

Investigação da Deleção Mitocondrial mtDNA4977 em Pacientes Brasileiros com Presbiacusia

Investigation of Mitochondrial mtDNA4977 Deletion in Brazilian Patients with Presbycusis

Márcio Coimbra Pereira*, **José Victor Maniglia****, **Vânia Belintani Piatto*****,
Magali A. O. M. da Silva****, **Luciana Venâncio Secches*******, **Érika Cristina Pavarino Berteli*******,
Eny Maria Goloni Bertollo*****, **Otávio Augusto Vasques Moreira*******.

* Mestre. Professor Adjunto.

** Livre-Docente. Chefe Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

*** Professor Doutor. Professor Adjunto

**** Mestre. Chefe do Serviço de Fonoaudiologia.

***** Mestre. Enfermeira Chefe do Ambulatório de Otorrinolaringologia.

***** Professora Doutora. Bióloga.

***** Graduando em Medicina. Graduando 6º Ano em Medicina.

Instituição: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto / SP - FAMERP - Av. Brigadeiro Faria Lima, nº 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto / SP - Brasil - CEP 15090-000. Telefone: +55-17-32015747.

Endereço para correspondência: Vânia Belintani Piatto (Piatto VB) - Rua Frei Baltazar, 415 - Boa Vista, São José do Rio Preto/ SP - Brasil - CEP15025-390 - Tel: +55-17-3201-5747 - E-mail: vabp@ig.com.br; vbpiatto@gmail.com

Bolsa de Iniciação Científica (BIC) - FAMERP.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da R@IO em 21 de fevereiro de 2007. Cod. 223. Artigo aceito em 29 de março de 2007.

RESUMO

Introdução:

A presbiacusia é a causa mais comum de deficiência auditiva, geralmente associada ao envelhecimento, em países industrializados. A possibilidade para a identificação de mutações genéticas associadas à presbiacusia tem importante significado clínico.

Objetivo:

avaliar a presença da deleção mitocondrial de 4977 pares de bases em pacientes brasileiros com presbiacusia documentada.

Material e Método:

Estudo de casos em corte transversal. Cem pacientes não relacionados, de ambos os gêneros, foram clinicamente examinados para se excluir formas sindrômicas de surdez. O DNA foi extraído de amostras de leucócitos de sangue periférico e primers específicos foram designados para amplificar o gene do citocromo b e a deleção de 4977pb do DNA mitocondrial, usando a técnica da reação em cadeia da polimerase.

Resultados:

Uma região do gene do citocromo b foi amplificada sendo confirmada a presença do DNA mitocondrial em todas as amostras de leucócitos, assim como a região não-deletada do DNA mitocondrial. A deleção mitocondrial mtDNA4977 não foi identificada em todas as amostras analisadas. Foram encontradas as presbiacusias, do tipo sensorial, neural e estria, respectivamente, em 38, 23 e em 18 dos pacientes analisados, de acordo com os aspectos audiométricos.

Conclusões:

Estes resultados moleculares não são concordantes com relatos da literatura, mas não descartam a possibilidade da existência de mutações em outros genes nos pacientes e, reforçam a importância de se identificar as causas genéticas subjacentes da presbiacusia, na população brasileira, a fim de propiciar melhor compreensão das doenças da orelha interna.

Palavras-chave:

presbiacusia, deficiência auditiva, DNA mitocondrial, análise molecular, deleção mtDNA4977.

SUMMARY

Introduction:

Presbycusis is the most common cause of auditory dysfunction that is generally associated with aging in industrialized societies. The ability to identify genetic mutations associated with presbycusis has significant clinical importance.

Objective:

The aim of this study was to assess the presence of the mitochondrial 4977-base pair deletion in Brazilian patients with documented presbycusis.

Material and Methods:

Case studies in transversal cut. One hundred unrelated patients of both sexes were clinically examined to exclude syndromic forms of deafness. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes samples, and specific oligonucleotide primers were designed to amplify the cytochrome b gene and the 4977-bp deletion of the mitochondrial DNA using the polymerase chain reaction.

Results:

A region of the cytochrome b gene has been previously amplified and the presence of the mitochondrial DNA and the nondeleted mitochondrial DNA was confirmed in all of the human leukocytes samples. The mitochondrial DNA4977 deletion was not identified in any of the samples analyzed. Sensory, neural and stria presbycusis were documented in 38, 23 and 18 of the analyzed patients, respectively.

Conclusions:

These molecular findings disagree with reports but don't discard the possibility of the existence of mutations in other genes in the patients and, highlight the importance of identifying the underlying genetic causes of presbycusis, in the Brazilian population, to provide a better understanding of the internal ear diseases.

Key words:

presbycusis, hearing loss, mitochondrial DNA, molecular analysis, MtDNA4977 deletion.

INTRODUÇÃO

Mutações genéticas podem ocorrer em genes nucleares ou mitocondriais. As mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) são de herança exclusivamente materna, sendo responsáveis por 0,5% a 1% das causas genéticas de deficiência auditiva sensorioneural, mas podendo ocorrer mutações espontâneas. Estudos morfológicos, bioquímicos e moleculares demonstram que a fosforilação oxidativa normalmente declina com a idade. Além disso, deleções no DNA mitocondrial têm sido encontradas em vários tecidos humanos, de idade avançada, e em tecidos de pacientes com doenças degenerativas (1).

Estudos demonstram que a deficiência auditiva progressiva, associada à idade, é ocasionada por uma deleção mitocondrial de 4977 pares de bases (pb), denominada del mtDNA⁴⁹⁷⁷ sendo, comumente, relacionada à presbiacusia, de ocorrência espontânea e sem história familiar (2,3). A presbiacusia é caracterizada por uma deterioração progressiva, insidiosa e bilateral da sensibilidade auditiva, geralmente associada à idade, apresentando um padrão de curva descendente, com perda acima de 2000Hz aos exames audiométricos de tom puro, nos estágios iniciais. Ocorre, em parte, como consequência de alterações degenerativas cocleares. Aproximadamente, 23% da população entre 65 e 75 anos de idade e 40% da população, acima dos 75 anos é acometida, sendo esta, a forma mais comum de deficiência auditiva nos Estados Unidos (3).

É classificada em quatro tipos distintos pela correlação entre os aspectos histopatológicos e audiométricos: sensorial, neural, estriar ou metabólica e condutiva coclear podendo, essas classificações, terem diferentes bases moleculares (4). Em adição a essas quatro classificações, há mais duas outras: mista (associação de um ou mais tipos) e indeterminada (não há possibilidade de correlação entre os critérios histopatológicos e audiométricos) (5). O objetivo do presente estudo é verificar, pela técnica da PCR, a frequência da mutação mitocondrial del mtDNA⁴⁹⁷⁷, em pacientes brasileiros com presbiacusia documentada.

CASUÍSTICA E MÉTODO

No período de Março a Junho de 2006, foi realizado um estudo de corte transversal, no qual foram estudados 100 pacientes, do Ambulatório de Otorrinolaringologia da Instituição, de ambos os gêneros (61 do gênero masculino e 39 do gênero feminino), com idade entre 48 anos e 89 anos, com presbiacusia documentada. Os pacientes foram incluídos no estudo após serem avaliados pelo menos por

duas vezes após o diagnóstico de presbiacusia. Em todos os pacientes incluídos foram realizadas as avaliações clínica, sempre pelo mesmo otorrinolaringologista, audiométrica, em ambas as orelhas, pela mesma audiologista e a avaliação molecular do DNA mitocondrial pelo mesmo pesquisador. Foi obtido o termo de consentimento informado de todos os pacientes ou responsáveis.

2.1 Avaliação clínica

Cada paciente foi submetido à completa anamnese para investigar idade de início da deficiência auditiva, presença de outros casos na família e excluir a possibilidade de causas ambientais: infecções materno-fetais, complicações perinatais, meningites, uso de drogas ototóxicas, trauma acústico, diabetes, etc. Os exames físicos, otorrinolaringológico e sistêmico, foram realizados para se excluir sinais sugestivos de formas sindrômicas de deficiência auditiva (especialmente dismorfismo crânio-facial, alterações tegumentares, anomalias de origem branquial, cardíaca, tireoidiana, distúrbios da visão, miopatias associadas ou não a diabetes, distúrbios de marcha, etc.). Além disso, os pacientes foram submetidos à avaliação oftalmológica (incluindo fundoscopia), testes vestibulares e tomografia computadorizada de osso temporal. Estes exames foram realizados para se excluir pacientes com deficiência auditiva causada por fatores ambientais, malformações congênitas de orelha interna ou por síndromes genéticas.

Os pacientes foram audiologicamente testados por imitanciometria, com o aparelho Modelo ZODIAC 901® - MIDDLE EAR - ANALYZER MEDSEN ELETRONIC (EUA), e audiometrias de fala e de tom puro, com o audiômetro de diagnóstico - Modelo MAICO MA 41 (Maico Hearing Instruments INC, Mineápolis, EUA), realizada no Ambulatório de Fonoaudiologia da Instituição e incluídos aqueles com os seguintes parâmetros audiométricos para o diagnóstico e classificação da presbiacusia (4,5): a) sensorial - queda nas frequências agudas, geralmente com boa discriminação, podendo poupar as frequências da área da conversação. Audiograma em curva descendente, de progressão lenta e o índice de reconhecimento de fala (IRF) pouco afetado; b) neural: há perda maior da discriminação vocal e menor perda dos limiares tonais. Audiograma em curva descendente e o IRF muito baixo; c) metabólica (estriar): há boa discriminação vocal e o IRF baixo. Curva audiométrica é plana, com perda em todas as frequências; d) condutiva coclear (mecânica): audiograma em curva descendente com a discriminação, geralmente, preservada; e) mista: associação das diferentes classificações; e) indeterminada: curva audiométrica compatível com a da presbiacusia, mas sem correlação com as da classificação.

2.2 Análise molecular

O DNA genômico (nuclear e mitocondrial) foi extraído de amostras de leucócitos de sangue periférico coletadas de cada paciente selecionado, usando o GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), de acordo com o protocolo do fabricante, sendo o procedimento realizado na Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (UPGEM) da Instituição.

Para se detectar a deleção mtDNA⁴⁹⁷⁷, fragmentos do DNA mitocondrial, que abrangem a região da deleção, foram amplificados pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) sendo utilizados dois pares de iniciadores ou *primers*, que são oligonucleotídeos sintéticos (6). O par 1 foi sintetizado de modo que abrangesse as seguintes posições do DNA mitocondrial: *primer forward* (F1), posição de 8225 a 8247 e o *primer reverse* (R1), posição de 13574 a 13551. O comprimento do nucleotídeo flanqueado pelos *primers* F1-R1 (par 1) é de 5350 pb no DNA mitocondrial normal. E, o primer forward do par 2 (F2), foi sintetizado de modo que abrangesse as posições 13176 a 13198, e o primer reverse (R2), as posições de 13724 a 13705. O tamanho esperado do fragmento amplificado pela PCR usando os primers F2-R2 (par 2) é de 549 pb no DNA mitocondrial não deletado. Um fragmento de 373 pb é amplificado, pelos *primers* F1-R1 (par 1), na presença da deleção de 4977 pb, comumente observado no DNA mitocondrial mutante. A deleção mtDNA⁴⁹⁷⁷ ocorre entre duas sequências diretas repetidas (ACCTCCCTCACCA) no DNA mitocondrial, nas posições 8470-8482 e 13447-13459.

Todas as amostras também foram analisadas para amplificação de determinada região do gene do citocromo b. Esta região específica, uma área altamente conservada do genoma mitocondrial, atua como um controle para verificar a presença do DNA mitocondrial, nas amostras do estudo. Com *primers* específicos para esta região, um produto de 161 pb é esperado ser amplificado após técnica da PCR (7).

Todos os *primers* utilizados para a realização das PCR abrangem regiões, da sequência mitocondrial codificada, do *Human Mitochondrial DNA Revised Cambridge Reference Sequence* (8) e todas as reações de PCR foram processadas em ciclador de temperatura (Eppendorf®, Modelo Mastercycler Personal, EUA).

Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 1X, contendo brometo de etídio, na concentração de 0,5mg/mL, submetidos à iluminação ultravioleta, para confirmar o sucesso da reação e o gel, fotodocumentado.

Aprovação Comitê de Ética

O estudo foi aprovado (Protocolo nº083/2005) pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da presente Instituição e pelo Comitê Nacional em Pesquisa Humana de Brasília (DF), Brasil.

Estudo estatístico

Foram avaliados 100 pacientes, em estudo piloto, para estimativa da proporção (p) de portadores da deleção mitocondrial mtDNA⁴⁹⁷⁷ nesta amostra inicial. A esta proporção (p), após ter sido determinada, foi aplicada a fórmula estatística “dimensionamento de amostra com população conhecida”, obtendo-se o tamanho da amostra final (n) necessária para representar estatisticamente a população total (Np) de pacientes atendidos no período determinado para a realização da pesquisa (Np=123 pacientes). Para o cálculo da amostra final (n) foi utilizada a referida fórmula estatística, com os seguintes parâmetros: p=0,00 (estimado pela amostra piloto); q=0,99; zc=3,00 (99,74% de confiabilidade); e=0,03 (3% de erro de estimativa); Np=123 (tamanho da população no período do estudo).

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

Foram calculadas porcentagens e médias com os desvios padrões das mesmas, sendo os resultados expressos, respectivamente, em %, (DP_%) e , (DP).

RESULTADOS

Do total de 100 pacientes brasileiros, 61 (61%, DP_%=4,87) são do gênero masculino e 39 (39%, DP_%=4,87) do gênero feminino. Em relação à faixa etária, a idade variou de 48 a 76 anos para o gênero masculino, sendo a média de 70,35 anos (DP=1,02) e para o gênero feminino a idade variou de 54 a 89 anos, sendo a média de 74,03 anos (DP=1,06).

Os resultados, a seguir, são apresentados conforme obtidos após realização das técnicas moleculares: extração de DNA genômico (nuclear e mitocondrial) e técnica da PCR, com posterior eletroforese em gel de agarose.

Extração do DNA genômico:

Foi possível a extração do DNA, à partir de leucócitos de sangue periférico, de todas as amostras do estudo (100%).

Técnica da PCR para amplificação do gene do citocromo b:

Realizada para se confirmar a presença ou não de DNA mitocondrial nas amostras. Foi possível a amplificação do gene do citocromo b, em um fragmento de 161 pb, confirmando-se a presença de DNA mitocondrial em todas as amostras do estudo (100%).

Técnica da PCR para amplificação do fragmento que abrange a região da deleção de 4977 pb:

Realizada para se verificar a presença ou não da deleção. Não foi identificado, em todas as amostras (100%), o fragmento de 373 pb que seria amplificado caso houvesse a deleção. Portanto, observou-se o fragmento de 5350 pb indicando que as amostras do estudo não apresentam a referida deleção.

Técnica da PCR para controle de amplificação:

Realizada como controle de amplificação da PCR, que abrange a região da deleção, a fim de se confirmar a presença ou não da deleção nas amostras pois, o produto desta PCR, um fragmento de 549 pb, se amplifica nos genomas mitocondriais normais, o que não ocorre nos deletados. Foi possível a amplificação do fragmento de 549 pb confirmando-se, portanto, a ausência da deleção de 4977 pb em todas as amostras do estudo (100%).

Os resultados relacionados à classificação da presbiacusia, de acordo com os critérios audiométricos, estão apresentados na Tabela 1.

DISCUSSÃO

Este estudo permitiu, pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), realizar a análise molecular do DNA mitocondrial a fim de investigar a frequência da deleção mtDNA⁴⁹⁷⁷ em pacientes brasileiros com presbiacusia.

Desde que o conceito de deficiência auditiva associada à idade foi introduzido no final do século XIX, extensivos estudos têm sido realizados para o diagnóstico etiológico, patológico, histológico e epidemiológico da presbiacusia e, embora seja comum em países industrializados, é rara em outros países podendo, essa diferença, ser atribuída a diferenças ambientais, dietéticas e fatores genéticos (2,9,10).

Uma vez que é impossível de se analisar a deleção comum do envelhecimento de amostras extraídas do osso temporal

de indivíduos vivos, alguns estudos têm utilizado a técnica da PCR para verificar a presença de deleções no DNA mitocondrial, não apenas em amostras arquivadas de osso temporal humano (2,10-12), mas também em leucócitos humanos (6,13), como realizado no presente estudo, mesmo podendo não refletir a quantidade de mitocôndrias existentes no tecido sensorial auditivo (6).

Em estudos realizados foram encontradas a deleção mtDNA⁴⁹⁷⁷ e a mutação mtDNA A3243G em pacientes japoneses com surdez sensorioneural, revelando que é possível a identificação de deleções e/ou mutações no DNA mitocondrial pela análise em leucócitos, encontrando, respectivamente, a frequência de 75% (45/60) (6) e 15% (3/20) (13) nos casos analisados.

Tabela 1: Distribuição dos resultados, em percentagens (%), de acordo com o gênero dos pacientes (N) relacionados à classificação da presbiacusia.

Classificação da Presbiacusia	Gênero				Total	
	Masculino (N)	%	Feminino (N)	%	Total	%
Sensorial	29	29%	9	9%	38	38%
Neural	16	16%	7	7%	23	23%
Metabólica	7	7%	12	12%	19	19%
Mista	8	8%	7	7%	15	15%
Cond. Coclear	1	1%	4	4%	5	5%
Total	61	61%	39	39%	100	100%

O número da amostra do presente estudo, 100 casos, foi muito superior aos estudos realizados tanto em cortes histológicos de cóclea humana ou de roedores como em leucócitos humanos, variando de 3 a 60 casos (2,6,7,12,13). A metodologia utilizada no presente estudo foi semelhante às descritas na literatura (6,7), permitindo a amplificação do DNA mitocondrial não-deletado e da região específica do gene do citocromo b, uma área altamente conservada do genoma mitocondrial atuando como um controle para verificar a presença de DNA mitocondrial nas amostras.

Mas, mesmo com uma casuística maior e metodologia rigorosamente semelhante aos estudos de referência (6,7) não foi encontrada a deleção mtDNA⁴⁹⁷⁷ em todas as amostras analisadas, diferentemente dos estudos revisados que encontraram a deleção em uma frequência de 47% a 66% dos casos, incluindo análises em cortes histológicos de cóclea e em leucócitos, conforme referido anteriormente (2,6,7,12,13). Exceção ao único estudo descrito (2) no qual os autores analisaram cortes histológicos arquivados de osso temporal de três pacientes com presbiacusia, encontrando um paciente sem a deleção mtDNA⁴⁹⁷⁷.

No presente estudo, os fenótipos dos pacientes com presbiacusia estão de acordo com a classificação de SCHUKNECHT et al. (1993) (4,5), seguindo-se os padrões da curva audiométrica. Mesmo a maioria tendo apresentado os tipos mais comuns sensorial, neural e metabólica, não foi estabelecida relação molecular nos diferentes fenótipos encontrados na amostra, apesar de os critérios de seleção dos pacientes e resultados fenotípicos do presente estudo terem sido semelhantes aos da literatura, nos quais foi determinada uma relação de hereditariedade, isto é, pacientes com os tipos sensorial ou estriar apresentaram a deleção, permitindo aos autores estabelecerem uma relação molecular com as alterações histopatológicas existentes nos vários tipos de presbiacusia encontrados (14,15).

As diferenças nos resultados moleculares obtidos no presente estudo poderiam ser explicadas por algumas razões que talvez justificassem o porque destes pacientes com presbiacusia não apresentarem a deleção: as diferentes classificações da presbiacusia, a sua heterogeneidade genética e o fato de a mesma ser um processo multifatorial influenciado por fatores hereditários e variáveis ambientais (7) além de, a composição étnica da população brasileira ser altamente heterogênea, resultando em diferentes índices de prevalência entre as regiões brasileiras, justificando, conforme descrito na literatura, que a presbiacusia faz parte de processos multifatoriais podendo ocorrer diferenças etiológicas entre diferentes sociedades (7,11,16).

Provavelmente, a susceptibilidade ao acúmulo de deleções mitocondriais varia entre indivíduos e entre

diferentes populações. Em algumas pessoas o acúmulo de deleções, durante o processo de envelhecimento, talvez possa ocorrer mais lentamente contribuindo, juntamente com outras alterações mutagênicas no DNA mitocondrial tais como as lesões induzidas pelos radicais livres, para a perda da produção bioenergética mitocondrial. Sendo assim, a quantidade de deleções e o limiar para a expressão das doenças mitocondriais podem variar entre indivíduos e populações (17).

Muitas deleções podem contribuir para a presbiacusia e a deleção mitocondrial mtDNA⁴⁹⁷⁷ pode ser apenas uma delas. A identificação de causas genéticas subjacentes da presbiacusia é fundamental para auxiliar no aconselhamento de famílias e para permitir reabilitação precoce tendo, como consequência, a inclusão e/ou reinclusão nas atividades sociais e profissionais, além de propiciar um convívio familiar digno a todos estes pacientes.

Há a necessidade de um estudo multicêntrico para se determinar a atual prevalência da deleção mtDNA⁴⁹⁷⁷ na população brasileira e, também, para investigar outras mutações que possam estar associadas ao envelhecimento e a presbiacusia.

CONCLUSÃO

A ausência da mutação del mtDNA⁴⁹⁷⁷, no genoma mitocondrial, não descarta a possibilidade da existência de mutações em outros genes nos pacientes com presbiacusia, o que sugere a necessidade de estudos posteriores.

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com o protocolo utilizado, é um método de fácil execução para rastreamento da deleção mitocondrial mtDNA⁴⁹⁷⁷ colaborando, portanto, para a investigação molecular da presbiacusia.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos pacientes que sem os seus consentimento e cooperação, este estudo não seria possível. Esta contribuição é extremamente importante para permitir a continuidade das pesquisas científicas a fim de proporcionar um futuro melhor aos brasileiros. Agradecemos a nossa amiga e tradutora Cecília Meneguette Ferreira, por seu considerável auxílio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 1992;1175-1212.

2. Seidman MD, Khan MJ, Bai UP, et al. The association of mitochondrial DNA deletions and cochlear pathology: a molecular biologic tool. *Laryngoscope* 1996; 106: 777-83.
3. Seidman MD, Ahmad N, Joshi D, Seidman J, Thawani S, Quirk WS. Age-related hearing loss and its association with reactive oxygen species and mitochondrial DNA damage. *Acta Otolaryngol* 2004; 552:16-24.
4. Schuknecht HF, Gacek MC. Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993; 102:1-16.
5. Chobaut JC, Manière C. Presbycusis. *EMC-ORL* 1995; 20-185-C-10:1-7.
6. Ueda N, Oshima T, Ikeda K, Abe K, Aoki M, Takasaka T. Mitochondrial DNA deletions a predisposing cause for sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1998; 108, 580-84.
7. Bai U, Seidman MD, Hinojosa R, Quirk WS. Mitochondrial DNA deletions associated with aging and possibly presbycusis: a human archival temporal bone study. *Am J Otol* 1997; 18: 449-53.
8. Andrews RM, Kubacha I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999; 23:147.
9. Seidman MD, Ahmad N, Bai U. Molecular mechanisms of age-related hearing loss. *Ageing Res Rev* 2002; 331: 43.
10. Han W, Han D, Jiang S. Mitochondrial DNA 4977 deletions associated with human presbycusis. *Zhonghua Er Bi Yan Za Zhi* 2000; 35:416-19.
11. Keithley E, Harris B, Desai K, Linthicum F, Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial cytochrome oxidase immunolabeling in aged human temporal bones. *Hear Res* 2001; 157:93-9.
12. Dai P, Yang W, Jiang S, Gu R, Yuan H, Han D, Guo W, Cao J. Correlation of cochlear blood supply with mitochondrial DNA common deletion in presbycusis. *Acta Otolaryngol* 2004; 124:130-36.
13. Oshima T, Ueda N, Ikeda K, Abe K, Takasaka T. Bilateral sensorineural hearing loss associated with the point mutation in the mitochondrial genome. *Laryngoscope* 1996; 106:43-8.
14. Gates GA, Couropmitree NN, Myers RH. Genetic Associations in Age-Related Hearing Thresholds. *Arch Otolaryngol Head Neck Sur.* 1999; 125:654-59.
15. Ohlemiller KK. Age-related hearing loss: the status of Schuknechts typology. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 12:439-43.
16. Keithley EM, Ryan AF, Feldman ML. Cochlear degeneration in aged rats of four strains. *Hear Res* 1992; 59, 171-178.
17. Zhang C, Baumer A, Maxwell RJ, Linnane AW, Nagley P. Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual. *FEBS Lett* 1992; 297:34-8.