¹ na Espanha com 894 sujeitos; o de MKaouar-Rebai *et al.*¹⁷ na Tunísia com 100 sujeitos; o de Konings *et al.*¹⁸, com 400 belgas; o de Bardien *et al.*¹⁹ com 204 sul africanos e o de Meza *et al.*²⁰ com 32 mexicanos, também não encontraram a mutação C1494T. Assim esses dados, conjuntamente parecem reforçar a ideia de que a mutação C1494T no gene *MT-RNR1* na população ouvinte, de diferentes etnias, é rara ou possui baixa frequência, devendo se restringir às regiões onde foi descrita, associada à surdez não síndrômica.

Ainda neste estudo ao se investigar a mutação C1494T do gene *MT-RNR1*, na coorte de 80 sujeitos, de ambos os sexos, com surdez não síndrômica, a mesma não foi encontrada. Postal *et al.*

²¹ em um estudo brasileiro com 40 surdos, de ambos os sexos, também não encontraram a mutação C1494T. Li *et al.*¹⁶ na China e Meza *et al.*²⁰ no México também não encontraram, em sujeitos surdos não síndrômicos, a referida mutação. A literatura relata a mesma circunscrita a genealogias chinesas descritas por

Zhao *et al.*^{6,7}; Wang *et al.*⁸; Chen *et al.*⁷; Han *et al.*¹⁰ e; em três famílias espanholas¹¹. Até o presente, esta mutação não foi descrita em surdos de outras regiões ou etnias^{16,17,18,19}. Mesmo entre a população de surdos chineses a frequência encontrada da mutação C1494T foi de 0,4%, podendo ser considerada baixa¹², reforçando também a ideia de que esta mutação na população de surdos possui baixa frequência ou é rara. Ainda que a mutação C1494T do gene *MT-RNR1* possa ser considerada de baixa frequência ou raramente encontrada na população brasileira, especialmente nas regiões Norte e Noroeste do Paraná, antes da administração de antibióticos aminoglicosídeos os sujeitos devem ser submetidos a uma anamnese direcionada à história familiar de surdez induzida por antibiótico aminoglicosídeos e; se confirmada, deve ser rastreada para investigações de mutações no gene *MT-RNR1*²³. Esta preocupação se deve ao fato de que no mesmo gene, a mutação A1555G, também associada a hipersensibilidade aos aminoglicosídeos^{14,24} foi descrita em estudos brasileiros, em populações de surdos não síndrômicos, nas frequências de 1,3% na região Norte e Noroeste do Paraná²⁵ e 2% no estado de São Paulo²⁶, contribuindo como causa significativa da surdez. Em casos isolados de surdez, não se justifica a investigação de rotina da mutação C1494T como método de se estabelecer o diagnóstico molecular entre indivíduos com deficiência auditiva de etiologia desconhecida, sem história familiar de surdez não síndrômica, especialmente na linhagem materna; devendo, sim ser investigada em sujeitos cujas famílias possuem história de surdez de etiologia desconhecida na linhagem materna.

CONCLUSÃO

A mutação C1494T do gene *MT-RNR1* pode ser considerada ausente ou rara na população de sujeitos ouvintes e surdos das regiões Norte e Noroeste do estado do Paraná, não sendo mandatória sua investigação de rotina no diagnóstico molecular da investigação da etiologia da surdez não-síndrômica de caso familiar isolado.

AGRADECIMENTOS

Nossos sinceros agradecimentos aos surdos e ouvintes que participaram desta pesquisa e as agências financiadoras, CNPq e Fundação Araucária, pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Marlin S, Feldmann D, Blons H, Loundon N, Rouillon I, Albert S, et al. GJB2 and GJB6 mutations: Genotypic and phenotypic correlations in a large cohort of hearing-impaired patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005; 131(6):481-7.
- Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening a silent revolution. *N Engl J Med*. 2006; 354(20):2151-64.
- MacDougall C, Chambers, HF. Aminoglicosídeos. In: Bruton, CC, Chambers, BA Knollmann BC. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goldman & Gildman*. 12th Ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda; 2012; 1506-20.
- Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial & deafness. *Ear & Hearing*. 2003; 24(4):303-313.
- Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em: <http://hereditaryhearingloss.org>. Acesso em 10/02/2014.
- Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng JH, Han D, et al. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. *Am J Hum Genet*. 2004; 74(1):139-52.
- Zhao H, Young WY, Yan Q, Li R, Cao J, Wang Q, et al. Functional characterization of the mitochondrial 12S rRNA C1494T mutation associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33(3):1132-9.
- Wang Q, Li QZ, Han D, Zhao Y, Zhao L, Qian Y, et al. Clinical and molecular analysis of a four-generation Chinese family with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss associated with the mitochondrial 12S rRNA C1494T mutation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 340(2):583-8.
- Chen J, Yang L, Yang A, Zhu Y, Zhao J, Sun D, et al. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss is associated with 12S rRNA C1494T mutation in three Han Chinese pedigrees. *Gene*. 2007; 401(1-2):4-11.
- Han D, Dai P, Zhu Q, Liu X, Huang D, Yuan Y, et al. The mitochondrial tRNA^{Ala}T5628C variant may have a modifying role in the phenotypic manifestation of the 12S rRNA C1494T mutation in a large Chinese family with hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 357(2):554-60.
- Rodríguez-Ballesteros M, Olarte M, Aguirre LA, Galán F, Galán R, Vallejo LA, et al. Molecular and clinical characterization of three Spanish families with maternally inherited non-syndromic hearing loss caused by the 1494C-T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene. *J Med Genet*. 2006; 43(11):e54.
- Li Q, Yuan YY, Huang DL, Han DY, Dai P. Rapid screening for the mitochondrial DNA C1494T mutation in a deaf population in China using real-time quantitative PCR. *Acta Oto-laryngol*. 2012;132(8):814-18.
- Hobbie SN, Bruell CM, Akshay S, Kalapala SK, Shcherbakov D, Böttger EC. Mitochondrial deafness alleles confer misreading of the genetic code. *PNAS*. 2008; 105(9):3244-49.
- Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. Biochemical evidence for nuclear gene involvement in phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum Mol Genet*. 1996; 5(7): 963-71.
- Usami SI, Abe S, Kasai M, Shinkawa H, Moeller B, Kenyon JB, et al. Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. *Laryngoscope*. 1997; 107(4):483-90.
- Li Z, Li R, Chen J, Liao Z, Zhu Y, Qian Y, et al. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Hum Genet*. 2005; 117(1):9-15.
- Mkaouar-Rebai E, Tlili A, Masmoudi S, Charfeddine I, Fakhfakh F. New polymorphic mtDNA restriction site in the 12S rRNA gene detected in Tunisian patients with non-syndromic hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 369(3):849-52.
- Konings A, Van Camp G, Goethals A, Van Eyken E, Vandeveld A, Ben Azza J, et al. Mutation analysis of mitochondrial DNA 12SrRNA and tRNASer(UCN) genes in non-syndromic hearing loss patients. *Mitochondrion*. 2008; 8(5-6):377-82.
- Bardien S, Human H, Harris T, Hefke G, Veikondis R, Schaaf S, et al. A rapid method for detection of five known mutations associated with aminoglycoside-induced deafness. *BMC Med Genet*. 2009; 10:2 Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/10/2>. Acesso em 01/02/2014. Doi:10.1186/1471-2350-10-2.
- Meza G, Torres-Ruiz NM, Tirado-Gutiérrez C, Aguilera P. mtDNA mutations, hearing loss and aminoglycoside treatment in Mexicans. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2011; 77(5):573-6.
- Postal M, Palodeto B, Sartorato E L, Oliveira C A. C1494T mitochondrial DNA mutation, hearing loss, and aminoglycosides antibiotics. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009; 75(6):884-7.
- Wang CY, Kong QP, Yao YG, Zhang YP. mtDNA mutation C1494T, haplogroup A, and hearing loss in Chinese. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 348(2): 712-5.
- Guan MX. Mitochondrial 12S rRNA mutations associated with aminoglycoside ototoxicity. *Mitochondrion*. 2011; 11(2):237-45.

24. Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu W-Q, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet.* 1993; 4(3) :289-94.
25. Salomão KB, Ayo CM, Della-Rosa, VA Investigation of the A1555G mutation in mitochondrial DNA (MT RNR1) in groups of Brazilian individuals with nonsyndromic deafness and normal hearing. *Indian Journal Human Genetics.* 2013; 19(1):54-7.
26. Abreu-Silva RS, Lezirovitz K, Braga MC, Spinelli M, Pirana S, Della-Rosa VA, et al. Prevalence of the A1555G(12SrRNA) and tRNASer^(UCN) mitochondrial mutations in hearing-impaired Brazilian patients. *Braz J Med Biol Res.*2006; 39(2):219-26.

Correspondência

Valter Augusto Della Rosa

Departamento de Biotecnologia Genética e Biologia Celular/

Universidade Estadual de Maringá. Avenida Colombo 5790

Maringá – Paraná - Brasil

CEP: 87020-900

Email: vadrosa@uem.br