**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

SIMONE DA COSTA E SILVA CARVALHO

**ESTUDO DO PAPEL DO GENE SLC26A4 NA SURDEZ NEUROSSENSORIAL
NÃO-SINDRÔMICA PRÉ-LINGUAL EM UMA SÉRIE DE CASOS NO SUDESTE
BRASILEIRO**

Ribeirão Preto

2015

SIMONE DA COSTA E SILVA CARVALHO

Estudo do papel do gene SLC26A4 na surdez neurossensorial não-sindrômica pré-lingual em uma série de casos no Sudeste brasileiro

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Carvalho, Simone da Costa e Silva.

Estudo do papel do gene SLC26A4 na surdez neurossensorial não-sindrômica pré-lingual em uma série de casos no Sudeste brasileiro / Simone da Costa e Silva Carvalho; Orientador Ferraz, Victor Evangelista de Faria. - Ribeirão Preto, 2015.

108 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2015.

1. Surdez hereditária. 2. GJB2. 3. SLC26A4. 4. Diagnóstico molecular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CARVALHO, Simone da Costa e Silva

Estudo do papel do gene SLC26A4 na surdez neurosensorial não-sindrômica pré-lingual em uma série de casos no Sudeste brasileiro

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Victor Evangelista de
Faria Ferraz.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*A Deus pela oportunidade, aos meus pais pela
possibilidade e aos demais pela continuidade.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me trazido até aqui, sempre caminhando ao meu lado e me iluminando em cada passo. Agradeço de forma imensurável aos meus pais pelo apoio incondicional naqueles momentos de sucesso e insucesso e que, mesmo lidando com a distância dos filhos, sempre torceram e apoiaram sentimental e financeiramente em todos os momentos de nossas jornadas. Sem vocês, eu poderia fazer todo o esforço do mundo, mas jamais seria hoje Mestre pela USP.

Agradeço ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em nome dos professores Ademilson Espencer Egea Soares e Silvana Giuliatti e das funcionárias Silvia Consiglieri, Ana Claudia Souza e, em especial, à Susie Adriana Ribeiro Penha Nalon, que me ajudou desde minha primeira ligação cheia de dúvidas a respeito da seleção ao departamento, meu muito obrigada por tudo.

Sou carinhosa e respeitosamente grata aos meus professores orientadores Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz e Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, que me acolheram e acreditaram no meu trabalho. Se eu pudesse desejar algo de bom a todos os pós-graduandos, seria que tivessem a oportunidade de serem orientados por profissionais como estes.

Agradeço a todos do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática (LGMB) e aos profissionais da Genética Médica do HC-FMRP, em especial à Greice Molfetta, Thaís dos Anjos, Luíza Araújo, Jéssica Praça, Adriana Marques, Bruna Muys, Carlos Henrique Grangeiro e Clarissa Picanço, por toda a orientação e ajuda no desenvolvimento do meu mestrado e trabalhos a ele relacionados, vocês foram peças-chave para o meu sucesso no mestrado.

As amizades que fiz aqui, não há o que comentar. Foram muitos os momentos de dificuldade e sem vocês por perto, pra chorar junto ou dar aquela injeção de ânimo, a jornada teria sido triplamente difícil. Cada um vindo de um lugar, fizemos uma família inigualavelmente unida aqui. João Paulo, Leila Rodrigues, Eduarda Morgana, Natália Cagnin, Ayling Ng, Melina Vaz, Jaqueline Koser e Isabela Ichihara, agradeço a Deus por tê-los em minha vida.

Aos amigos da genética, Alexandra Galvão, Tatiana Mozer, Milena Chales, Fernanda Bueno, Larissa Guimarães, Lara Zapata, Juliana Josahkian, Carlos Magno, Jorge Navarrete, Elius Paz, Andrés Felipe, Ádamo Davi, Leonardo Franchi, Sílvio Avelino, Verônica Santana, Luiz Augusto Júnior, Rômulo Moraes, Júlia Fonseca e demais, pela amizade carinhosa, meu muito obrigada.

Aos professores que me orientaram no Programa de Aperfeiçoamento no Ensino (PAE), Prof. Tiago Campos Pereira e Profa. Nilce Maria Martinez Rossi, durante o ano de 2014. Aprendi muito com vocês e agradeço a engrandecedora vivência em sala de aula.

Agradeço a toda minha família e amigos de Teresina-PI, que sempre me recebem de forma calorosa, com muito carinho e orgulho naqueles momentos em que volto pra casa. Um agradecimento especial aos meus irmãos Luana Régia, Fernando Carvalho e Elzi Sanção, amo muito vocês, muito obrigada por tudo. Vocês sempre saudosos e acolhedores, sempre fizeram da distância e da saudade, algo pequeno diante do que construo aqui.

Por fim, agradeço também, aos professores da banca examinadora, por aceitarem o convite e por se disponibilizarem a contribuir com o engrandecimento do meu trabalho. Ao CNPQ pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa durante estes dois anos de mestrado. À FAEPA pelo apoio financeiro para a participação de eventos externos. À Fundação Hemocentro pela infraestrutura oferecida, e a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste estudo.

RESUMO

CARVALHO, S. C. S. **Estudo do papel do gene SLC26A4 na surdez neurosensorial não-sindrômica pré-lingual em uma série de casos no Sudeste brasileiro.** 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – São Paulo, 2015.

A audição representa a principal fonte para o aprendizado da fala e linguagem durante a infância e a surdez e a privação de estímulos auditivos pode implicar em dificuldades emocionais e sociais àqueles indivíduos afetados. Aproximadamente 360 milhões de pessoas sofrem de perda auditiva no mundo, o que corresponde a 5,3% da população mundial. A surdez pode se desenvolver em decorrência de causas genéticas (hereditárias), não-genéticas e ambientais. As infecções pré-natais e a exposição a ruídos constituem as causas ambientais mais comuns. Já a surdez hereditária, constitui o transtorno neurosensorial mais comum em humanos, com uma prevalência de 1:1000 nascidos vivos. Mais de 70% dos casos de surdez hereditária constituem casos não-sindrômicos, destes cerca de 70% cursam com surdez congênita ou pré-lingual. Na maioria dos casos, a perda auditiva hereditária é neurosensorial, heterogênea, com diferentes padrões de herança e com uma grande quantidade de genes envolvidos. Estudos têm demonstrado o importante papel dos genes GJB2, GJB6 e SLC26A4 na fisiologia do ouvido interno e alterações nestes genes têm sido relatadas como causa da surdez hereditária. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar a base genética e o papel do gene SLC26A4 na perda auditiva neurosensorial (PANS) não-sindrômica pré-lingual em pacientes atendidos pelo serviço de Genética Médica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Para isso, uma série de 88 casos foi investigada quanto a características clínicas e moleculares. A amostra abrangeu indivíduos de ambos os sexos, com idade de 2 a 63 anos, provenientes de 88 famílias diferentes, assistidos durante o período de 2003 a 2013. As amostras foram triadas pela técnica de *High Resolution Melting* (HRM) e em seguida levadas para o sequenciamento para caracterização das alterações. Na série de casos estudada, 23,9% (21/88) dos pacientes portadores de surdez neurosensorial não-sindrômica pré-lingual evidenciaram alterações nos genes GJB2, GJB6 e SLC26A4 sugeridas como patogênicas. A prevalência de alterações no gene SLC26A4 foi de 28,4% (25/88), não relacionada à Síndrome do Aqueduto Vestibular Alargado (SAVA). Dentre as 11 alterações encontradas neste gene, três constituem mutações não descritas: p.Gly139Arg, p.Ile254Val, p.Asn382Lys. Os genótipos mais frequentes neste estudo foram a c.35delG/c.35delG no gene GJB2 (5/88), a dupla heterozigose com o gene GJB6 c.35delG/del(GJB6-D13S1854) (3,4%) e chr7:g.107301238C>G/wt no gene SLC26A4 (10,2%). Entretanto, apenas 19,3% dos indivíduos apresentaram genótipos sugeridos como responsáveis pelo fenótipo estudado. Alterações particulares no gene SLC26A4 podem sugerir a explicação para a surdez genética para aproximadamente 9,1% destes casos. Destes, cinco casos de heterozigose preditas como patogênicas (p.Ile300Leu; p.Asn324Tyr e p.Asn382Lys), dois casos de heterozigose composta (chr7:g.107301201T>C/chr7:g.107301238C>G e chr7:g.107301238C>G/p.Gly139Arg) e um caso de dupla heterozigose com GJB2 (chr7:g.107301238C>G/c.35delG). Isto ressalta a importância do gene SLC26A4 para o diagnóstico molecular de surdez hereditária e reforça a sua potencial contribuição para o processo de aconselhamento genético. Entretanto, nossos dados sugerem a necessidade de testes funcionais a fim de elucidar o papel destas alterações para o estabelecimento do fenótipo, como também, a presença de outros genes ou regiões envolvidas naqueles casos em que mutações monoalélicas não foram suficientes para justificar o fenótipo.

Palavras-chave: Surdez hereditária. GJB2. SLC26A4. Diagnóstico molecular.

ABSTRACT

CARVALHO, S. C. S. **Study of the role of SLC26A4 gene in non-syndromic sensorineural prelingual deafness in a series of cases in Southeastern Brazil**. 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – São Paulo, 2015.

The hearing is the main source for learning speech and language during childhood and deafness and deprivation of auditory stimuli can result in emotional and social difficulties to those affected individuals. Approximately 360 million people suffer from hearing loss worldwide which corresponds to 5.3% of the world population. Deafness may develop due to genetic (hereditary), non-genetic and environmental causes. Prenatal infections and exposure to noise are the most common environmental causes. Hereditary deafness is the most common sensorineural disorder in humans, with a prevalence of 1:1000 live births. More than 70% of hereditary deafness cases are non-syndromic, about 70% of these occur with congenital or prelingual deafness. In most cases, inherited sensorineural hearing loss is heterogeneous, with different patterns of inheritance and with a large number of genes involved. Studies have shown the important role of genes GJB2, GJB6 and SLC26A4 in the physiology of the inner ear and changes in these genes have been reported as cause of hereditary hearing loss. Thus, the aim of this study was to investigate the genetic basis and the role of SLC26A4 gene in non-syndromic prelingual sensorineural hearing loss (SNHL) in patients enrolled in the Medical Genetics Service of Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. For this, a series of 88 cases were submitted to a clinical and molecular investigation. The sample consisted of individuals of both sexes, aged 2-63 years from 88 different families, assisted during the period 2003-2013. The samples were screened by the technique of High Resolution Melting (HRM) and then taken for sequencing to characterize the mutations. In the series of cases studied, 23.9% (21/88) of patients with non-syndromic prelingual sensorineural deafness showed variants in genes GJB2, GJB6 and SLC26A4 suggested as pathogenic. The prevalence of mutations in the SLC26A4 gene was 28.4% (25/88), not related to non-syndromic EVA. Among the 11 mutations found in this gene, three are reported as novel mutations: p.Gly139Arg, p.Ile254Val, p.Asn382Lys. The most frequent genotypes found in this study were the c.35delG/c.35delG in GJB2 gene (5/88), the double heterozygosity with GJB6 gene c.35delG/del(GJB6-D13S1854) (3,4%) and chr7:g.107301238C>G/wt in the SLC26A4 gene (10,2%). However, only 19.3% of subjects presented genotypes suggested as responsible for the studied phenotype. Particular mutations in the SLC26A4 gene may suggest the explanation for the genetic deafness to approximately 9.1% of these cases. Of these, five cases of heterozygosity predicted as pathogenic (p.Ile300Leu; p.Asn324Tyr and p.Asn382Lys), two cases of compound heterozygosity (chr7:g.107301201T>C/chr7:g.107301238C>G and chr7:g.107301238C>G/p.Gly139Arg) and one case of double heterozygosity with GJB2 gene (chr7:g.107301238C>G/c.35delG). Those data highlights the importance of the SLC26A4 gene for molecular diagnosis of hereditary hearing loss and give strength to its potential contribution to the genetic counseling process. However, our data suggest the need for functional tests in order to elucidate the role of these changes to the phenotype, as well as the presence of other genes or regions involved in those cases that monoallelic mutations were not sufficient to justify the phenotype.

Keywords: Hereditary hearing loss. GJB2. SLC26A4. Molecular diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelos topológicos propostos para a proteína pendrina humana. (A) Modelo de 12 domínios transmembrana (TM) descritos pela *Pendred/BOR homepage* (Chang et al. (2015) utilizando o programa MEMSAT. (b) Modelo contendo 15 domínios TM, proposto por Dossena et al. (2009). Os domínios TM são evidenciados como trechos de aminoácidos que cruzam a membrana (representada pela faixa central em cinza). As duas hélices anfipáticas estão representadas pela cor vermelha, o domínio STAS está representado em azul, a assinatura de consenso para o transporte de íons sulfato está indicada pela cor verde e a sequência de repetição de glicinas está indicada em amarelo. FONTE: DOSSENA et al. (2009). 34

Figura 2. Conservação evolutiva das variantes identificadas através do seqüenciamento dos 21 éxons do gene SLC26A4 pela metodologia de Sanger. Alinhamento realizado dentre 8 seqüências da proteína de mamíferos e aves, utilizando o programa ClustalW2 (EMBL-EBI) baseado nas seguintes seqüências referência, respectivamente: *Homo sapiens* (NP_000432.1), *Pan troglodytes* (XP_519308.2), *Macaca mulatta* (XP_001094049.1), *Bos taurus* (XP_010802535.1), *Canis lupus familiaris* (XP_540382.3), *Rattus norvegicus* (NP_062087.1), *Mus musculus* (NP_035997.1) e *Gallus gallus* (XP_425419.3). Os aminoácidos conservados estão representados pela cor vermelha e a cor verde, representa a mutação de um aminoácido não conservado evolutivamente (p.V609G). 57

Figura 3. Heterozigoto composto chr7:g.107301201T>C/chr7:g.107301238C>G. (A) Padrão de curvas obtido através da análise por HRM e (B) cromatograma obtido por seqüenciamento Sanger, evidenciando a troca de um T→C na posição genômica 107301201T e (C) C→G na posição genômica 107301238, ambas no éxon 1 do gene SLC26A4. 65

Figura 4. Cromatogramas evidenciando as alterações encontradas em configuração *trans*. A observação é de um genótipo hemizigoto uma vez que cada clone foi derivado da transfecção de apenas um cromossomo na bactéria. Seis clones foram levados ao seqüenciamento e três apresentaram apenas a mutação chr7:g.107301201T>C (A) e três apresentaram somente a mutação chr7:g.107301238C>G (B) provando que as duas alterações estão em *trans*. 65

Figura 5. Seqüência nucleotídica do éxon 1 do gene SLC26A4, evidenciando o nucleotídeo “T”, na posição genômica 107301201 (NM_000441.1 - GRCh37/hg19), como conservado quando comparado com 8 outras espécies. O nucleotídeo mutado está indicado pelo retângulo de cor azul.

Imagem proveniente do BLAST da região contendo a mutação no gene SLC26A4, através do *UCSC Genome Browser website*. 66

Figura 6. Seqüência nucleotídica do éxon 1 do gene SLC26A4, evidenciando o nucleotídeo “C” na posição genômica 107301238 (NM_000441.1 - GRCh37/hg19) como não conservado, quando comparado com 8 outras espécies. O nucleotídeo mutado está indicado pelo retângulo de cor azul. Imagem proveniente do BLAST da região contendo a mutação no gene SLC26A4, através do *UCSC Genome Browser website*. 68

Figura 7. Mutação p.Gly139Arg. (A) Padrão de curvas obtido através da análise por HRM e (B) cromatograma obtido por seqüenciamento Sanger, evidenciando a troca de um G→A causando uma troca no aminoácido 139 (Gly→Arg) codificado no éxon 4 do gene SLC26A4. 71

Figura 8. p.G139R. Estrutura química dos aminoácidos selvagem glicina (A) mutado para uma arginina (B) na posição 139 do gene SLC26A4. A cadeia principal, igual para todos os aminoácidos está em vermelho. Em preto, a cadeia lateral, específica para cada aminoácido. Imagem proveniente da análise com a ferramenta *Project HOPE server*. 72

Figura 9. Mutação p.Ile254Val. (A) Padrão de curvas obtido através da análise por HRM e (B) cromatograma obtido por seqüenciamento Sanger, evidenciando a troca de um A→G causando uma troca no aminoácido 254 (Ile→Val) codificado no éxon 6 do gene SLC26A4. 74

Figura 10. p.I254V. Estrutura química dos aminoácidos selvagem isoleucina (A) mutado para uma valina (B) na posição 254 do gene SLC26A4. A cadeia principal, igual para todos os aminoácidos está em vermelho. Em preto, a cadeia lateral, específica para cada aminoácido. Imagem proveniente da análise com a ferramenta *Project HOPE server*. 74

Figura 11. p.N382K. Estrutura química dos aminoácidos selvagem asparagina (A) mutado para uma lisina (B) na posição 382 do gene SLC26A4. A cadeia principal, igual para todos os aminoácidos está em vermelho. Em preto, a cadeia lateral, específica para cada aminoácido. Imagem proveniente da análise com a ferramenta *Project HOPE server*. 77

Figura 12. Mutação p.Asn382Lys. (A) Padrão de curvas obtido através da análise por HRM e (B) cromatograma obtido por seqüenciamento Sanger, evidenciando a troca de um C→G causando uma troca no aminoácido 382 (Asn→Lys) codificado no éxon 9 do gene SLC26A4. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Seqüência de <i>Primers</i> para análise de mutações por HRM no gene SLC26A4.	43
Tabela 2 – Mix utilizado para a padronização de cada par de <i>primer</i> .	45
Tabela 3 – Ciclo utilizado para a obtenção dos amplicons.	45
Tabela 4 – Caracterização clínica da série de casos estudada (n=88).	51
Tabela 5 – Genótipos e mutações encontrados nos genes GJB2, GJB6, MT-RNR1 e SLC26A4 na série de casos estudada de pacientes portadores de surdez neurossensorial não-sindrômica pré-lingual hereditária.	53
Tabela 6 – Predição de patogenicidade das alterações moleculares encontradas por seqüenciamento das regiões codificantes dos genes GJB2 e SLC26A4.	54
Tabela 7 – Análise da funcionalidade das mutações chr7:g.107301201T>C e chr7:g.107301238C>G através das ferramentas FunSeq e RegulomeDB.	58
Tabela 8 – Genótipos considerados como patogênicos nos genes GJB2, GJB6 e SLC26A4 após as análises <i>in silico</i> de patogenicidade, sugeridos como responsáveis pelo estabelecimento do fenótipo.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

13q11–q12	<i>locus</i> que engloba a banda 11 do braço longo à banda 12 do braço longo do cromossomo 13
7q22-q31.1	<i>locus</i> que engloba a banda 22 do braço longo à banda 31 sub-banda 1 do braço longo do cromossomo 7
5'-UTR	do inglês, <i>5' untranslated region</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BOR	Síndrome Branquio-oto-renal
BRCA1	gene, do inglês, <i>breast cancer 1, early onset</i>
BRCA2	gene, do inglês, <i>breast cancer 2, early onset</i>
Ca ²⁺	Íons Cálcio
CAT	gene, do inglês, <i>catalase</i>
CDH23	gene, do inglês, <i>cadherin-related 23</i>
CFTR	gene, do inglês, <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette sub-family C, member 7)</i>
Cl ⁻	Íon Cloreto
CMG	Centro de Medicina Genômica
CMV	Citomegalovírus
CTCF	do inglês, <i>CCCTC-binding factor (zinc finger protein)</i>
dbSNP	do inglês, <i>The Single Nucleotide Polymorphism database</i>
DFNA	<i>locus</i> autossômico dominante, do inglês, <i>DeaFNess A</i>
DFNA3	<i>locus</i> autossômico dominante 3, do inglês, <i>DeaFNess A3</i>
DFNA3B	<i>locus</i> autossômico dominante 3B, do inglês, <i>DeaFNess A3B</i>
DFNB	<i>locus</i> autossômico recessivo, do inglês, <i>DeaFNess B</i>
DFNB1	<i>locus</i> autossômico recessivo 1, do inglês, <i>DeaFNess B1</i>
DFNB1A	<i>locus</i> autossômico recessivo 1A do inglês, <i>DeaFNess B1A</i>
DFNB1B	<i>locus</i> autossômico recessivo 1B do inglês, <i>DeaFNess B1B</i>
DFNB4	<i>locus</i> B4 do inglês, <i>DeaFNess B4</i>
DFNX	<i>locus</i> ligado ao cromossomo X, do inglês, <i>DeaFNess X</i>
DHS	Sítio de hipersensibilidade à DNase
DNA	Ácido desoxiribonucléico

dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
DPAC	Disfunção do Processamento Auditivo Central
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELF1	do inglês, <i>E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)</i>
eQTL	do inglês, <i>expression Quantitative Trait Loci</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EVA	Alargamento do aqueduto vestibular, do inglês, <i>enlargement of vestibular aqueduct</i>
Ex	Éxon
FBS1	Sítio de ligação do gene FOXI1
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FOXI1	gene, do inglês, <i>forkhead box I1</i>
GJ	Junções comunicantes do tipo <i>gap</i> , do inglês, <i>gap junction</i>
GJB2	gene, do inglês, <i>gap junction protein, beta 2</i>
GJB6	gene, do inglês, <i>gap junction protein, beta 6</i>
GRHL2	gene, do inglês, <i>grainyhead-like 2 (Drosophila)</i>
GSTM1	gene, do inglês, <i>glutathione s-transferase, mu-1</i>
GWAS	do inglês, <i>genome-wide association study</i>
H ₂ O	Água
HC	Hospital das Clínicas
HCO ₃ ⁻	Íon Bicarbonato
HCOO ⁻	Íon Formiato
HGMD	do inglês, <i>Human Gene Mutation Database</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HRM	do inglês, <i>High Resolution Melting</i>
I ⁻	Íon Iodeto
LB	Meio Luria Bertani
K ⁺	Íon potássio
KCNE1	gene, do inglês, <i>potassium channel, voltage gated subfamily E regulatory beta subunit 1</i>
MD	Displasia de Mondini, do inglês, <i>Mondini dysplasia</i>
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mRNA	RNA mensageiro

mtDNA	DNA mitocondrial
MT-RNR1	gene, do inglês, <i>mitochondrially encoded 12S RNA</i>
MYO15A	gene, do inglês, <i>myosin XVA</i>
MYO7A	gene, do inglês, <i>myosin XVA</i>
NGS	do inglês, <i>Next Generation Sequencing</i>
OMIM	do ingles, <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
ORF	do inglês, <i>Open Reading Frame</i>
OTOF	gene, do inglês, <i>otoferlin</i>
PANS	Perda Auditiva Neurosensorial
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
RAD21	do inglês, <i>RAD21 homolog (S. pombe)</i>
REST	do inglês, <i>RE1-silencing transcription factor</i>
RFLP	do inglês, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rRNA	RNA ribossômico
SAVA	Síndrome do Aqueduto Vestibular Alargado
SLC26A4	gene, do inglês, <i>solute carrier family 26 (anion exchanger), member 4</i>
SPD	Síndrome de Pendred
T.a.	Temperatura de <i>annealing</i>
T.A.	Temperatura ambiente
TM	Transmembrana, de “domínio transmembrana”
TMC1	gene, do inglês, <i>transmembrane channel-like 1</i>
TMIE	gene, do inglês, <i>transmembrane inner ear</i>
TMPRSS3	gene, do inglês, <i>transmembrane protease, serine 3</i>
TORCH	Referente aos microorganismos associados a doenças causadoras de surdez, são elas: toxoplasmose, rubéola, citomegalovirose e herpes.
tRNA	RNA transportador
UCSC	Universidade da Califórnia em Santa Cruz
USP	Universidade de São Paulo
wt	do inglês, <i>wild type</i>
ZEB1	do inglês, <i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

'	Minutos
''	Segundos
%	Porcento
µg	Microgramas
µL	Microlitro
µM	Micromolar
∞	Infinito
°C	Grau Célsio
Ω	Resistência elétrica
dB	Decibéis
F	em “25 F”, Força
g	Força centrífuga de gravidade, em “centrifugação a 2000g”
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
mL	Mililitro
mm	milímetro
mM	Milimolar
nº	Número
ng	Nanogramas
nM	Nanomolar
pb	Pares de bases
rpm	Rotações por minuto
S	em 16S, 30S, por exemplo. “S” constitui a unidade de sedimentação ou densidade
V	Voltagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Surdez	19
1.2 Fatores de risco	20
1.3 Causas	22
1.4 Surdez Hereditária	25
1.5 Principais genes relacionados à surdez hereditária	27
1.6 O papel do gene SLC26A4 na surdez hereditária	32
1.7 Ferramentas de análise molecular no diagnóstico molecular da surdez hereditária	37
2 OBJETIVOS	40
2.1. Objetivo geral	40
2.2 Objetivos específicos	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Caracterização das amostras	41
3.2 Aspectos Éticos	42
3.3 Extração de DNA	42
3.4 Padronização de <i>Primers</i> para análise do gene SLC26A4	42
3.5 <i>High Resolution Melting</i> (HRM)	45
3.6 Sequenciamento de amostras triadas	46
3.7 Ensaio de clonagem no vetor pCR®2.1-TOPO® TA	47
3.8 Análises <i>in silico</i>	48
4.1 Caracterização clínica da série de casos estudada	50
4.2 Análise Molecular	52
4.3 Análise molecular para os genes GJB2, GJB6 e MT-RNR1	61
4.4 Análise molecular do gene SLC26A4	63
<u>4.4.1 chr7:g.107301201T>C</u>	64
<u>4.4.2 chr7:g.107301238C>G</u>	67
<u>4.4.3 p.Gly5Gly</u>	70
<u>4.4.4 p.Gly139Arg</u>	71
<u>4.4.5 p.Ala189Ser</u>	73
<u>4.4.6 p.Ile254Val</u>	73
<u>4.4.7 p.Ile300Leu</u>	75
<u>4.4.8 p.Asn324Tyr</u>	76
<u>4.4.9 p.Asn382Lys</u>	77
<u>4.4.10 p.Leu597Ser</u>	78
<u>4.4.11 p.Val609Gly</u>	80

4.5 Considerações finais	82
5 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	86
APÊNDICE A	98
APÊNDICE B	104
ANEXO A	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 Surdez

A audição representa a principal fonte para o aprendizado da fala e linguagem durante a infância. A surdez e a privação de estímulos auditivos durante esta fase, período importante para o desenvolvimento, tornam as crianças mais vulneráveis a problemas relacionados à fala e conseqüentemente àqueles de cunho emocional e social (DA SILVA; QUEIROS; LIMA, 2006). A surdez considerada como incapacitante é aquela em que há uma perda acima de 40 e 30 decibéis em adultos e crianças, respectivamente, e trata-se de um distúrbio comum dentre pessoas idosas que afeta cerca de um terço da população acima dos 65 anos de idade, quase sempre relacionados a fatores genéticos e ambientais. Aproximadamente 360 milhões de pessoas sofrem de perda auditiva no mundo, o que corresponde a 5,3% da população mundial. Destes, cerca de 328 milhões são adultos, em sua maioria homens (55,8%), e cerca de 32 milhões são crianças, que vivem principalmente em países de média a baixa renda (WHO, 2015).

A perda auditiva pode ser caracterizada de acordo com o tipo de estrutura do ouvido afetada, em como se deu seu início e quanto à sua gravidade. Quanto ao tipo, é dita surdez condutiva quando existem anormalidades na orelha externa e/ou nos ossículos do ouvido médio (martelo, bigorna e estribo). Já a perda auditiva neurossensorial (PANS), o tipo mais comum, é resultante da perturbação do funcionamento de estruturas do ouvido interno, como a cóclea, e constitui a condição neurossensorial mais prevalente em humanos. A surdez pode ser do tipo mista quando envolve a combinação das formas condutiva e neurossensorial. Pode haver também a Disfunção do Processamento Auditivo Central (DPAC), que resulta de danos ou disfunção do VIII nervo cranial (nervo vestibulo-coclear), tronco ou córtex cerebral (SMITH; BALE JR; WHITE, 2005; SMITH et al., 2014).

Quanto ao início, a surdez pode ser classificada em pré-lingual ou pós-lingual. Considera-se pré-lingual quando apresenta-se antes do início normal da fala. Desta forma, toda surdez congênita é do tipo pré-lingual, mas nem toda

surdez pré-lingual será necessariamente congênita. A surdez pós-lingual por sua vez, pode ser definida como aquela que tem ocorrência após o desenvolvimento normal da fala. Já a gravidade da perda auditiva, pode ser classificada de acordo com a medição dos níveis auditivos em decibéis (dB). A gravidade é classificada como leve quando os limiares auditivos são detectados entre 26-40 dB, moderada com limiares entre 41-55 dB, moderadamente severa quando 56-70 dB, severa (71-90 dB) e profunda (90 dB). A surdez pode ainda ser classificada como estável ou progressiva, neste ultimo caso, quando há a progressão no grau de surdez com o passar do tempo (SMITH; BALE JR; WHITE, 2005; SMITH et al., 2014; LOCHER et al., 2015).

1.2 Fatores de risco

A perda auditiva pode ser causada por diversas condições ambientais com exposição ainda no período da gravidez ou mesmo após o nascimento. Isto pode levar ao comprometimento do desenvolvimento da fala, linguagem, bem como habilidades cognitivas essenciais durante a infância. Aproximadamente um em cada 500 recém-nascidos apresenta perda auditiva, o que faz da surdez a condição de maior incidência ao nascimento. Em algumas populações, a incidência pode ser maior, dependendo da exposição a diferentes fatores de risco (KARACA et al., 2014). Dentre tais fatores de risco, aqueles mais relatados são: infecções intra-uterinas, hiperbilirrubinemia, prematuridade (<35 semanas), baixo peso ao nascer (<1.500g), otites de recorrência, uso de medicação ototóxica e presença de síndromes associadas (BIELECKI; HORBULEWICZ; WOLAN, 2011). Consanguinidade e casos de surdez na família são também fatores importantes no estudo e caracterização da surdez.

A associação dos altos níveis séricos de bilirrubina com o estabelecimento da PANS teve origem a partir da encefalopatia relacionada à bilirrubina, acompanhada de casos de surdez. Em estudos com recém-nascidos, os níveis séricos de bilirrubina aumentados foram associados a um atraso nas respostas aos

potenciais auditivos do tronco cerebral, indicando mudanças nas vias auditivas ascendentes que retornavam ao normal quando os níveis séricos de bilirrubina retornavam aos níveis normais (DE VRIES, et al., 1987; MARLOW; HUNT; MARLOW, 2000). Já a prematuridade, constitui um fator de risco pois os períodos finais da gestação (22^a à 33^a semana) são cruciais para o rápido desenvolvimento auditivo fetal. Além disso, vários mecanismos etiológicos relacionados à prematuridade têm sido relatados, tais como a própria hiperbilirrubinemia, o baixo peso decorrente do nascimento precoce, a toxicidade induzida por drogas, injúria hipóxica no tronco cerebral (pelo eventual uso de ventilação mecânica) bem como o trauma acústico decorrente das condições a que o pré-termo é submetido (MARLOW; HUNT; MARLOW, 2000).

O uso de algumas drogas ototóxicas também é considerado um fator de risco para a surdez, pois podem resultar em uma rápida e profunda perda da função coclear. Isto ocorre porque fisiologicamente, após a administração de antibióticos aminoglicosídeos, por exemplo, as células ciliadas do ouvido interno (assim como as células tubulares proximais no rim) retêm preferencialmente a droga. Os aminoglicosídeos (gentamicina, por exemplo) atuam bloqueando permanente os canais e assim abolem a transdução de sinais dentre as células ciliadas. Esta classe de antibióticos aumenta rapidamente os níveis intracelulares de Ca^{2+} e espécies reativas de oxigênio no ouvido interno levando à disfunção de proteínas ligadoras de cálcio e da organização citoesquelética, dando início a uma variedade de processos relacionados à morte celular (MULHERAN; HARPUR, 1998; DAI et al., 2006; LI; WANG; STEYGER, 2011).

Já as otites de recorrência estão relacionadas ao desenvolvimento da surdez dos tipos condutiva e neurosensorial e podem resultar em efeitos a longo prazo como impacto na linguagem (atraso na fala) e no processo educacional da criança afetada. Tais infecções podem promover danos nos ouvidos médio e interno. Pode haver a perfuração da membrana timpânica, fixação ou perda de continuidade na cadeia ossicular, bem como o acúmulo de fluidos ou partículas semi-sólidas na cavidade do ouvido médio. Já os danos ao ouvido interno, podem ocorrer em decorrência da penetração de agentes tóxicos provenientes do ouvido médio através da janela oval, destruição da estrutura óssea do ouvido interno e conseqüente exposição ao microambiente de infecção presente no ouvido médio.

Isto pode resultar em labirintite bem como em traumas acústicos e mecânicos resultantes da manipulação da cadeia ossicular decorrentes do tratamento do ouvido médio (LUNTZ et al., 2013; ELIÇORA et al., 2015; YEHUDAI; MOST; LUNTZ. 2015).

Já consanguinidade entre os pais e a presença de casos de surdez na família constituem fatores relacionados à surdez hereditária. A consanguinidade está associada principalmente ao aumento do risco para doenças de herança autossômica recessiva, principal forma de herança na surdez hereditária (KHABORI; PATTON, 2008). Os casamentos consangüíneos eram mais freqüentes no passado, principalmente aqueles entre primos de primeiro e segundo grau, porém ainda permanecem bem freqüentes nos dias atuais. Manzoli et al. (2013) evidenciaram uma prevalência de 52,2% de casamentos consangüíneos em sua série de casos de pacientes com surdez. Assim, as gerações subseqüentes apresentam maior risco para o desenvolvimento de doenças hereditárias, não apenas surdez, como também câncer, doenças cardíacas, gastrointestinais, hipertensão e diabetes mellitus (GIROTTO et al., 2014).

1.3 Causas

A surdez pode se desenvolver em decorrência de causas genéticas (hereditárias), não-genéticas e ambientais. Como causas ambientais, existem aquelas adquiridas como as infecções pré-natais compreendidas principalmente pelo microorganismos TORCH: toxoplasmose, rubéola, citomegalovirose e herpes, que constituem causas ambientais comuns de surdez em crianças (SMITH et al., 2014). As infecções pós-natais também podem contribuir de forma importante para a perda auditiva tais como infecções bacterianas, particularmente meningite causada por *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, ou *Streptococcus pneumoniae*, o que não descarta o papel de outros organismos causadores de meningite bacteriana no estabelecimento da surdez. A meningite bacteriana é menos freqüente que a viral, embora mais severa, e resulta em óbito de 2 a 16%

dos casos ou em complicações neurossensoriais e neurológicas (WIENER-VACHER; OBEID; ABOU-ELEW, 2012).

As bactérias causadoras da meningite se espalham do espaço subaracnóideo até o ouvido interno através do aqueduto coclear, ao longo do VIII nervo ou veias da barreira sangue-labirinto, induzindo uma labirintite supurativa. Como resultado, tanto a barreira quanto as células ciliadas são danificadas e os neurônios do nervo coclear entram em apoptose. Ainda no ouvido interno, as bactérias iniciam um processo de multiplicação descontrolada e após a autólise bacteriana, seus componentes celulares são liberados e reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes nas células endoteliais e fibrócitos. Isto dá início à resposta imunológica levando à produção de citocinas (SANDERS et al., 2013).

A perda auditiva constitui a seqüela mais comum da infecção congênita pelo vírus da rubéola, respondendo por aproximadamente 58% dos casos. A surdez é em geral neurossensorial bilateral de grau severo a profundo e se manifesta entre os primeiros 6-12 meses de idade, embora já possa se apresentar ao nascimento. Em um estudo recente com a população brasileira, a rubéola congênita foi evidenciada como causa de 32% dos casos de surdez. Embora os mecanismos ainda sejam pouco compreendidos é sabido que o vírus causa danos diretos à cóclea e morte celular no órgão espiral (ou de Corti) e na estria vascular e, alterações na composição da endolinfa também têm sido relatadas (DA SILVA; QUEIROS; LIMA, 2006; COHEN; DURSTENFELD; ROEHM, 2014). Já a toxoplasmose, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, é uma doença que tem sido associada a alterações nas vias auditivas desde os anos 1950 quando foram identificados depósitos de cálcio no ligamento espiral na cóclea, similares àqueles encontrados no cérebro de crianças portadoras de toxoplasmose congênita. A surdez tem sido relatada em cerca de 20% dos casos de toxoplasmose congênita (ANDRADE et al., 2008).

Já nos países desenvolvidos, a causa ambiental mais comum é a infecção congênita pelo citomegalovírus (CMV). É estimado que 0,7% de todos os nascidos vivos sejam infectados por CMV. Dentre estes, cerca de 10-15% já evidenciam sintomas ao nascimento e, metade destas crianças, chega a desenvolver seqüelas a longo prazo como surdez neurossensorial uni ou bilateral, atraso no

desenvolvimento e microcefalia, embora deva se considerar as variações étnicas. Daqueles assintomáticos ao nascimento, cerca de 10% chega a desenvolver surdez neurossensorial logo no início da infância, bem como 5% apresentam defeitos cognitivos (KENNESON; CANNON, 2007; BIALAS; SWAMY; PERMAR 2015).

Em adultos, a surdez adquirida está quase sempre relacionada a fatores ambientais que podem estar somados à susceptibilidade genética de cada indivíduo; ambos os fatores podem interagir e definir a sensibilidade daquela pessoa ao fator ao qual é exposto. A perda auditiva relacionada à idade e a induzida por ruídos são os exemplos mais freqüentes destas interações genético-ambientais. Existem fatores de riscos associados à surdez relacionada à idade tais como a exposição a ruídos, fumo, uso de medicações ototóxicas e doenças cardiovasculares. Alguns genes já têm sido sugeridos como relacionados à susceptibilidade para a surdez como KCNE1, GSTM1, CAT e GRHL2, no entanto, há uma grande dificuldade na separação dos efeitos decorrentes da idade daqueles efeitos nocivos resultantes da exposição ambiental, o que dificulta a associação de genes a estas doenças complexas (HUYGHE et al., 2008; KONINGS et al., 2009; LI et al., 2014).

A surdez pode também, ter causa genética e, assim, ser hereditária. A maioria dos casos apresenta um comportamento de herança mendeliana simples, podendo ser classificadas em síndrômica e não-síndrômica, de acordo com a presença de outras anormalidades tais como problemas renais, cardíacos e de visão, por exemplo (ITO et al., 2010). A surdez é dita síndrômica quando há associação da perda auditiva com malformações do ouvido externo ou mesmo acometimento de outros órgãos ou sistemas. A surdez síndrômica responde por aproximadamente 30% dos casos de surdez pré-lingual. Mais de 400 síndromes genéticas envolvendo surdez têm sido descritas, dentre elas as mais comumente associadas à perda auditiva são as síndromes de Usher e Pendred com padrão de herança autossômico recessivo e, as síndromes de Sticker, Branquio-oto-renal ou BOR e de Waardenburg como principais representantes dos casos de surdez síndrômica dominante (ITO et al., 2010; VAN CAMP; SMITH, 2014). Já a surdez não-síndrômica, como o próprio nome já diz, é caracterizada pela ausência de outras anormalidades em outros sistemas. Esta constitui a forma mais comum de

surdez hereditária e apresenta-se quase sempre como neurosensorial. Já existem mais de 40 genes correlacionados, o que sugere a heterogeneidade genética. Aqueles genes de mecanismo de herança autossômica recessiva são responsáveis por aproximadamente 80% de todos os casos de surdez hereditária (NAJMABADI; KAHRIZI, 2014).

1.4 Surdez Hereditária

A surdez hereditária constitui o transtorno neurosensorial mais comum em humanos, com uma prevalência de um indivíduo acometido a cada 1000 nascidos vivos. Mais de 70% dos casos de surdez hereditária constituem casos não-sindrômicos, destes cerca de 70% cursam com surdez congênita ou pré-lingual. Também na maioria dos casos, a perda auditiva hereditária é neurosensorial e monogênica, bastante heterogênea, com diferentes padrões de herança e com uma grande quantidade de genes envolvidos (HAN et al., 2014; LIN et al., 2014). De acordo com o padrão de herança, a surdez hereditária pode ser classificada em quatro grupos: autossômico dominante (DFNA), que ocorre em aproximadamente 20% dos casos; autossômico recessivo (DFNB), o tipo mais comum, responsável pela PANS não-sindrômica pré-lingual em aproximadamente 80% dos casos; ligados ao X (DFNX) e de herança materna associadas às mutações no DNA mitocondrial. Os *loci* são denominados pelo prefixo DFN, referente a *DeafNess* e seguidos de um número de identificação, referente à ordem de mapeamento/descoberta do gene/*locus* (ITO et al., 2010; LOCHER et al., 2015). A surdez hereditária de herança recessiva pode se estabelecer pré ou pós-lingual, sendo em geral de grau severo a profundo; já nas formas dominantes o fenótipo é em geral menos grave, de início pós-lingual e de grau moderado a severo (GIROTTI et al., 2013).

A forma sindrômica mais comum de PANS hereditária é a Síndrome de Pendred (SPD) (OMIM#274600) que é caracterizada pela surdez neurosensorial congênita de grau severo a profundo, na maioria dos casos. A dilatação do aqueduto vestibular é uma característica que pode estar presente em pacientes

com SPD podendo estar acompanhada de hipoplasia do nervo coclear, mais conhecida como Displasia de Mondini (malformação comum da orelha interna). O teste de descarga de perclorato pode estar alterado e haver a presença de bócio. O alargamento do aqueduto vestibular (EVA), entretanto, é encontrado tanto em casos de SPD quanto em casos não-sindrômicos, relacionados ao *locus* DFNB4, comumente associadas a mutações no gene SLC26A4 (SMITH; BALE JR; WHITE, 2005; DOSSENA et al., 2011a; ITO et al, 2011).

Estabelecer as causas genéticas para PANS é crucial para que haja um manejo clínico adequado daqueles pacientes afetados e de suas famílias. Assim o estudo continuado a fim de explicar a causa genética da surdez é de extrema relevância clínica. Embora a PANS não-sindrômica hereditária seja geneticamente heterogênea, mais de 140 *loci* relacionados a este tipo de surdez já foram identificados, incluindo 81 *loci* autossômico recessivos, 56 autossômico dominantes, 5 ligados ao X e dois genes mitocondriais. Destes *loci*, 56 genes de herança recessiva, 30 dominante e 4 ligados ao X foram identificados como responsáveis pelo estabelecimento da surdez hereditária (VAN CAMP; SMITH, 2014). Alterações no *locus* DFNB1A, do gene GJB2, foram descritas como a principal causa de perda auditiva neurosensorial não sindrômica autossômica recessiva. Mutações no gene GJB2 (*Gap Junction Beta 2 gene*) correspondem a mais de 50% dos casos de PANS autossômica recessiva e até 20% dos casos de PANS congênita (ANGELI; LIN; LIU, 2012; CASTRO et al., 2013). Duas deleções em um outro *locus*, DFNB1B, no gene GJB6 [del(GJB6-D13S1830) e del(GJB6-D13S1854)] constituem a segunda causa mais comum de surdez na população espanhola, por exemplo, e são, quase sempre, evidenciadas em dupla heterozigose com alterações no gene GJB2 (UTRERA et al., 2007). Entretanto, vários outros genes têm sido relacionados à surdez hereditária, dentre eles: SLC26A4, MYO15A, MYO7A, OTOF, CDH23, TMC1, TMIE e TMPRSS3, embora em menor penetrância (DUMAN et al., 2011; ANGELI; LIN; LIU, 2012; DUMAN; TEKIN, 2013).

1.5 Principais genes relacionados à surdez hereditária

Para o melhor entendimento da contribuição genética de algumas alterações moleculares no processo de audição, é importante compreender a fisiologia da cóclea, principal estrutura afetada na surdez neurosensorial hereditária. Quando há o estímulo sonoro, no ouvido interno ocorre a transformação da energia mecânica do som em um sinal elétrico nas células ciliadas externas da cóclea através de um mecanismo denominado transdução eletromecânica. Na superfície destas células existem os estereocílios, estruturas capazes de se curvarem em resposta ao som de forma secundária ao movimento do estribo e da janela oval, movendo assim a perilinfa que circunda estas células, do ouvido médio para o ouvido interno. Essa mobilidade celular promove a abertura dos canais de transdução possibilitando o influxo de potássio da endolinfa para as células ciliadas internas e externas da cóclea causando a despolarização da membrana celular e ativando, por sua vez, os canais basolaterais da superfície da membrana, sensíveis a alterações de voltagem. O subsequente influxo de cálcio promove a liberação de vesículas sinápticas contendo neurotransmissores nos terminais sinápticos do VIII par craniano, permitindo que o sinal sonoro seja então reconhecido pelo tronco cerebral. Assim, após o estímulo sonoro, as células ciliadas tornam-se hiperpolarizadas e com altos níveis intracelulares de potássio. Para uma nova excitação celular, o potássio deve ser removido. Este influxo/efluxo de íons é realizado por comunicações intracelulares especializadas: as junções comunicantes ou junções do tipo *gap* (GJ), existentes entre as células de sustentação cocleares (ZENNER; PLINKERT, 1992; PIATTO et al., 2005; PIATTO et al., 2009).

As conexinas constituem proteínas envolvidas na formação das junções do tipo *gap* (GJ) e permitem a comunicação célula a célula através da membrana plasmática, bem como a troca de pequenas moléculas do microambiente tecidual dentre diferentes células. Duas conexinas, a conexina 26 e conexina 30, são expressas na cóclea, em especial nas células de sustentação do órgão de Corti e estria vascular. Os padrões de expressão destas proteínas sugerem que estas junções GJ contribuam para a formação de uma rede celular que se acredita ser

importante para a reciclagem de íons K^+ entre a perilíngua e a endolíngua pela estria vascular, permitindo assim a transdução eletromecânica do sinal sonoro (SANCHEZ; VERSELIS, 2014).

A primeira mutação envolvendo estas proteínas foi descrita em 1996 no gene GJB2, que codifica a conexina 26, em uma família consanguínea de origem Paquistanesa, portadora de surdez profunda não-sindrômica. A mutação foi descrita em cromossomos autossômicos, de maneira recessiva (DFNB1A; OMIM#220290) no *locus* 13q11–q12 e logo depois, em 1997, a forma dominante foi também identificada (DFNA3; OMIM#601544) (BROWN et al., 1996; KELSELL et al., 1997). Atualmente, já existem mais de 350 variantes descritas no gene GJB2, de acordo com dados do *Human Gene Mutation Database* (HGMD) (STENSON et al., 2014), cuja maioria é recessiva e resulta em perda da função protéica em decorrência de deleções, inserções e *frameshifts* (HOANG-DINH et al., 2009). Mutações bialélicas no gene GJB2 são consideradas fatores determinantes para o estabelecimento da surdez hereditária, sendo responsáveis por aproximadamente 50% dos casos de surdez recessiva. Aproximadamente 70% destes casos compreendem a mutação c.35delG, que é encontrada em homozigose em 10% a 63% dos casos (MOTTA et al., 2012). Tal mutação resulta em um *frameshift* pela deleção de uma guanina dentre os seis nucleotídeos presentes entre as posições 30 e 35 (GGGGGG) promovendo o truncamento da proteína no códon 13 (ESTIVILL et al., 1998a). Entretanto, os tipos e frequências das mutações são fortemente influenciados pela composição étnica da população. Na população brasileira, estudos apontam a presença de c.35delG em homozigose em 3,9 a 24,1% dos casos estudados no Nordeste e Sudeste do país (CORDEIRO-SILVA et al., 2011; MANZOLI et al., 2013). Dentre os Caucásios (descendência europeia), c.35delG responde pela maioria dos casos de surdez decorrentes de alterações neste gene, com uma frequência entre 1 a 5% nesta população. Já dentre as populações Ashkenazi, Leste-Asiática e Africana, as mutações predominantes são a c.167delT, c.235delC e p.Arg143Trp, respectivamente (BATISSOCO et al., 2009; DUMAN; TEKIN, 2013).

Embora mutações bialélicas no gene GJB2 respondam por até 50% dos casos de surdez não sindrômica autossômica recessiva, um grande número de casos permanece indeterminado pela análise isolada deste gene (BATISSOCO et

al., 2009). Mutações no gene GJB6, que também está localizado no cromossomo 13, *upstream* ao gene GJB2 no *locus* DFNB1 e codifica outro tipo de conexina, a conexina 30, também constituem causa comum de surdez. Alterações no gene GJB6 foram primeiramente descritas em famílias com surdez bilateral de modo autossômico dominante (DFNA3B; OMIM#612643) em 1999. Logo depois em 2002, foi descrita a forma autossômica recessiva (DFNB1B; OMIM#612645) com mutações em uma família espanhola com herança digênica de GJB2/GJB6 (GRIFA et al., 1999; DEL CASTILLO et al., 2002). Hoje, de acordo com dados do HGDM (STENSON et al., 2014), 23 mutações já foram identificadas neste gene, com duas deleções, em particular, bem caracterizadas e correlacionadas com a surdez hereditária. A deleção del(GJB6-D13S1830) envolve um fragmento de 309 kb e constitui a segunda causa mais comum de surdez na população espanhola, sendo também freqüentemente encontrada nas populações da França, Reino Unido, Israel e Brasil (DEL CASTILLO et al., 2002, 2003). Tal deleção pode ser encontrada tanto de forma monogênica quanto em heterozigose composta com o gene GJB2, o que explica muitos casos de surdez em indivíduos com mutações monoalélicas em GJB2 (PALLARES-RUIZ et al., 2002; BOLZ et al., 2004). Entretanto, embora a deleção del(GJB6-D13S1830) forneça uma explicação para o estabelecimento da surdez em aproximadamente 30 a 70% dos casos de mutações em heterozigose para GJB2 em algumas populações, sugeria-se a presença de outras mutações no *locus* DFNB1 em outras populações (DEL CASTILLO et al., 2003). Assim, em 2005, del Castillo e colaboradores caracterizaram uma nova alteração no gene GJB6 resultante da deleção de um fragmento de 232 kb, a del(GJB6-D13S1854). Tal deleção foi primeiramente relatada em 22,2% dos casos de surdez que apresentavam heterozigose para o *locus* DFNB1, explicando o fenótipo numa série de casos do Reino Unido. Após um estudo multicêntrico, também foi relatada em 6,3% dos casos de dupla heterozigose com GJB2 no Brasil e em 1,9% de uma série de casos no Norte da Itália.

A existência destes padrões de herança mono e digênico para os genes GJB2 e GJB6 no estabelecimento da surdez são explicáveis. Ambos os genes possuem padrões de expressão semelhantes no ouvido interno bem como, ambas as proteínas desempenham papel importante na regulação dos íons K⁺, essencial para a geração do potencial endococlear (FREI et al., 2004). Vários mecanismos

têm sido propostos a fim de explicar a contribuição destes casos de mutações em dupla heterozigose de GJB2 e GJB6 para o estabelecimento da surdez. As duas deleções no gene GJB6 resultam no truncamento da região *Open Reading Frame* (ORF), localizada *upstream* ao gene GJB2 no cromossomo 13, não afetando, no entanto, a estrutura deste último. Acredita-se que tais deleções atuem inibindo elementos regulatórios em *cis*, importantes para a expressão normal de GJB2. Tal teoria é reforçada por testes recentes com camundongos nocauteados para conexina 30, que apresentaram a expressão reduzida da conexina 26. Já estudos com as deleções na conexina 30 nos quais se adotava uma estratégia de manutenção da expressão da conexina 26, o fenótipo de surdez não era observado. Isto prova que estas deleções em GJB6 quando não acompanhadas de uma segunda alteração no GJB2, não são suficientes para causar o fenótipo em questão, sugerindo que a expressão de conexina 26, mas não da conexina 30, é crucial para uma correta função auditiva (FREI et al., 2004; UTRERA et al., 2007; DEL CASTILLO; DEL CASTILLO, 2011; RODRIGUEZ-PARIS et al., 2011; BOULAY et al., 2013; SANCHEZ; VERSELIS, 2014).

Logo mais, após a descoberta de mutações nas conexinas 26 e 30 como relacionadas à surdez, mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) foram associadas a casos de perda auditiva neurossensorial, tanto nas formas síndrômica quanto não-síndrômica. O processo auditivo está intimamente relacionado à correta função mitocondrial e mutações que envolvam genes responsáveis por componentes do aparato de síntese protéica, como os RNAs transportadores (tRNAs) e ribossômicos (rRNAs), estão associadas à perda auditiva. Alterações em MT-RNR1, gene responsável por codificar a subunidade 12S do rRNA, compõem grande parte dos casos de surdez não-síndrômica de herança materna. Até então, pelo menos cinco diferentes mutações já foram identificadas neste gene e associadas ao aumento da predisposição à surdez após o uso de aminoglicosídeos, são elas m.1555A>G, m.961delT, m.1095T>C, m.1494C>T e m.827A>G (BARDIEN et al., 2009). Dentre estas, a troca de uma Adenina por uma Guanina na posição 1555 do genoma mitocondrial (m.1555A>G) já tem sido freqüentemente associada à surdez não-síndrômica induzida pelo uso de aminoglicosídeos em diferentes famílias, de diferentes etnias (LI et al., 2004; DOWLATI et al., 2013).

O uso de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos tais como a gentamicina, estreptomicina e canamicina, pode levar ao comprometimento renal, vestibular e/ou à toxicidade do sistema auditivo. Isto ocorre uma vez que o mecanismo de ação destas drogas é baseado na ligação direta da subunidade 16S do rRNA à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, prejudicando assim a síntese protéica. Com o conseqüente declínio na geração de ATP, há um aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), moléculas responsáveis por danos a proteínas mitocondriais e celulares. Isto pode levar à disfunção neuronal ou morte de células vestibulares e cocleares no sistema auditivo, resultando em um impedimento auditivo ou mesmo uma surdez irreversível (BINDU; REDDY, 2008).

A mutação m.1555A>G ocorre em uma região altamente conservada do gene MT-RNR1, a partir da qual o RNA mensageiro (mRNA) é transcrito. Desta forma, acredita-se que esta mutação promova a alongação da região de ligação do tRNA no ribossomo, interferindo na fidelidade do processo de tradução do mRNA o que leva à morte das células ciliadas. Estudos relatam o importante papel desta mutação no estabelecimento da surdez hereditária, mesmo quando não há a exposição a antibióticos ototóxicos. Entretanto, m.1555A>G está associada a uma diminuição da capacidade de regeneração das células cocleares após certos danos ambientais, o que na verdade sugere que a relação desta mutação com o uso de aminoglicosídeos está associada a um efeito aditivo destes danos (PREZANT et al., 1993; ESTIVILL et al., 1998b; OLIVEIRA et al., 2007; ITO et al., 2010). A frequência desta alteração na população não é tão alta quanto aquela encontrada para os genes GJB2 e GJB6. Alguns estudos têm relatado a ausência desta alteração na população brasileira e, quando m.1555A>G é encontrada, se apresenta em frequências muito baixas (0,46%) (OLIVEIRA et al., 2007; MANZOLI et al., 2013; MELO et al., 2014; QIAN et al., 2014).

Estudos mais recentes, no entanto, têm elucidado o papel de diversos outros genes na surdez hereditária. Mutações bialélicas no gene SLC26A4, por exemplo, constituem a maior causa de surdez associada ao alargamento do aqueduto vestibular, sendo identificada em até 11% da população chinesa com surdez de grau severo a profundo. Alterações neste gene também estão associadas à Síndrome de Pendred, forma mais comum de surdez sindrômica, e são

consideradas a segunda maior causa de surdez hereditária na população chinesa (PIATTO et al., 2009; CHAI et al., 2014; DU et al., 2014).

1.6 O papel do gene SLC26A4 na surdez hereditária

O gene SLC26A4 foi primeiramente descrito por Everett e colaboradores em 1997, sendo mapeado em 7q22-q31.1. Este gene produz um transcrito de 5 kb e uma proteína de 86 kDa de 780 aminoácidos denominada pendrina, uma proteína transmembrana responsável pelo transporte de íons cloreto (Cl^-), iodeto (I^-), bicarbonato (HCO_3^-) e formiato (HCOO^-). Tal proteína pertence à família carreadora de solutos 26A (SLC26A – *Solute Carrier 26A*) e é expressa em diversos tecidos tais como tireóide, rim, ouvido interno, vias aéreas, glândulas mamárias, testículos, placenta, endométrio e fígado (YAZDANPANAHI et al., 2013). O papel desta proteína tem sido bem descrito na tireóide, ouvido interno e rim. Na tireóide, a pendrina está relacionada à troca de íons Cl^-/I^- ; já no ouvido interno, relaciona-se à troca de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, sendo expressa no epitélio do saco e ducto endolinfáticos, na membrana apical do sáculo, utrículo e ampola (órgãos otolíticos), e em uma variedade diversa de tipos celulares na cóclea (células ciliadas internas e externas, células de Deiters, de Claudius, do ligamento e gânglio espiral, proeminência espiral e células do sulco externo). No ouvido interno, a pendrina desempenha papel crucial na regulação do pH e composição iônica da endolinfa, provavelmente relacionada à secreção de HCO_3^- (DOSSENA et al., 2011b; ROZENFELD et al., 2011; NAJMABADI; KAHIRIZI, 2014). Estudos têm provado o importante papel desta proteína na manutenção deste equilíbrio ácido-básico no ouvido interno. Camundongos nocauteados para o gene SLC26A4 evidenciaram baixíssimo pH, altas concentrações de íons Ca_2^+ e perda completa do potencial endococlear na endolinfa, em relação aos animais controle. Entretanto, o papel exato desta proteína no ouvido interno e na determinação da composição endolinfática permanece pobremente definido (SHCHEYNIKOV et al., 2008; ROZENFELD et al., 2011).

Quanto à estrutura topológica desta proteína, as informações ainda são limitadas e por vezes controversas. Everett et al. (1997), sugerem um modelo protéico com 11 segmentos transmembrana (TM), com o segmento (C)-terminal com localização extracelular. Já Royaux et al. (2000) e o modelo proposto por Chang et al. (2015) na *Pendred/BOR Homepage*¹ defendem a existência de 12 domínios TM com o segmento (C)-terminal presente no ambiente citoplasmático, baseando-se na predição do programa MEMSAT (*Transmembrane Sequence Prediction - BioTools*). Já Dossena et al. (2009), também utilizando o programa MEMSAT como ponto de partida, propõem a existência de 15 domínios TM, em hélice. O grupo ressalta ainda, que os domínios anfipáticos constituem aqueles mais ambíguos quanto a sua real localização podendo ser do tipo transmembrana, citosólico ou extracelular. Entretanto, a idéia destes domínios como transmembrana em hélices ao invés de extracelulares é reforçada pela homologia entre estas seqüências dentre várias espécies. Apesar destas evidências, todos os modelos topológicos propostos são especulativos e carecem de evidências experimentais. Isto encoraja a realização de experimentos mais rigorosos a fim de caracterizar as estruturas secundária e terciária da proteína slc26a4. A representação dos modelos propostos pelo grupo da *Pendred/BOR Homepage* e por Dossena et al. (2009) estão dispostas na Figura 1.

¹ <http://www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor/>.

Figura 1. Modelos topológicos propostos para a proteína pendrina humana. (A) Modelo de 12 domínios transmembrana (TM) descritos pela *Pendred/BOR homepage* (CHANG et al., 2015) utilizando o programa MEMSAT. (b) Modelo contendo 15 domínios TM, proposto por Dossena et al. (2009). Os domínios TM são evidenciados como trechos de aminoácidos que cruzam a membrana (representada pela faixa central em cinza). As duas hélices anfipáticas estão representadas pela cor vermelha, o domínio STAS está representado em azul, a assinatura de consenso para o transporte de íons sulfato está indicada pela cor verde e a sequência de repetição de glicinas está indicada em amarelo. FONTE: DOSSENA et al. (2009).

Após o espectro de mutações nas conexinas 26 e 30, mutações na pendrina constituem a segunda causa mais freqüente de surdez autossômica recessiva não sindrômica (DFNB4; OMIM#600791) em muitas populações. Mutações no gene SLC26A4 promovem a redução da expressão ou perda de função protéica e têm

sido associadas a um espectro fenotípico de surdez que compreende tanto casos síndrômicos como não-síndrômicos. Tais alterações constituem a principal causa de malformação do osso temporal na orelha interna, sendo responsável pelo estabelecimento de até 90% de todos os casos de Síndrome de Pendred e até 80% dos casos de alargamento do aqueduto vestibular (EVA - *Enlarged vestibular Aqueduct*) ou displasia de Mondini (MD) (HILGERT; SMITH; VAN CAMP, 2009; KAHIRIZI et al., 2009; NAJMABADI; KAHIRIZI, 2014).

A síndrome de Pendred (SPD; OMIM#274600) constitui a causa mais comum de surdez síndrômica neurosensorial, com acometimento tipicamente bilateral, progressiva e/ou flutuante. É caracterizada pela perda auditiva associada à malformação do ouvido interno (EVA e/ou MD) e à tireoidopatia (eutireoidismo ou hipotireoidismo acompanhado de bócio e/ou defeitos no processo de organificação do iodo – teste de descarga do perclorato positivo). A deficiência tireoidiana na SPD se apresenta em geral, durante a puberdade ou no início da idade adulta (POUROVÁ et al., 2010; JANG et al., 2014). A pendrina também está localizada na membrana apical dos tirócitos, onde sua atividade de troca de íons Cl^-/I^- é essencial para o efluxo de iodeto no lúmen folicular; assim, mutações com perda de função da pendrina impedem o acúmulo destes íons no lúmen folicular levando ao comprometimento da síntese dos hormônios tireoidianos, explicando assim o bócio compensatório naqueles pacientes portadores da SPD. Uma vez que outros transportadores além da pendrina são também responsáveis pelo efluxo de íons I^- , pacientes portadores da síndrome de Pendred podem apresentar eutireoidismo. Estudos têm evidenciado também, que mutações bialélicas no gene SLC26A4 estão relacionadas à síndrome de Pendred, enquanto mutações envolvendo apenas um alelo correlacionam-se com EVA não-síndrômica. Isto pode ser explicado pelo fato de algumas alterações permitirem ainda alguma atividade residual de troca de íons, suficiente para eliminar ou mesmo prolongar o início do comprometimento tireoidiano. Todavia, tal atividade residual não é suficiente para evitar o acometimento do ouvido interno (DOSSENA et al., 2009; ROZENFELD et al., 2011).

A síndrome do aqueduto vestibular alargado (SAVA; OMIM#600791) ou EVA não-síndrômica, constitui outra forma de surdez neurosensorial associada à EVA, em que não há o comprometimento tireoidiano (PERA et al., 2008). A SAVA foi

primeiramente descrita por Valvassori e Clemis em 1978, e é caracterizada pela presença do ducto e saco endolinfáticos maiores que o normal, característica definida clinicamente por uma distância entre a abertura do aqueduto vestibular e a cruz comum maior ou igual a 1,5mm, observada por tomografia computadorizada (CT) (ITO et al., 2010). Acredita-se que a etiologia da surdez nestes casos, além dos mecanismos já citados, se deva à perda da secreção de íons bicarbonato decorrente de mutações no gene SLC26A4, que impedem a reabsorção da endolinfa no saco endolinfático podendo levar a um eventual alargamento vestibular na cóclea e novamente, à surdez (DOSSENA et al., 2011b). Estudos prévios utilizando camundongos nocauteados para a expressão de pendrina já evidenciavam sinais de disfunção vestibular. Após o 15º dia de desenvolvimento embrionário os camundongos apresentavam uma severa dilatação dos espaços endolinfáticos semelhante àqueles achados radiológicos em indivíduos com mutações em SLC26A4, portadores de SAVA (EVERETT et al., 2001).

Apesar do espectro fenotípico associado a mutações no gene SLC26A4, a surdez decorrente destas alterações apresenta-se como neurossensorial, em geral bilateral, tipicamente pré-lingual com grau variando de severo a profundo, com evolução variável (MORAES et al., 2013). Dados do *Human Gene Mutation Database* (STENSON et al., 2014) já identificaram mais de 400 alterações no gene SLC26A4, relacionadas tanto à síndrome de Pendred quanto à surdez não síndrômica relacionada ao *locus* DFNB4. Estudos com a população caucasiana têm evidenciado a presença de mutações bialélicas neste gene em até 1/3 dos casos de SAVA estudados, com até 40% dos pacientes apresentando mutações monoalélicas (PARK et al., 2003; ALBERT et al., 2006). Já em pacientes japoneses e coreanos portadores de EVA a frequência de mutações foi bem maior, sendo descritas em até 80% dos casos estudados (TSUKAMOTO et al., 2003; PARK et al., 2005). Na população brasileira, poucos estudos têm avaliado a prevalência de mutações no SLC26A4. Kopp et al., em 1999, evidenciaram a presença de mutações no SLC26A4 em aproximadamente 60% dos indivíduos portadores da Síndrome de Pendred no Nordeste brasileiro. Já Moraes et al. (2013), evidenciaram alterações mono e bialélicas neste gene em aproximadamente 39% da sua série de casos de portadores de SAVA estudada.

Assim, a alta prevalência de mutações no gene SLC26A4 envolvidas no estabelecimento da surdez hereditária, bem como sua relação com outros fenótipos ressaltam a importância da caracterização molecular deste gene dentre diferentes populações, em especial, na população brasileira que até então possui poucos estudos relacionados.

1.7 Ferramentas de análise molecular no diagnóstico molecular da surdez hereditária

Aproximadamente 60% de todos os casos de surdez são de etiologia genética, sendo o restante dos casos atribuídos a causas adquiridas (30%) e idiopáticas (10%). A crescente associação de vários genes ao estabelecimento da surdez hereditária tem permitido desvendar a etiologia bem como um melhor entendimento da contribuição destes genes para a fisiologia do sistema auditivo (PIATTO et al., 2009). Para isso torna-se importante a utilização de ferramentas de análise de uma grande quantidade de dados, ou mesmo em larga escala, no sentido de identificar genes e alterações correlacionadas à surdez hereditária dentre diferentes populações.

Tendo em vista as diferentes e numerosas mutações descritas no gene SLC26A4, o ideal é que a análise deste gene envolva a investigação de todos os seus éxons, bem como sítios de *splicing*, para cada indivíduo estudado. Para isso, o seqüenciamento pela metodologia de Sanger vem sendo amplamente empregado, sendo a mais freqüente metodologia de análise empregada quando se trata da análise de um ou poucos genes. Entretanto, quando se trata do estudo de muitos indivíduos, de uma série de casos por exemplo, alternativas custo-efetivas podem ser empregadas para a investigação molecular da surdez hereditária (CHEN et al., 2011).

A técnica de *High Resolution Melting* (HRM) consiste em um método alternativo de alta sensibilidade, de sistema fechado que reduz contaminações, para a detecção de variantes na seqüência de DNA. Tem a vantagem em relação à técnica de desnaturação alcalina e *High-Performance Liquid Chromatography*

(HPLC), por ser capaz de detectar alterações tanto em homozigose quanto em heterozigose através de mudanças nas temperaturas de *melting* e alterações nas curvas quando comparadas a uma amostra referência. Com a adição de um intercalante de DNA na reação de PCR inicial, os sinais referentes às temperaturas de *melting* (quando há a desnaturação da dupla fita de DNA) podem ser detectados logo após a amplificação do DNA, dispensando assim, qualquer método de modificação pós-PCR. Ensaios de HRM têm sido desenvolvidos e otimizados para o *screening* de mutações em genes mais extensos tais como CFTR, BRCA1 e BRCA2. A análise por HRM é vantajosa ainda, porque em geral, grande parte das amostras não apresenta alterações e criam assim uma “referência” junto à amostra controle utilizada, minimizando os potenciais efeitos de variações residuais durante a análise de dados. Apenas aquelas amostras que evidenciaram curvas de *melting* diferentes daquelas utilizadas como referência são classificadas como candidatas a uma posterior confirmação através das técnicas de seqüenciamento. Isto permite então, a identificação de amostras normais, evitando o seqüenciamento de amostras com fenótipo selvagem, reduzindo os custos relativos a esta técnica. Embora o *screening* gênico seja a principal aplicação do HRM, esta técnica também tem sido amplamente utilizada para genotipagem e análise de metilação (ERALI; VOELKERDING; WITTEW, 2008; ERALI; WITTEW, 2010; MERCER; MUTTON; DAHL, 2011; ER; CHANG, 2012).

A diversa heterogeneidade genética da surdez faz do diagnóstico molecular, uma tarefa desafiadora. Desta forma, as análises em larga escala também têm constituído ferramentas importantes para o diagnóstico molecular de surdez hereditária. A análise da região codificante de alguns genes específicos, ou mesmo de todos os genes relacionados à doença, como de todo o exoma e até de todo o genoma, permite um levantamento enriquecido de mutações relacionadas a determinado fenótipo. Vários grupos têm somado esforços em prol do diagnóstico molecular de surdez hereditária através das técnicas de NGS (*Next Generation Sequencing*) (TANG et al., 2012; SHEARER et al., 2013; LU et al., 2014).

Outras ferramentas são rotineiramente utilizadas na análise destas alterações, não só no que diz à detecção como também para a caracterização das variantes encontradas. Para isto, existe uma série de ferramentas *in silico* capazes de nortear a respeito do significado destas alterações em relação ao fenótipo

estudado. Este tipo de análise é útil no fornecimento de informações a respeito da patogenicidade de determinada alteração, baseando-se na conservação evolutiva daquelas seqüências alteradas, por exemplo, como os softwares *Sift Score*²; *PolyPhen-2*³; e *Mutpred*⁴; como também na predição de alterações já a nível de proteína, como o *Project Hope Server*⁵.

Diante disso fica evidente que identificar a etiologia genética e conseqüentemente, a mutação causal, é de extrema valia para o diagnóstico genético da surdez, especialmente naqueles casos congênitos/pré-linguais. Isto permite estimar o risco de recorrência em parentes o que pode implicar diretamente em um melhor planejamento familiar. Em algumas circunstancias, um diagnóstico genético precoce pode inclusive ser útil na predição dos possíveis efeitos fenotípicos permitindo assim a adoção de medidas terapêuticas de forma personalizada (LU et al., 2014). Todos estes fatores ressaltam a importância do estudo da etiologia genética da surdez, o que possibilita não só o diagnóstico molecular como o manejo adequado daqueles indivíduos afetados, contribuindo inclusive para o correto aconselhamento genético das famílias. Assim, o presente estudo visou à caracterização molecular de uma série de casos de pacientes portadores de surdez hereditária do Sudeste Brasileiro, bem como a avaliação e contribuição do gene SLC26A4 para o estabelecimento do fenótipo nestes pacientes.

² <http://sift.jcvi.org/>;

³ <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>;

⁴ <http://mutpred.mutdb.org/>;

⁵ <http://funseq.gersteinlab.org/upload/>.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a base genética e o papel do gene SLC26A4 para a perda auditiva neurossensorial (PANS) não-sindrômica pré-lingual em pacientes atendidos pelo serviço de Genética Médica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever clinicamente uma série de casos de surdez neurossensorial não-sindrômica pré-lingual;
- Avaliar e discutir a série de casos quanto ao estado mutacional nos genes GJB2, GJB6 [del(GJB6-D13S1830) e del(GJB6-D13S1854)] e MT-RNR1 (m.1555A>G e m.961delT), previamente analisados.
- Buscar e descrever alterações presentes na região codificante do gene SLC26A4;
- Estimar a patogenicidade das mutações e polimorfismos encontrados;
- Classificar as alterações encontradas na região codificante do gene SLC26A4 quanto aos mecanismos de herança responsáveis pelo fenótipo da PANS não-sindrômica pré-lingual: heterozigose, heterozigose composta, dupla heterozigose ou homozigose;
- Identificar alterações no gene SLC26A4 a fim de explicar o estabelecimento da PANS não-sindrômica pré-lingual naqueles pacientes sem alterações moleculares para os genes GJB2, GJB6 e MT-RNR1;
- Contribuir para o correto aconselhamento genético das famílias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização das amostras

Foram utilizadas amostras de DNA de 88 pacientes, extraído de sangue total, pertencentes ao Banco de DNA do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática. A série de casos abrangeu pacientes de ambos os sexos, com idade variando entre 2 e 63 anos, provenientes de 88 famílias diferentes, portadores de Perda Auditiva Neurosensorial (PANS) não-sindrômica pré-lingual, assistidos durante o período de 2003 a 2013 pelos departamentos de Genética Médica e de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC/FMRP/USP).

Todos os pacientes tiveram seus prontuários revisados quanto ao grau de perda auditiva, progressão da surdez, presença de fatores de risco para o estabelecimento da surdez, casos familiares e presença de consanguinidade entre os pais. Todas as amostras foram também analisadas quanto à presença de mutações nos 21 éxons do gene SLC26A4, que já possuíam dados moleculares prévios para os genes GJB2, GJB6 e MT-RNR1, utilizados para o diagnóstico molecular de surdez hereditária pelo Centro de Medicina Genômica (CMG), sendo os resultados gentilmente cedidos para complementar as análises deste estudo. Os dados moleculares prévios eram relativos à análise da região codificante do gene GJB2, por seqüenciamento pela metodologia de Sanger, de duas deleções del(GJB6-D13S1830) e del(GJB6-D13S1854) no gene GJB6 por PCR multiplex, bem como da análise de duas mutações mitocondriais (MT-RNR1) m.1555A>G e m.961delT por PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) utilizando as enzimas de restrição HaeIII e MnlI, respectivamente.

3.2 Aspectos Éticos

As amostras previamente coletadas e já com DNA extraído, foram utilizadas a partir de um banco de DNA existente no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, sob processo nº 11747/2005. Toda a pesquisa somente teve início após emissão de parecer favorável pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, de acordo com o processo HCRP nº 8736/2007 (Anexo A).

3.3 Extração de DNA

A extração de DNA de cada paciente foi realizada a partir de 4 mL de sangue total, previamente coletados no Ambulatório de Genética Médica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, em tubo de tampa roxa (EDTA). O material era então encaminhado ao Centro de Medicina Genômica (CMG) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, para centrifugação a 2000g por 10 minutos para a formação do *buffy coat*. Em seguida, 300 µL do *buffy coat* eram recolhidos e adicionados ao primeiro *well* do cartucho do aparelho de extração Maxwell da Promega®, seguindo então o protocolo de extração padrão estabelecido pelo fabricante, através do uso de *beads* magnéticas. Após o processo de extração, o DNA era quantificado e armazenado em freezers a -20°C.

3.4 Padronização de *Primers* para análise do gene SLC26A4

Foram utilizados 26 pares de *primers* ao todo, para amplificação de toda a região codificante do gene SLC26A4, que possui 21 éxons. As seqüências de cada *primer* utilizado estão dispostas na Tabela 1.

Tabela 1 – Seqüência de *Primers* para análise de mutações por HRM no gene SLC26A4.

Éxon	Amplicon	Seqüência do <i>Primer</i>	Tamanho do amplicon (bp)
1	Ex 1	5-GGGTGGCCCCTGCGTGG-3	257
		5- CTCACCTGTCTCTGCTCGC-3	
2	Ex 2-1	5- CGTGTCCCTCCCTCCTCGCT-3	113
		5-GCGCCGCGACACCATGTAG-3	
	Ex 2-2	5-GCCGCAGCTCCCCGAGTA-3	166
		5-TTCTCTCTACGCAGGCCCGC-3	
3	Ex 3	5-GCTTTTTGACAGTTGT-3	221
		5- CTATGGTAGCTGGGG-3	
4	Ex 4-1	5-TGTAATCACTTTGCATG-3	99
		5-GTCAGGATAGGGAAAA-3	
	Ex 4-2	5-ATGGTCTCTACTCTGC-3	93
		5-GTAAATATACTTATAATTACC-3	
5	Ex 5	5-CTGATTAATTGTTAGAGACTT-3	218
		5-CCTGTATAATTCCAACCAG-3	
6	Ex 6	5-CGTAGTTGATATTTGGTGGC-3	248
		5- GGCCCAGACTCAGAGAATG-3	
7	Ex 7	5-GTGCTCGTGTGCGTGTAGC-3	212
		5-CTTACCACAATTACTTCTATAGGAA-3	
8	Ex 8	5-CATCTTTTGTGTTTATTTTCAG-3	125
		5-CTAAGAGGAACACCACAC-3	
9	Ex 9	5-CTAGGTTTTGCCTCCTGAA-3	185
		5- TATAAAACCAGTTCAGCAAAAGG-3	
	Ex 10-1	5-TTGGACCACCACGCAGAG-3	208
		5-GACGGCCGTGCGGGAA-3	
10	Ex 10-2	5-TTCTCTTGTTTTGTGGC-3	161
		5-TTGTCTGCTAAGCTC-3	
11	Ex 11	5-CCTTTTCATAGGAGGTGTGTGTC-3	133
		5- CGGTATGCAGAGAAGCAGG-3	
12	Ex 12	5-CACAGCCTTCTCTGTCT-3	146
		5-AATATAGGTGGTAGGTGACT-3	
13	Ex 13	5- ATTTTTTCCCTAGGT-3	178
		5- AGGAAGCTCAGAGTGT-3	
14	Ex 14	5-TTCCAAAATACGGCTGTTC-3	154
		5-AGTCCAGCAAATGTCTCACA-3	
15	Ex 15	5-TTGAAATTATTTAATCCCAGACAA-3	179
		5-TCTCAAAAGAGGTTAGAAAACAAAT-3	
16	Ex 16	5-TTGACATTTATTTCCAA-3	141
		5-GGGGGAAAAGAAAGATGTC-3	
17	Ex 17-1	5-GACAATTAAGTTGACAGTGTT-3	182
		5- GGAACGTTCACTTTGACT-3	

Continua.

Tabela 1 – Seqüência de *Primers* para análise de mutações por HRM no gene SLC26A4.

Conclusão.

Éxon	Amplicon	Seqüência do <i>Primer</i>	Tamanho do amplicon (bp)
17	Ex 17-2	5-GTGGATTGGAACCTCTGAGC-3	150
		5- GTATAATTCAGAAAACCAGAACC-3	
18	Ex 18	5-GAATTATGGGCAGATAAGG-3	159
		5-GGCTTACGGGAAAGTCTT-3	
19	Ex 19-1	5-TGAGCAATGATGCCAC-3	247
		5-AACCTTGACCCTCTTGAG-3	
	Ex 19-2	5-GGTTCTTTGACGACAACA-3	150
		5-AAAAGATACATCTGTAGAAAG-3	
20	Ex 20	5-TGCTATTCTATTTCTACC-3	142
		5-TTCAGAAGAAAATGATCAT-3	
21	Ex 21	5-ATCAACACTTTGTTTTCC-3	91
		5-TATTCCTTGCTCATAGAG-3	

“pb” significa tamanho em pares de bases.

O total de 26 pares de *primers* utilizados foram adaptados a partir das seqüências de *primers* utilizados por Chen et al. (2011), em seu estudo de mutações neste mesmo gene através da técnica de *High Resolution Melting* (HRM). Os *primers* foram otimizados para este estudo utilizando a ferramenta PCR *in silico* oferecida pelo *UCSC Genome Browser website*⁶. As seqüências geradas foram desenhadas com o objetivo de gerar *amplicons* de um tamanho máximo aproximado de 250pb, a fim de maximizar o potencial de detecção de variantes pelo HRM. Para tanto, éxons maiores foram divididos em *amplicons* menores, como é o caso dos éxons 2, 4, 10, 17 e 19 (ver Tabela 1). Os *primers* também foram otimizados levando em consideração o padrão de curvas de *melting* obtidas utilizando-se o *Melting Curve Predictions Software*⁷, através da adaptação das seqüências iniciadoras até que se obtivesse um *amplicon* que originasse uma curva de padrão o mais retilíneo possível.

Após isso, a fim de padronizar as reações de amplificação para encaminhar as amostras para análise por HRM, todos os pares de *primers* foram testados quanto a diferentes temperaturas de *annealing*, seguindo mix e ciclo padrões (Tabela 2 e Tabela 3), até que se obtivesse uma amplificação específica daquela

⁶ <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start;>

⁷ <https://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html>.

região, verificada em gel de Agarose a 1,2%. Todas as reações de padronização foram realizadas utilizando-se duas amostras controle para mutações no gene SLC26A4, a fim de garantir a especificidade da reação.

Tabela 2 – Mix utilizado para a padronização de cada par de *primer*.

Reagentes	Volume utilizado (µL)
H ₂ O	14,45
Tampão Uniscience® 10x	2,5
MgCl ₂ Uniscience®	0,75
dNTP (1,25 mM)	2
<i>Primer Forward</i> (2,5 nM)	1,5
<i>Primer Reverse</i> (2,5 nM)	1,5
Taq Uniscience®	0,3
DNA (100 µg/µL)	2

Tabela 3 – Ciclo utilizado para a obtenção dos amplicons.

Estágio	Temperatura (°C)	Tempo	Número de Ciclos
Desnaturação inicial	94	5'	1
Desnaturação	94	1'	
<i>Annealing</i>	T.a.*/ <i>Primer</i>	1'	35
Extensão	72	1'	
Extensão final	72	5'	1
Final	4	∞	1

T.a.* Corresponde à temperatura de *annealing* encontrada, específica para cada par de *primer*.

3.5 High Resolution Melting (HRM)

Após a padronização dos *primers*, foi realizada a reação de *High Resolution Melting* (HRM) utilizando o aparelho Applied Biosystems® 7500 *Real-Time PCR Systems*, bem como o reagente MeltDoctor™ *HRM Master Mix*, do mesmo fabricante, para a reação. Foram preparadas alíquotas de trabalho das amostras teste (n=88) e das duas amostras controle, a 5ng/µL para a reação. A reação se deu a partir da preparação de placas de 96 poços, utilizando 10 µL de

MeltDoctor™, 2,4 µL de *primer forward* (2,5 µM), 2,4 µL de *primer reverse* (2,5 µM), 4,0 µL da alíquota de DNA teste ou controle (5ng/µL) e 1,2 µL de água autoclavada, totalizando um volume de 20 µL por poço. Cada placa continha pelo menos um poço com a amostra “branco”, com a adição de todos os reagentes, exceto o DNA, para controle da reação. Os ensaios foram realizados em duplicatas técnicas. A reação se deu utilizando o *software* Applied Biosystems® 7500 *Fast Real Time PCR* e ocorreu em seis passos, compreendidos em desnaturação por 15 segundos a 95 °C, e *annealing*/extensão à temperatura específica de cada *primer* por um minuto, por 40 ciclos; e construção da curva de *melting*/dissociação: desnaturação a 95 °C por 10 segundos, *annealing* a 60 °C por um minuto, *melting* de alta resolução, a 95 °C por 15 segundos e *annealing* a 60 °C por 15 segundos.

A análise das curvas de *melting* resultantes se deu a partir da normalização das curvas brutas e análise por comparação às curvas controles, utilizando o *Applied Biosystems® High Resolution Melt (HRM) Software v2.0*. Após análise/triagem, aquelas amostras que evidenciaram padrões distintos das curvas controles foram sub-classificadas de acordo com seus padrões de curvas observados e então, levadas para seqüenciamento pelo método de Sanger.

3.6 Seqüenciamento de amostras triadas

As amostras triadas para mutações por HRM, após serem sub-classificadas de acordo com os padrões de curvas observados, foram purificadas do produto da reação de HRM utilizando o Kit Wizard® SV *Gel and PCR Clean-Up System*, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Após isso as amostras foram submetidas à análise qualitativa por eletroforese em Agarose a 1,2% e, quantificadas, sendo consideradas as amostras com as razões de pureza entre 1,8-2,0 (260/280) e 2,0-2,2 (260/230).

A reação de seqüenciamento se deu utilizando o seqüenciador automático 3500 XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®), que utiliza a metodologia de Sanger. Nas reações de seqüenciamento foram utilizados: 1 a 2 µL do produto de purificação do HRM; 2 µL de BigDye® *Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*; 2 µL

de 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems); 1 µL de *primer* e água a completar o volume de 10 µL. Os parâmetros das reações de seqüenciamento utilizados foram: 95°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, cada. Após isso, ocorreu a precipitação das amostras, seguindo o seguinte protocolo: adição de 40 µL de isopropanol 75% por poço, seguida de agitação no vórtex e descanso da placa à temperatura ambiente (T.A.) por 20 minutos. Em seguida as amostras eram centrifugadas a 13.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante era então desprezado e adicionados 200 µL de etanol 70% por poço, centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante era descartado e então eram adicionados 200 µL de etanol 70%, seguindo novamente com centrifugação. O sobrenadante era novamente descartado e deixava-se a placa secar *overnight* à T.A., protegida da luz, até o momento em que ocorresse a corrida de seqüenciamento.

As análises das seqüências obtidas foram realizadas utilizando o *software* Geneious R7 v7.1, através do qual os fragmentos obtidos por seqüenciamento capilar foram mapeados à seqüência referência NM_000441.1 - GRCh37/hg19 do genoma humano.

3.7 Ensaio de clonagem no vetor pCR®2.1-TOPO® TA

Foi realizado um novo PCR do éxon 1 da amostra em teste, para que fosse realizado o ensaio de clonagem com produto de amplificação fresco. Após isso a amostra foi verificada em gel de Agarose a 1,2% contendo brometo de etídio, para visualização da banda correspondente ao *amplicon* (257pb). A clonagem dos produtos da PCR fresca foi realizada utilizando o vetor *pCR®2.1-TOPO® TA vector* (Invitrogen®). Para esta reação, foram misturados 1 µL do produto de PCR, 1 µL do vetor, 1 µL da solução salina diluída a 1:4 e 3 µL de água autoclavada. A reação foi incubada por 30 minutos à T.A.. Em seguida 2 µL de cada reação foi adicionada a 50 µL de bactérias eletrocompetentes *One Shot® TOP10 Competent Cells* (Invitrogen®). Estas foram eletroporadas em cubetas (Fisher Scientific®) a 2500 V, 200 Ω e 25 F no *Gene Pulser II®* (Bio-Rad) e logo em seguida foram transferidas

para 500 µL de meio LB (Luria Bertani: 1% de triptona, 1% de NaCl e 0,5% de extrato de levedura) e foram então deixados por 45 minutos em estufa a 37°C com agitação de 200 rpm. Posteriormente, foram adicionados mais 500 µL de meio às bactérias e então, 400 µL da mistura foi inoculado em placas contendo meio LB sólido acrescido de ampicilina 100 µg/mL e X-Gal (40 µg/mL). As placas foram deixadas *overnight* em estufa a 37°C.

Após o período de incubação, houve a formação de colônias isoladas de coloração branca e azul, daquelas brancas, que haviam sido transfectadas com os fragmentos de interesse, 12 foram repicadas em uma placa de 96 poços (12 poços sendo inoculada uma colônia por poço) contendo meio LB líquido acrescido de ampicilina 100 µg/mL. Estas foram deixadas em estufa a 37°C *overnight*. Após isso, 1 µL do conteúdo de cada um dos 12 poços, foi utilizado para reação de PCR utilizando os *primers* e ciclagem específicos para amplificação do éxon 1, amplificando assim, apenas a região de interesse. As colônias positivas (brancas) foram congeladas para uso posterior à -20°C na presença de glicerol 70%.

Os produtos destas PCRs foram checados por meio de uma corrida de eletroforese em gel de Agarose 1,2% contendo brometo de etídio. Os produtos de PCR, que continham bandas de tamanho aproximado de 257pb, foram analisados por seqüenciamento pela metodologia de Sanger. O seqüenciamento foi realizado com 0,5 µL das amostras de PCR no seqüenciador automático 3500 XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®), utilizando o *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, segundo recomendações do fabricante. As seqüências obtidas dos fragmentos inseridos no vetor foram analisadas utilizando o programa Geneious R7 v7.1 sendo alinhadas à seqüência referência NM_000441.1 - GRCh37/hg19 do genoma humano.

3.8 Análises *in silico*

Foram realizadas análises *in silico* utilizando diversas ferramentas para predição da perturbação da funcionalidade/patogenicidade gênica/protéica. As

ferramentas *Sift Score*⁸, *PolyPhen-2*⁹ e *Mutpred*¹⁰, foram utilizadas para a predição de patogenicidade das variantes não-sinônimas identificadas. Em seguida foram utilizados os *softwares* *FunSeq*¹¹ e *RegulomeDB*¹², para a predição da perturbação da funcionalidade para aquelas alterações em regiões não codificantes (éxon 1). Foi utilizada a ferramenta *Project Hope Server*¹³, para a caracterização funcional daquelas mutações ainda não descritas. O *ClustalW2*¹⁴ (EMBL-EBI), foi um *software* de alinhamento de seqüências de aminoácidos dentre diferentes espécies para que se pudesse inferir a respeito da conservação evolutiva dos aminoácidos mutados. As ferramentas *Berkeley Drosophila Genome Project*¹⁵ e *Human Splicing Finder*¹⁶ (*HSF*) v2.4.1 também foram utilizadas para análise de uma mutação sinônima a fim de aferir se a troca nucleotídica envolvia sítios de *splicing*.

⁸ <http://sift.jcvi.org/>;

⁹ <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>;

¹⁰ <http://mutpred.mutdb.org/>;

¹¹ <http://funseq.gersteinlab.org/upload/>;

¹² <http://regulome.stanford.edu/>;

¹³ <http://www.cmbi.ru.nl/hope/home>;

¹⁴ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>;

¹⁵ http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html;

¹⁶ <http://www.umd.be/HSF/>.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização clínica da série de casos estudada

Para os 88 pacientes estudados, foram coletadas informações clínicas a respeito do grau de perda auditiva, progressão da surdez, exposição a fatores não-genéticos relacionados à surdez tais como infecções intra-uterinas, histórico de meningite e otites de recorrência, hiperbilirrubinemia, consanguinidade entre os pais e histórico familiar de surdez. Todos os resultados para os 88 pacientes estão dispostos no Apêndice A, e um sumário é apresentado na Tabela 4. A maioria dos casos estudados era portadora de surdez profunda (55,7%), severa (20,4%) e moderada (11,4%). Aproximadamente 87,5% dos indivíduos apresentaram surdez não progressiva; 28,4% relataram a presença de casos de surdez na família. Aproximadamente 13,6% da série de casos relatou consanguinidade entre os pais (ver Tabela 4), número relativamente baixo, relacionado aos 52,2% encontrados por Manzoli et al. (2013) em seu grupo de pacientes com surdez no Nordeste brasileiro. Fatores de risco para a surdez foram descritos em 26,1% da série de casos estudada, dos quais a presença de otites de recorrência (7,9%) e prematuridade (10,2%) foram aqueles relatados com mais frequência (Tabela 4). Em um paciente, foi citada a suspeita para Síndrome de Usher (Paciente 2642) e outro apresentava a Síndrome do Aqueduto Vestibular Alargado (SAVA) (Paciente 3100).

Tabela 4 – Caracterização clínica da série de casos estudada (n=88).

CARACTERÍSTICA	FREQUÊNCIA
Grau de perda auditiva	
Moderada	10/88 – 11,4%
Moderadamente Severa	3/88 – 3,4%
Moderada a Profunda	1/88 – 1,1%
Severa	18/88 – 20,4%
Profunda	49/88 – 55,7%
Profunda a Anacusia	5/88 – 5,7%
NR	2/88 – 2,3%
Progressão	
Progressiva	11/88 – 12,5%
Não-Progressiva	77/88 – 87,5%
Histórico Familiar	
Caso familiar	25/88 – 28,4%
Consanguinidade	12/88 – 13,6%
Fatores de risco	
	23/88 – 26,1%
Baixo peso ao nascer	4/88 – 4,5%
Hiperbilirrubinemia	4/88 – 4,5%
Infecções intra-uterinas*	3/88 – 3,4%
Malformação das orelhas	1/88 – 1,1%
Prematuridade	9/88 – 10,2%
Otites de recorrência	7/88 – 7,9%
NA	65/88 – 73,9%
Outros achados	
SAVA	1/88 – 1,1%
Suspeita de Síndrome de Usher	1/88 – 1,1%

“NR” refere-se à informação não relatada. *Dentre as infecções intra-uterinas: toxoplasmose, meningite e rubéola. “NA” refere-se aos pacientes que não apresentaram fatores de risco. “SAVA” corresponde a Síndrome do Aqueduto Vestibular Alargado.

4.2 Análise Molecular

Através da investigação molecular dos genes GJB2, GJB6, MT-RNR1 e SLC26A4 foram identificadas dezessete diferentes variantes em 40,9% (36/88) indivíduos da série de casos estudada (Tabela 5). Dados preliminares foram obtidos da análise da região codificante do gene GJB2 por seqüenciamento pela metodologia de Sanger, de duas deleções del(GJB6-D13S1830) e del(GJB6-D13S1854) no gene GJB6 por PCR multiplex, bem como da análise de duas mutações mitocondriais (MT-RNR1) m.1555A>G e m.961delT por PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) utilizando as enzimas de restrição HaeIII e MnlI, respectivamente.

Dezesseis pacientes (18,1%) evidenciaram mutações nos genes GJB2 e GJB6: quatro variantes no primeiro e as duas deleções estudadas no GJB6. A análise prévia do gene mitocondrial MT-RNR1 não evidenciou nenhuma das duas mutações nos pacientes estudados (ver Tabela 5).

Até o momento foram descritas 472 mutações no gene SLC26A4, de acordo com o *The Human Gene Mutation Database* (STENSON et al., 2014) das quais a maioria corresponde a mutações *missense*, em sítios de *splicing* e pequenas inserções e deleções. Em nosso estudo, através da análise dos 21 éxons do gene SLC26A4 por HRM e seqüenciamento Sanger, foram identificadas 11 variantes em 25 pacientes (28,4%) (Tabela 5), dentre elas, duas na região promotora do gene (éxon 1), uma mutação sinônima e as demais, *missense*. Dentre tais mutações, 8 já foram descritas e 3 constituem novas mutações, elevando para 475 o número de mutações conhecidas neste gene. Um paciente que evidenciou SAVA, no entanto, não apresentou alteração para este gene, nem para os demais.

Tabela 5 – Genótipos e mutações encontrados nos genes GJB2, GJB6, MT-RNR1 e SLC26A4 na série de casos estudada de pacientes portadores de surdez neurossensorial não-sindrômica pré-lingual hereditária.

Alterações Moleculares (gene)	Frequência
GJB2	
c.35delG/c.35delG	3/88 – 3,4%
c.35delG/ <i>wt</i>	2/88 – 2,3%
p.Arg127Cys/ <i>wt</i>	1/88 – 1,1%
c.35delG/p.Arg184Trp	1/88 – 1,1%
GJB6	
del(GJB6-D13S1830)/ <i>wt</i>	2/88 – 2,3%
del(GJB6-D13S1854)/ <i>wt</i>	0/88 – 0%
Duplo Heterozigoto GJB2/GJB6	
c.35delG /del(GJB6-D13S1854)	2/88 – 2,3%
MT-RNR1	
m.1555A>G	0/88 – 0%
m.961delT	0/88 – 0%
SLC26A4	
chr7:g.107301238C>G/ <i>wt</i>	6/88 – 6,8%
p.Gly5Gly/ <i>wt</i>	1/88 – 1,1%
p.Ala189Ser/ <i>wt</i>	1/88 – 1,1%
p.Ile254Val/ <i>wt</i> *	1/88 – 1,1%
p.Ile300Leu/ <i>wt</i>	3/88 – 3,4%
p.Asn324Tyr/ <i>wt</i>	1/88 – 1,1%
p.Asn382Lys/ <i>wt</i> *	1/88 – 1,1%
p.Val609Gly/ <i>wt</i>	2/88 – 2,3%
chr7:g.107301201T>C/chr7:g.107301238C>G	1/88 – 1,1%
chr7:g.107301238C>G/p.Gly139Arg *	1/88 – 1,1%
chr7:g.107301238C>G/p.Val609Gly	2/88 – 2,3%

Continua.

Tabela 5 – Genótipos e mutações encontrados nos genes GJB2, GJB6, MT-RNR1 e SLC26A4 na série de casos estudada de pacientes portadores de surdez neurossensorial não-sindrômica pré-lingual hereditária.

Conclusão.

Alterações Moleculares (gene)	Frequência
Duplo Heterozigoto SLC26A4/GJB2	
chr7:g.107301238C>G/c.35delG	1/88 – 1,1%
p.Val609Gly/p.Val27Ile	1/88 – 1,1%
Heterozigoto SLC26A4 / Homozigoto GJB2	
chr7:g.107301238C>G / c.35delG/c.35delG	1/88 – 1,1%
p.Leu597Ser / c.35delG/c.35delG	1/88 – 1,1%
Heterozigoto composto SLC26A4 / Duplo Heterozigoto GJB2-GJB6	
chr7:g.107301238C>G/p.Asn324Tyr / c.35delG /del(GJB6-D13S1854)	1/88 – 1,1%
Total	36/88 – 40,9%

A sigla “*wt*” indica a presença de um segundo alelo normal (*wild type*). O sinal * indica as novas mutações identificadas neste estudo.

A patogenicidade das mutações *missense* foi verificada através de três ferramentas de predição *in silico*. Índices elevados para os três softwares de análise utilizados foram identificados para duas das variantes encontradas no gene GJB2 (p.Arg127Cys e p.Arg184Trp) e para quatro no gene SLC26A4 (p.Gly139Arg; p.Ile300Leu; p.Asn324Tyr e p.Asn382Lys), sendo estas, consideradas como potencialmente patogênicas em nosso estudo (ver Tabela 6).

Tabela 6 – Predição de patogenicidade das alterações moleculares encontradas por seqüenciamento das regiões codificantes dos genes GJB2 e SLC26A4.

Alteração	Gene	Éxon	Peptídeo	Frequência	ID dbSNP	SIFT score*	PolyPhen-2†	MutPred‡
p.Val27Ile	GJB2	1	V27I	1/88 – 1,1%	rs2274084	0,21	1,000	0,291
p.Arg127Cys γ	GJB2	1	R127C	1/88 – 1,1%	—	0,05	0,994	0,764
p.Arg184Trp γ	GJB2	1	R184W	1/88 - 1,1%	—	0,00	1,000	0,922
p.Gly5Gly	SLC26A4	2	G5G	1/88 - 1,1%	rs7811324	1,00	—	—
p.Gly139Arg γ	SLC26A4	4	G139R	1/88 - 1,1%	—	0,00	1,000	0,981
p.Ala189Ser	SLC26A4	5	A189S	1/88 - 1,1%	rs35045430	0,30	0,296	0,764

Continua.

Tabela 6 – Predição de patogenicidade das alterações moleculares encontradas por seqüenciamento das regiões codificantes dos genes GJB2 e SLC26A4.

Conclusão.

Alteração	Gene	Éxon	Peptídeo	Frequência	ID dbSNP	SIFT score*	PolyPhen-2†	MutPred‡
p.Ile254Val	SLC26A4	6	I254V	1/88 - 1,1%	—	0,62	0,939	0,672
p.Ile300Leu γ	SLC26A4	7	I300L	3/88 - 3,4%	rs111033304	0,00	0,972	0,790
p.Asn324Tyr γ	SLC26A4	8	N324Y	2/88 - 2,3%	rs36039758	0,01	0,997	0,864
p.Asn382Lys γ	SLC26A4	9	N382K	1/88 - 1,1%	—	0,00	1,000	0,921
p.Leu597Ser	SLC26A4	16	L597S	1/88 - 1,1%	rs55638457	0,00	0,999	0,687
p.Val609Gly	SLC26A4	17	V609G	5/88 - 5,7%	rs17154335	0,54	0,000	0,263

*Intervalos de 0 a 1. A substituição do aminoácido é predita como patogênica se o score é $\leq 0,05$; e benigna quando o score é $> 0,05$. †Intervalos de 0 a 1. A substituição do aminoácido é predita como patogênica se o score é $> 0,5$; e benigna quando o score é $< 0,5$. ‡Intervalos de 0 a 1. Scores com $g > 0,5$ referem-se a uma hipótese contestável. Scores com $g > 0,75$ referem-se a uma hipótese confiável. Em vermelho, scores relativos ao que é predito como patogênico. γ Alterações consideradas como patogênicas em nosso estudo.

As ferramentas utilizadas constituem métodos úteis para predição de patogenicidade das alterações, no entanto, a comparação entre elas pode tornar-se limitada levando-se em consideração que cada uma utiliza diferentes informações e algoritmos no momento da predição de patogenicidade (DONG et al., 2015). A ferramenta SIFT score (*Sorting Intolerant from Tolerant*) prediz uma mutação como tolerada ou deletéria levando em consideração o impacto da substituição do aminoácido na funcionalidade protéica e conseqüentes mudanças fenotípicas (MOHAMOUD et al., 2014). Para isso o *software* baseia-se na homologia entre seqüências e os scores são calculados a partir de matrizes “posições-específicas” utilizando a distribuição de Dirichlet (NG; HENIKOFF, 2006). Devido ao seu poder preditivo e simplicidade, o SIFT é utilizado também como ponto de referência para outras ferramentas (LI et al., 2009).

Já o PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping-2*) este é um método que utiliza probabilidade e calcula a significância funcional de determinada mudança alélica através do classificador Naïve Bayes, reportando estimativas de falsos e verdadeiros positivos. Tal ferramenta baseia-se essencialmente na análise do alinhamento com proteínas homólogas, em quão distante a proteína está funcionalmente daquela mutada, e se a mutação foi gerada em algum sítio hipermutável (ilhas CpG, por exemplo), utilizando anotações da base de dados

UniProtKB/Swiss-Prot¹⁷ (ADZHUBEI; JORDAN; SUNYAEV, 2013; MOHAMOUD et al., 2014).

A ferramenta Mutpred, também utilizada neste estudo, assim como as demais, baseia-se na seqüência protéica, levando em consideração as mudanças estruturais e funcionais na proteína, expressas em probabilidade de ganho ou perda de função, o que permite a sugestão de possíveis mecanismos relacionados àquele fenótipo. A predição é realizada tomando a ferramenta SIFT como base, entretanto, com uma classificação de maior acurácia (LI et al., 2009).

Assim, mesmo se tratando de ferramentas diferentes, todas utilizam pelo menos um algoritmo em comum, o de homologia com outras seqüências protéicas. Mesmo assim, a fim de complementar a análise de patogenicidade para aquelas variantes que só apresentaram índices elevados somente para uma ou duas das ferramentas utilizadas, foi realizado o alinhamento de seqüências da proteína pendrina dentre 8 espécies diferentes para constatação da conservação evolutiva daqueles aminoácidos que foram modificados. Para isso foi utilizada a ferramenta ClustalW2 (EMBL-EBI) *Multiple Sequence Alignment*. Sete das oito variantes *missense* identificadas em nosso estudo no gene SLC26A4 constituem trocas de aminoácidos altamente conservados dentre várias espécies (ver Figura 2).

¹⁷ <http://www.uniprot.org/>.

Figura 2. Conservação evolutiva das variantes identificadas através do sequenciamento dos 21 éxons do gene SLC26A4 pela metodologia de Sanger. Alinhamento realizado dentre 8 seqüências da proteína de mamíferos e aves, utilizando o programa ClustalW2 (EMBL-EBI) baseado nas seguintes seqüências referência, respectivamente: *Homo sapiens* (NP_000432.1), *Pan troglodytes* (XP_519308.2), *Macaca mulatta* (XP_001094049.1), *Bos taurus* (XP_010802535.1), *Canis lupus familiaris* (XP_540382.3), *Rattus norvegicus* (NP_062087.1), *Mus musculus* (NP_035997.1) e *Gallus gallus* (XP_425419.3). Os aminoácidos conservados estão representados pela cor vermelha e a cor verde, representa a mutação de um aminoácido não conservado evolutivamente (p.V609G).

Para as três novas mutações identificadas neste estudo no gene SLC26A4 (p.Gly139Arg, p.Ile254Val e p.Asn382Lys) foi conduzida ainda, uma análise utilizando a ferramenta *Project HOPE Web Server (Have (y)Our Protein Explained)*. Tal *software* realiza um BLAST na seqüência submetida e utiliza as bases de dados UniProt e *Protein Data Bank* a fim de prover informações sobre as mutações não sinônimas, tais como: diferenças entre os aminoácidos selvagem e mutado quanto à localização, tamanho, carga, hidrofobicidade, domínios protéicos e conservação evolutiva, dentre outras informações (VENSELAAR et al., 2010).

Foi realizada também, uma análise *in silico* da funcionalidade protéica para as duas alterações encontradas na região não codificante (éxon 1). Para isso foram utilizadas duas ferramentas: FunSeq (*Function based Prioritization of Sequence Variants*) e RegulomeDB. Para ambas as ferramentas utilizadas, as duas mutações evidenciaram baixos scores relacionados à perturbação da funcionalidade. Mesmo

assim, foram enumeradas atividades relacionadas às regiões mutadas, o que sugere a perturbação das mesmas quando há a mutação (ver Tabela 7).

Tabela 7 – Análise da funcionalidade das mutações chr7:g.107301201T>C e chr7:g.107301238C>G através das ferramentas FunSeq e RegulomeDB.

Mutação	ID dbSNP	score FunSeq [†]	score Regulome DB [*]	Caracterização da região
chr7:g.107301201T>C	rs60284988	2	5	Sítio DHS, ligação de <i>enhancers</i> e fatores de transcrição (ELF1, RAD21, REST, ZEB1, CTCF). Relacionada à estrutura da cromatina e modificações de histonas.
chr7:g.107301238C>G	rs17154282	2	4	Ligação de <i>enhancers</i> e fatores de transcrição (ELF1, RAD21, REST, ZEB1, CTCF). Região de ligação de proteínas, relacionada à estrutura da cromatina e modificações de histonas.

[†]Os scores para cada tipo de variante na região não-codificante variam entre 0 e 6, sendo “6” o score correspondente ao máximo efeito deletério. ^{*}Scores de 1a – 6, em que “1a” fornece um maior número de evidências, tornando a inferência mais confiável e “6”, o menor número de evidências para aquela inferência.

A ferramenta FunSeq é empregada principalmente para análise de variantes em regiões não codificantes, porém sua utilização para a análise de regiões codificantes também é possível. As mutações são primeiramente filtradas com base nas variantes anotadas no *1000 Genomes Project Consortium* (1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2012), priorizando aquelas em regiões sob forte seleção (sítios sensíveis e hipersensíveis) e aquelas relacionadas a regiões de ligação de fatores de transcrição, por exemplo. O potencial patogênico das mutações pode ser verificado em um único ou em vários genomas, gerando resultados de fácil manipulação (KHURANA et al., 2013).

Já o RegulomeDB, possibilita a inferência funcional de variantes identificadas por sequenciamento genômico ou estudos de todo o genoma (GWAS), sendo capaz de inferir quais variantes estão relacionadas a funções regulatórias e através de quais mecanismos. Para isso, a ferramenta utiliza informações de regiões experimentalmente relacionadas à regulação; informações de ChIP-seq de fatores de regulação e estado cromatínico dentre diferentes tipos celulares e *loci* associados a traços quantitativos de expressão (eQTL - *expression Quantitative Trait Loci*) que permitem a associação de sítios distais à regiões promotoras. Ainda, em adição a estes dados experimentais, informações *in silico* também são utilizadas, como dados de sítio de hipersensibilidade à DNase (DHS) a fim de evidenciar onde as proteínas podem se ligar e assim inferir sobre possíveis alterações em sítios de ligação em decorrência das mutações (BOYLE et al., 2012).

Dentre as 17 variantes identificadas, as mutações p.35delG em GJB2, del(GJB6-D13S1830) e del(GJB6-D13S1854), no gene GJB6, já são relatadas como patogênicas e relacionadas à surdez hereditária (DEL CASTILLO, et al., 2002, 2005). Através das análises *in silico* realizadas, duas daquelas alterações identificadas em GJB2 (p.Arg127Cys e p.Arg184Trp) e cinco identificadas em SLC26A4 (chr7:g.107301201T>C; p.Gly139Arg; p.Ile300Leu; p.Asn324Tyr e p.Asn382Lys) foram aqui sugeridas como patogênicas. Estas mutações estavam presentes em aproximadamente 23,9% dos indivíduos da série de casos estudada. Levando em consideração os genótipos encontrados, 19,3% (17/88) dos pacientes estudados apresentaram genótipos aqui sugeridos como patogênicos e considerados como responsáveis pelo estabelecimento da surdez hereditária naqueles pacientes. Os genótipos estão dispostos na Tabela 8 e serão discutidos de forma mais detalhada nas seções seguintes.

Tabela 8 – Genótipos considerados como patogênicos nos genes GJB2, GJB6 e SLC26A4 após as análises *in silico* de patogenicidade, sugeridos como responsáveis pelo estabelecimento do fenótipo.

Genótipos	Frequência
GJB2	
c.35delG/c.35delG	3/88 – 3,4%
c.35delG/p.Arg184Trp	1/88 – 1,1%
Duplo Heterozigoto GJB2/GJB6	
c.35delG /del(GJB6-D13S1854)	2/88 – 2,3%
SLC26A4	
p.Ile300Leu/ <i>wt</i>	3/88 – 3,4%
p.Asn324Tyr/ <i>wt</i>	1/88 – 1,1%
p.Asn382Lys/ <i>wt</i> *	1/88 – 1,1%
chr7:g.107301201T>C/chr7:g.107301238C>G	1/88 – 1,1%
chr7:g.107301238C>G/p.Gly139Arg*	1/88 – 1,1%
Duplo Heterozigoto SLC26A4/GJB2	
chr7:g.107301238C>G/c.35delG	1/88 – 1,1%
Heterozigoto SLC26A4/Homozigoto GJB2	
chr7:g.107301238C>G / c.35delG/c.35delG	1/88 – 1,1%
p.Leu597Ser / c.35delG/c.35delG	1/88 – 1,1%
Heterozigoto composto SLC26A4/Duplo Heterozigoto GJB2-GJB6	
chr7:g.107301238C>G/p.Asn324Tyr / c.35delG /del(GJB6-D13S1854)	1/88 – 1,1%
Total	17/88 – 19,3%

A sigla “*wt*” indica a presença de um segundo alelo normal (*wild type*). O sinal * indica as novas mutações identificadas neste estudo.

4.3 Análise molecular para os genes GJB2, GJB6 e MT-RNR1

A prevalência de mutações nos genes GJB2, GJB6 e MT-RNR1 foi de 18,2%. Entretanto, genótipos que possam justificar o estabelecimento da surdez só foram observados em 10,2% da série de casos estudada (Tabela 8). Ou seja, em 89,8% dos casos (79/88) não foi possível estabelecer o diagnóstico molecular para a surdez hereditária através da análise destes três genes.

Mutações bialélicas no gene GJB2 são consideradas fatores determinantes para o estabelecimento da surdez hereditária, sendo responsáveis por aproximadamente 50% dos casos de surdez recessiva. Aproximadamente 70% destes casos, apresentam a mutação c.35delG (MOTTA et al., 2012). Em nosso estudo, 5,7% (5/88) da série de casos apresentou a mutação c.35delG em homozigose. Destes, dois pacientes relataram consanguinidade entre os pais, o que justifica o genótipo homozigoto evidenciado por estes pacientes.

Em um paciente (Paciente 2282) foi observada heterozigose composta de c.35delG e p.Arg184Trp, esta última uma mutação predita como patogênica pelos três *softwares* de análise utilizados neste estudo (Sift Score, PolyPhen-2 e Mutpred), o que pode sugerir seu papel no estabelecimento do fenótipo. Wilcox et al. (2000) e Chora et al. (2010) também relataram tal mutação em heterozigose composta em sua série de casos estudados, mas não discutem a respeito de sua patogenicidade, apesar de acreditarem em sua contribuição para a surdez hereditária.

Três indivíduos (3,4%) apresentaram dupla heterozigose com o gene GJB6, c.35delG/del(GJB6-D13S1854) (ver Tabela 5). Acredita-se que tal deleção em GJB6 quando em *trans* com GJB2 pode justificar a perda auditiva por envolver um importante sítio regulatório sendo assim capaz de inativar o segundo alelo (herança monogênica), ou que as duas mutações atuem em conjunto no estabelecimento da surdez (herança digênica) (BATISSOCO et al., 2009). Em dois outros pacientes foi encontrada a deleção del(GJB6-D13S1830) em heterozigose no gene GJB6. Tal deleção de 309 Kb constitui a segunda mutação mais freqüente como causa genética de surdez pré-lingual não sindrômica relatada na Espanha, França, Israel, Grã-Bretanha e Brasil sendo freqüentemente encontrada com padrões de herança

monogênica e digênica (FREI et al., 2004; MANZOLI et al., 2013). A importância desta mutação em heterozigose para a surdez permanece duvidosa. Del Castillo et al. (2002) hipotetizam que a deleção possa envolver algum sítio importante para GJB2, uma vez que os dois genes se encontram em regiões próximas no mesmo cromossomo e assim, suprima a expressão de GJB2 ou mesmo, por promover a inativação de um segundo gene cujo produto protéico seja importante funcionalmente para a conexina 26, o que poderia levar ao fenótipo de surdez. Utrera e colaboradores (2007) ressaltam que a deleção envolve um segmento extenso da região ORF (*open reading frame*) de GJB6, que está localizada *upstream* ao gene GJB2 no cromossomo 13. Já estudos recentes têm evidenciado que tais deleções possam atuar inibindo elementos regulatórios em *cis* importantes para a expressão normal de GJB2, muito embora o mecanismo exato ainda não seja conhecido (DEL CASTILLO; DEL CASTILLO, 2011; RODRIGUEZ-PARIS et al., 2011). Tal teoria é reforçada por estudos que demonstram uma expressão reduzida da conexina 26 em animais nocauteados para conexina 30. No entanto, quando se adotava uma estratégia de manutenção da expressão da conexina 26, o fenótipo de surdez naqueles animais que não expressavam a conexina 30 não era observado. Isto prova que somente a presença das deleções em GJB6, não são suficientes para causar o fenótipo em questão, sugerindo que a expressão de conexina 26, mas não da conexina 30, é crucial para uma correta função auditiva (BOULAY et al., 2013; SANCHEZ; VERSELIS, 2014).

Batissoco et al. (2009), e Manzoli et al. (2013), ressaltam que as mutações c.35delG em homozigose, bem como em heterozigose composta com del(GJB6-D13S1830) estão quase sempre associadas a uma surdez de grau profundo a severo. Tais dados corroboram com os encontrados em nosso estudo, em que dentre os 5 casos de c.35delG/c.35delG, quatro possuíam grau de surdez profunda e um de grau profundo à anacusia.

Foi evidenciada ainda no gene GJB2, a mutação p.Arg127Cys em heterozigose em 1,1% (1/88) da série de casos estudada (Paciente 3324). Esta alteração apresentou índices sugestivos de patogenicidade para todos os *softwares* de predição utilizados (Tabela 6), o que pode sugerir sua contribuição para o fenótipo estudado. A mutação não é identificada pelo dbSNP, no entanto, já foi descrita também em heterozigose por Tang e colaboradores (2006), e em

heterozigose composta com c.35delG por Dahl et al. (2001). Não é possível atribuir a causa da surdez a esta mutação em heterozigose neste paciente, no entanto também não podemos afastar uma eventual contribuição em associação com mutações em outros genes, dado que a mutação é predita como patogênica e já foi descrita em séries de casos de surdez relatados na literatura, como colocado acima.

Quanto às alterações no gene MT-RNR1, não foram evidenciadas nenhuma das duas mutações investigadas nos 88 pacientes estudados, corroborando com os estudos de Manzoli et al. (2013) e Melo et al. (2014).

4.4 Análise molecular do gene SLC26A4

Mutações no gene SLC26A4 constituem a segunda causa mais freqüente de PANS não-sindrômica autossômica recessiva produzindo um espectro de fenótipos de surdez associados à Síndrome de Pendred (SPD) e DFNB4, freqüentemente associados à SAVA (PIQUE et al., 2014). Na série de casos estudada, a partir dos dados clínicos, foi constatado que apenas um paciente (Paciente 3100) evidenciou SAVA, porém sem alterações moleculares para o gene SLC26A4 (para consulta, ver Apêndice A). A Síndrome de Pendred, como já esperado, não foi observada em nossa série de casos uma vez que esta foi composta apenas por pacientes portadores de surdez não-sindrômica. Todos os dados clínicos e moleculares investigados para cada um dos pacientes estudados podem ser consultados na tabela disposta no Apêndice A.

As amostras de DNA foram primeiramente triadas através da observação das curvas de *melting* obtidas pela técnica de HRM. Aquelas amostras que apresentaram padrões de curvas que diferiam das curvas padrão/controle, foram levadas para o seqüenciamento para confirmação e identificação das mutações. As imagens das curvas de *melting* daquelas amostras com mutações confirmadas pelo seqüenciamento Sanger estão dispostas no Apêndice B.

A prevalência de mutações no gene SLC26A4 nos pacientes portadores de PANS não-sindrômica pré-lingual atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade

de Medicina de Ribeirão Preto foi de 28,4% (25/88). Esta alta prevalência quando comparada à prevalência de alterações nos outros genes investigados (12,5% para GJB2; 2,3% para GJB6 e; 3,4% para GJB2/GJB6), ressaltam a importância do gene SLC26A4 para o fenótipo estudado.

Embora a surdez hereditária esteja associada a um padrão de herança autossômico recessivo, a maioria das alterações identificadas no gene SLC26A4 compreende mutações monoalélicas, com uma frequência de 18,1% (16/88) (Tabela 5). Tais achados corroboram com aqueles de Pryor et al. (2005), Albert et al., (2006) e Wu et al., (2010), que relatam a presença de mutações em heterozigose de 16% a 61% em suas séries de casos estudadas. Os grupos sugerem então que as mutações monoalélicas contribuam para o estabelecimento da surdez hereditária, seja pela deleção de um ou vários éxons, não detectadas pela técnica utilizada, bem como a presença de alterações moleculares em genes regulatórios para SLC26A4 afetando a expressão da proteína pendrina no ouvido interno (ALBERT et al., 2006). Frente a estes resultados, a investigação de mutações em SLC26A4 poderia ser considerada como prioritária após a triagem inicial com GJB2, GJB6 e MT-RNR1, ou até mesmo ser considerada para investigação paralela, dada a frequência de alterações encontradas neste gene em pacientes com PANS pré-lingual.

A seguir, cada mutação encontrada neste gene, na série de casos estudada, será explorada individualmente.

4.4.1 chr7:g.107301201T>C

Tal mutação foi encontrada em heterozigose composta com a mutação chr7:g.107301238C>G em 1,1% (1/88) da população estudada (Paciente 3020). Ambas estão situadas na região de 5'-UTR do éxon 1 não-codificante do gene SLC26A4 (ver Figura 3).

A fim de se verificar se as duas mutações encontravam-se no mesmo ou em alelos diferentes, foi realizado o ensaio de clonagem utilizando o vetor pCR®2.1-TOPO® TA, onde ao final, seis clones foram levados ao seqüenciamento Sanger.

Três dos clones apresentaram a alteração chr7:g.107301201T>C e os outros três apresentaram chr7:g.107301238C>G, ambas em hemizigose, o que caracteriza a configuração *trans* destas mutações (ver Figura 4), ou seja, a presença de ambos os alelos alterados por mutações diferentes.

Figura 3. Heterozigoto composto chr7:g.107301201T>C/chr7:g.107301238C>G. (A) Padrão de curvas obtido através da análise por HRM e (B) cromatograma obtido por seqüenciamento Sanger, evidenciando a troca de um T→C na posição genômica 107301201T e (C) C→G na posição genômica 107301238, ambas no éxon 1 do gene SLC26A4.

Figura 4. Cromatogramas evidenciando as alterações encontradas em configuração *trans*. A observação é de um genótipo hemizigoto uma vez que cada clone foi derivado da transfecção de apenas um cromossomo na bactéria. Seis clones foram levados ao seqüenciamento e três apresentaram apenas a mutação chr7:g.107301201T>C (A) e três apresentaram somente a mutação chr7:g.107301238C>G (B) provando que as duas alterações estão em *trans*.

A substituição do nucleotídeo T por C na posição genômica 107301201 (NM_000441.1 - GRCh37/hg19) do cromossomo 7 (rs60284988), foi primeiramente descrita por Yang et al. (2007), sendo reportada em 2,1% (9/429) dos pacientes com fenótipos das Síndromes de Pendred e Aqueduto Vestibular Alargado (SAVA), como uma variante monoalélica não observada nos 100 indivíduos com audição normal utilizados como controle. Já Choi e colaboradores (2009), assim como em nosso estudo, também evidenciaram tal mutação em *trans*, mas com uma mutação

em outra região do gene SLC26A4 (p.L236P), em 2,1% (1/47) de indivíduos com fenótipo de SAVA bilateral. Tal alteração também não foi evidenciada nos indivíduos controle.

A análise *in silico* da funcionalidade protéica evidenciou o éxon 1 como a região promotora do gene SLC26A4 e a classifica como um sítio DHS (*DNAse hypersensitive site*), o que remete que a mutação envolva um sítio importante de ligação de proteínas. Isto sugere que chr7:g.107301201T>C pode comprometer a ligação de estruturas importantes para o processo de transcrição como *enhancers*, fatores de transcrição e proteínas regulatórias (DEGNER et al., 2012). Tal região já foi evidenciada como importante no processo de organização da cromatina, como também, responsável por modificações nas histonas. Assim, mesmo que tenham sido encontrados baixos índices para ambas as ferramentas utilizadas (Tabela 7), os dados remetem à importância desta região sugerindo que a mutação possa perturbar a funcionalidade desta região. Tal alteração envolve ainda, a troca de um nucleotídeo evolutivamente conservado dentre muitas espécies de mamíferos (ver Figura 5), o que mais uma vez ressalta a importância desta região para o gene, reforçando seu potencial patogênico.

Figura 5. Sequência nucleotídica do éxon 1 do gene SLC26A4, evidenciando o nucleotídeo “T”, na posição genômica 107301201 (NM_000441.1 - GRCh37/hg19), como conservado quando comparado com 8 outras espécies. O nucleotídeo mutado está indicado pelo retângulo de cor azul. Imagem proveniente do BLAST da região contendo a mutação no gene SLC26A4, através do *UCSC Genome Browser website*¹⁸.

¹⁸ <http://genome.ucsc.edu/>.

Estudos sobre a implicação desta mutação nesta região gênica têm evidenciado seu importante papel no processo de regulação transcricional. FOXI1 é um gene que codifica um fator de transcrição que se liga a um importante elemento de regulação transcricional na região promotora do gene SLC26A4, o sítio de ligação FBS1, que constitui um dos principais responsáveis pela ativação transcricional deste gene (PIQUE et al., 2014). Sendo assim, Yang et al. (2007), utilizando o ensaio da luciferase, demonstraram que a mutação chr7:g.107301201T>C compromete a ligação DNA - proteína uma vez que a transativação de FOXI1 era completamente prejudicada quando a mutação era introduzida na construção promotor-repórter de SLC26A4. Isto sugere mais uma vez o papel desta alteração no estabelecimento do fenótipo (YANG; SMITH, 2009). Uma vez que a PANS não-sindrômica pré-lingual trata-se de uma doença de caráter autossômico recessivo, estas duas alterações, vindas uma de cada genitor podem justificar o estabelecimento do fenótipo.

4.4.2 chr7:g.107301238C>G

A mutação chr7:g.107301238C>G (rs17154282) trata-se de uma substituição de um nucleotídeo C por um G na posição genômica 107301238 (NM_000441.1 - GRCh37/hg19) do cromossomo 7. Em nossa série de casos, constituiu a alteração mais freqüente, presente em aproximadamente 14,8% (13/88) dos indivíduos estudados. Foi encontrada em heterozigose e heterozigose composta na mesma região cromossômica (éxon 1, citada anteriormente), como em conjunto com alterações em outros éxons (p.Gly139Arg, p.Asn324Tyr e p.Val609Gly), bem como, junto a alterações nos genes GJB2 e GJB6 (ver Tabela 5), que serão exploradas mais adiante.

Tal mutação foi primeiramente descrita por Choi e colaboradores (2009), sendo encontrada em heterozigose em aproximadamente 2,1% (1/47) de sua população de estudo, não sendo observada dentre os indivíduos controle. A alteração envolve um nucleotídeo pouco conservado, presente em uma região igualmente pouco conservada evolutivamente entre mamíferos (ver Figura 6).

Figura 6. Sequência nucleotídica do éxon 1 do gene SLC26A4, evidenciando o nucleotídeo “C” na posição genômica 107301238 (NM_000441.1 - GRCh37/hg19) como não conservado, quando comparado com 8 outras espécies. O nucleotídeo mutado está indicado pelo retângulo de cor azul. Imagem proveniente do BLAST da região contendo a mutação no gene SLC26A4, através do *UCSC Genome Browser website*¹⁹.

Esta mutação na região 5'UTR do gene SLC26A4 foi aquela mais prevalente no estudo de Kallel et al. (2013) que avaliaram, no entanto, o perfil de mutações em pacientes com doenças auto-imunes envolvendo a tireóide. Entretanto, o grupo ressaltou chr7:g.107301238C>G como um polimorfismo não patogênico presente em aproximadamente 8,8% (5/57) da população utilizada como controle. Embora o grupo evidencie a alteração como benigna. A frequência alélica desta alteração na população mundial gira em torno de 9%, variando de 30 a 43% na população Africana (1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2012). A alta frequência de chr7:g.107301238C>G em nossa série de casos estudada, pode ser explicada pela composição da população brasileira, com forte componente afrodescendente.

Dados da análise *in silico* utilizando as ferramentas FunSeq e RegulomeDB evidenciaram scores de 2 (1-6) e 4 (1b-6) para perturbação da funcionalidade da região, respectivamente. Os scores observados foram relativamente baixos, mesmo assim os dados sugerem a região como importante para a ligação de proteínas, *enhancers* e fatores de transcrição (ELF1, RAD21, REST, ZEB1, CTCF), sendo relacionada como região regulatória da estrutura da cromatina e modificações de histonas (ver Tabela 7). Como a patogenicidade desta mutação permanece duvidosa, estudos caso-controle ou de segregação, bem como

¹⁹ <http://genome.ucsc.edu/>.

funcionais seriam úteis para caracterizar o papel da mutação chr7:g.107301238C>G no estabelecimento do fenótipo estudado.

Dentre os casos analisados, foi observado um paciente (Paciente 3301) que apresentou esta mutação em heterozigose, bem como a mutação c.35delG em homozigose no gene GJB2. Esta última, por sua vez, confere o fenótipo de surdez hereditária.

Houve também, um caso (Paciente 2264) de dupla heterozigose da mutação chr7:g.107301238C>G com a mutação c.35delG (ver Tabela 5). A deleção c.35delG é considerada a mutação associada à surdez não-sindrômica mais freqüente em diferentes populações, sendo encontrada em homozigose entre 10% a 63% dos casos. Entretanto, a alta freqüência de heterozigotos em pacientes surdos tem sido relatada em muitos estudos, sugerindo a existência de uma segunda mutação no gene GJB2 ou em outros genes relacionados à função auditiva (BECK; CARMELO, 2014; MELO et al., 2014; SALVAGO et al., 2014). Assim, acreditamos que a dupla heterozigose das mutações chr7:g.107301238C>G e c.35delG podem justificar a surdez neste paciente.

Analisando-se os dados clínicos, dois dos seis pacientes que apresentaram esta mutação em heterozigose relataram a presença de casos de surdez entre os irmãos (Paciente 2644) e em um primo (Paciente 3108). A investigação destes casos familiares seria de extrema valia para uma melhor compreensão da etiologia molecular destes casos. O estudo molecular dos pais e demais casos familiares pode nortear sobre o papel e a penetrância desta mutação monoalélica para o estabelecimento da surdez hereditária nestes pacientes.

Em outro paciente (Paciente 2905) foi relatada consanguinidade entre os genitores, o que sugere que nesta família possa haver algum outro gene envolvido, configurando um genótipo autossômico recessivo, não investigado e relacionado à surdez.

4.4.3 p.Gly5Gly

Em um dos pacientes estudados (Paciente 3101), foi observada a troca de uma citosina por uma adenina, responsável pela mudança na trinca GGC→GGA em um dos alelos (rs7811324). Entretanto, pela redundância do código genético, a troca foi sinônima, não modificando o aminoácido codificado (glicina). Como a predição de patogenicidade é baseada na troca não sinônima de aminoácidos, a análise de patogenicidade desta alteração só foi possível através da ferramenta SIFT score, que evidenciou índice 1,000 (0-1,000) relativo à benignidade. De fato, mutações que não impliquem na troca de aminoácidos são consideradas mutações sinônimas ou benignas, entretanto, várias evidências têm reforçado o papel das variantes sinônimas como fatores significantes para o estabelecimento de diversas doenças humanas. Tais mutações podem afetar mecanismos como o *splicing* do pré-mRNA bem como a estabilidade do mRNA e a eficiência do processo de transcrição (SAUNA; KIMCHI-SARFATY, 2011). Kallel et al. (2013), citam tal mutação em heterozigose em aproximadamente 1,6% (2/128) de pacientes portadores da Doença de Graves. O grupo também relata a possibilidade de p.G5G levar a alterações no processo de *splicing* por impedir os ativadores de *splicing* exônico (*Exonic Splicing Enhancers* - ESEs) dentro do éxon 2, por exemplo. Embora existam evidências de que alterações nestas regiões possam contribuir para o estabelecimento de algumas doenças, sugere-se que estas alterações sejam avaliadas de forma funcional, a fim de confirmar ou excluir a possibilidade de patogenicidade.

Assim, a fim de verificar o potencial papel desta alteração em sítios de *splicing*, foram realizadas análises *in silico* utilizando as ferramentas *Berkeley Drosophila Genome Project*²⁰ e *Human Splicing Finder (HSF) v2.4.1*²¹. As duas ferramentas não evidenciaram sítios de *splicing* afetados pela mutação. Entretanto, a ferramenta *Human Splicing Finder* analisa também outras alterações como em sítios de ligação de proteínas e evidenciou scores preditivos de que p.Gly5Gly possa criar um novo sítio de ligação para *enhancers*, como também proteínas

²⁰ <http://www.fruitfly.org/>

²¹ <http://www.umd.be/HSF/>

regulatórias silenciadoras. Desta forma, a patogenicidade desta alteração permanece duvidosa e reforça a necessidade de demais testes para que se possa inferir sobre seu papel no estabelecimento do fenótipo estudado.

Vale ressaltar ainda, que de acordo com dados do (INTERNATIONAL HAPMAP PROJECT, 2003), tal alteração é reportada em apenas 1% da população Yoruba, não sendo descrita em outras populações, o que sugere não se tratar de uma alteração comum em indivíduos não afetados pelo fenótipo estudado.

4.4.4 p.Gly139Arg

Aproximadamente 1,1% (1/88) dos indivíduos estudados (3318) apresentou a mutação p.Gly139Arg em heterozigose composta com chr7:g.107301238C>G (ver Tabela 7).

Figura 7. Mutação p.Gly139Arg. (A) Padrão de curvas obtido através da análise por HRM e (B) cromatograma obtido por seqüenciamento Sanger, evidenciando a troca de um G→A causando uma troca no aminoácido 139 (Gly→Arg) codificado no éxon 4 do gene SLC26A4.

Trata-se de uma mutação não descrita em que há a troca de uma glicina por uma arginina no aminoácido 139 codificado pelo éxon 4 do gene SLC26A4 (ver Figura 8).

Figura 8. p.G139R. Estrutura química dos aminoácidos selvagem glicina (A) mutado para uma arginina (B) na posição 139 do gene SLC26A4. A cadeia principal, igual para todos os aminoácidos está em vermelho. Em preto, a cadeia lateral, específica para cada aminoácido. Imagem proveniente da análise com a ferramenta *Project HOPE server*.

A análise utilizando o *Project HOPE server* evidenciou a mutação como pertencente a um domínio transmembrana, o domínio transmembrana 3, de acordo com o modelo de 12 TM (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2015), e envolve a troca por um aminoácido de tamanho maior que o selvagem. O resíduo mutante possui carga positiva, enquanto o selvagem possui carga neutra. Tais alterações podem refletir em mudanças no contato com outros domínios transmembrana ou com a própria membrana, podendo afetar as interações hidrofóbicas com o cerne protéico ou com outros lipídios da membrana; como também interferir em interações iônicas com as outras hélices transmembrana, causando repulsão de ligantes ou outros resíduos, já que a carga do resíduo é modificada. A glicina, aminoácido selvagem, constitui o resíduo mais flexível dentre os aminoácidos e acredita-se que tal propriedade seja importante para a correta função protéica e a troca por uma arginina pode comprometer a conformação ou movimento de suas cadeias.

A análise *in silico* de patogenicidade para p.G139R evidenciou scores elevados de patogenicidade para os três softwares de predição (Tabela 6). A potencial patogenicidade é ainda reforçada pelo fato desta mutação envolver um aminoácido conservado evolutivamente dentre várias espécies (ver Figura 2). Ainda, corroborando com as demais análises, a ferramenta *Project HOPE server* também cita a mutação como possivelmente patogênica, baseada em scores de conservação. Sendo assim, a heterozigose composta junto à patogenicidade evidenciada para esta mutação, sugerem o diagnóstico molecular autossômico recessivo responsável pelo fenótipo neste paciente. Como neste paciente também

foi relatada a presença de um irmão afetado (paciente não incluído neste estudo), a investigação adicional dos pais e irmão poderia esclarecer a respeito da heterozigose composta desta mutação com chr7:g.107301238C>G e da real contribuição destas duas mutações para o estabelecimento da surdez.

4.4.5 p.Ala189Ser

Um indivíduo (1,1%) na série de casos em estudo (Paciente 2650) apresentou a troca de uma alanina por uma serina no aminoácido 189 codificado pelo éxon 5 (rs35045430) em um dos alelos. De acordo com dados do *1000 Genomes Project* (1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2012), a frequência alélica do nucleotídeo T, responsável pela troca de aminoácidos, é quase zero na população mundial, sendo identificado apenas na população Africana (1%). Tal mutação já é descrita em pacientes com SAVA, sendo encontrada em heterozigose composta com p.N324Y em aproximadamente 1,4% da população de estudo (1/71) (MADDEN et al., 2007). A patogenicidade desta alteração, no entanto, permanece duvidosa. Através da análise *in silico*, apenas o programa (Mutpred) evidenciou *scores* relativos à patogenicidade (0,764) (ver Tabela 6), entretanto, a mutação envolve a troca de um aminoácido conservado evolutivamente dentre várias espécies (ver Figura 2), o que sugere que p.A189S possa contribuir para o fenótipo estudado. Na investigação dos dados clínicos (Apêndice A), foi relatada consanguinidade entre os pais, desta forma, a ampliação da investigação a outros genes no paciente bem como a análise molecular de ambos os genitores poderia ajudar no entendimento da etiologia neste caso.

4.4.6 p.Ile254Val

Tal mutação foi observada em heterozigose em 1,1% (1/88) da população de estudo (Paciente 2943) (ver Figura 9).

Figura 9. Mutação p.Ile254Val. (A) Padrão de curvas obtido através da análise por HRM e (B) cromatograma obtido por seqüenciamento Sanger, evidenciando a troca de um A→G causando uma troca no aminoácido 254 (Ile→Val) codificado no éxon 6 do gene SLC26A4.

Trata-se de uma mutação ainda não descrita, resultante da troca de uma isoleucina por uma valina no aminoácido 254 codificado pelo éxon 6 (ver Figura 10).

Figura 10. p.I254V. Estrutura química dos aminoácidos selvagem isoleucina (A) mutado para uma valina (B) na posição 254 do gene SLC26A4. A cadeia principal, igual para todos os aminoácidos está em vermelho. Em preto, a cadeia lateral, específica para cada aminoácido. Imagem proveniente da análise com a ferramenta *Project HOPE server*.

De acordo com a base de dados *UniProt* (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2015), tal mutação está localizada em um domínio extracelular na proteína pendrina. A mutação p.I254V resulta em um aminoácido de menor tamanho, o que pode levar a uma perda de interações. Baseado em informações do *Gene Ontology* (GO)²², o *software Project HOPE server* cita tal resíduo como importante no transporte de ânions sulfato, de maneira substrato-específica. Isto evidencia a mutação em um domínio de suma importância para a proteína, o que sugere que p.I254V pode conturbar a função protéica. A ferramenta sugere, entretanto, que apesar da mutação afetar um aminoácido conservado evolutivamente (ver Figura

²² <http://geneontology.org/>

2), o aminoácido valina é encontrado em outras seqüências homólogas ao da pendrina em humanos (NP_000432.1), o que sugere que a possibilidade da existência deste resíduo nesta posição em outras espécies diminui a probabilidade desta alteração ser patogênica. Isto corrobora com os dados encontrados através da análise *in silico* que evidenciou score 0,939 (0-1,000) de patogenicidade apenas para o *software* de predição PolyPhen-2, com os demais apresentando scores relativos à benignidade (ver Tabela 6).

Assim, a partir das ferramentas de análise utilizadas, a patogenicidade e a possível contribuição desta mutação para o fenótipo permanecem duvidosas. Como não foi relatada a presença de casos familiares, testes funcionais seriam úteis para a caracterização do papel desta alteração no estabelecimento da surdez hereditária. Não se pode afastar a possibilidade da causa da surdez estar ligada ao envolvimento de outros genes.

4.4.7 p.Ile300Leu

Esta constituiu a terceira alteração mais freqüente encontrada em nosso estudo, sendo observada em heterozigose em aproximadamente 3,4% (3/88) da série de casos estudada (Pacientes 3025, 3055 e 3196). Trata-se de uma troca de uma isoleucina por uma leucina no aminoácido 300 codificado pelo éxon 7 (rs111033304). O nucleotídeo mutado possui ainda, freqüência alélica baixíssima na população mundial (1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2012), sendo identificado apenas na população Africana (2%), o que pode sugerir que p.I300L não seja freqüentemente encontrado na população não afetada pelo fenótipo. Esta alteração foi primeiramente descrita por Hadj-Kacem et al. (2010), que encontraram a mutação em heterozigose em aproximadamente 1,3% (3/237) dos indivíduos estudados portadores da Doença de Graves, doença auto-imune que acomete a tireóide com um quadro de hipertireoidismo. A alteração, entretanto, não foi encontrada em pacientes com perda auditiva. Logo mais, Kallel et al. (2013) também descreveram a mutação, monoalélica, em 2,3% (3/128) dos indivíduos

estudados, também pacientes portadores de doenças auto imunes envolvendo a tireóide, portadores da Doença de Graves.

Através das ferramentas de predição *in silico* de patogenicidade, sugere-se que p.Ile300Leu mesmo em heterozigose, possa contribuir para o estabelecimento do fenótipo uma vez que foram encontrados scores preditivos de patogenicidade nos três *softwares* de análise utilizados (ver Tabela 6). Tais dados corroboram com os dos dois estudos citados anteriormente, que citam a mutação como patogênica, baseando-se na conservação evolutiva do aminoácido que foi alterado (HADJ-KACEM et al., 2010; KALLEL et al., 2013) (ver Figura 2). Entretanto, os dois relatos anteriores desta mutação a citam apenas em indivíduos com comprometimento tireoidiano. Isto, somado à falta de informações a respeito desta alteração na base de dados *Human Mutation* (STENSON et al., 2014), sugerem que nosso estudo constitui o primeiro relato de p.I300L relacionado à surdez.

Vale ressaltar que foi relatada a presença de uma irmã afetada (não incluída em nosso estudo) para o paciente 3025 e, consanguinidade parental e presença de um irmão afetado (também não incluído neste estudo) para o paciente 3055 (ver Apêndice A). Assim, a investigação da família é importante para a caracterização do papel desta mutação para o fenótipo. Naquele paciente que também apresentou consanguinidade, entretanto, sugere-se que outro gene possa estar relacionado à surdez na família, provavelmente em um genótipo homozigoto.

4.4.8 p.Asn324Tyr

Tal alteração, identificada no éxon 8 (rs36039758), foi encontrada em aproximadamente 2,3% (2/88) da população estudada (Pacientes 2755 e 3131), sendo observada em heterozigose composta com chr7:g.107301238C>G (rs17154282) em um dos casos (1,1%) (Paciente 3131). Tais dados corroboram com os de Madden et al. (2007) que também descreveram tal alteração em pacientes com surdez, portadores de SAVA, em heterozigose composta (citado anteriormente). O paciente 3131, que evidenciou heterozigose composta para o gene SLC26A4, também apresentava alterações nos genes GJB2 e GJB6

[c.35delG/del(GJB6-D13S1854)] (ver Tabela 5), estas últimas que por si só já explicam o estabelecimento da surdez hereditária. É interessante notar que os pais deste paciente eram primos em segundo grau e que não há relato de casos familiares. Isto remete que, aparentemente, a consanguinidade não tenha relação com a surdez neste caso

Os resultados observados sugerem que p.N324Y possa contribuir para a causa genética da PANS não-sindrômica pré-lingual naquele paciente heterozigoto para esta alteração, uma vez que as análises *in silico* evidenciaram índices sugestivos de patogenicidade, para as três ferramentas de predição utilizadas (ver Tabela 6); e ainda, por se tratar da troca de um aminoácido conservado evolutivamente (Figura 2). Destaca-se ainda que esta alteração possui frequência alélica baixíssima na população mundial, sendo identificada apenas na população Africana (4%) (1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2012), o que novamente ressalta o forte componente africano nos indivíduos estudados

4.4.9 p.Asn382Lys

A mutação encontrada no aminoácido 382 codificado pelo éxon 9 promoveu a troca de uma asparagina por uma lisina e foi observada em heterozigose em apenas um indivíduo (Paciente 2292) da população de estudo (Figura 11 e Figura 12).

Figura 11. p.N382K. Estrutura química dos aminoácidos selvagem asparagina (A) mutado para uma lisina (B) na posição 382 do gene SLC26A4. A cadeia principal, igual para todos os aminoácidos está em vermelho. Em preto, a cadeia lateral, específica para cada aminoácido. Imagem proveniente da análise com a ferramenta *Project HOPE server*.

Figura 12. Mutação p.Asn382Lys. (A) Padrão de curvas obtido através da análise por HRM e (B) cromatograma obtido por seqüenciamento Sanger, evidenciando a troca de um C→G causando uma troca no aminoácido 382 (Asn→Lys) codificado no éxon 9 do gene SLC26A4.

Esta mutação ainda não foi descrita e pode desempenhar papel importante no estabelecimento do fenótipo estudado uma vez que esta apresentou scores de patogenicidade elevados em todos os softwares de predição utilizados (ver Tabela 6), bem como, por envolver a troca de um aminoácido conservado dentre várias espécies (ver Figura 2). A análise com o *software Project HOPE score* também cita a mutação como patogênica tomando como base a conservação evolutiva. A ferramenta evidenciou ainda que existe uma diferença de cargas entre o aminoácido selvagem e o mutado. A mutação introduz uma carga positiva que pode levar à repulsão de ligantes ou outros resíduos de carga semelhante. O aminoácido mutante difere ainda do selvagem, em relação ao tamanho; é maior, o que pode levar a mudanças no contato com outros domínios transmembrana ou com a própria membrana, por exemplo. De acordo com a base de dados *UniProt* (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2015), a mutação envolve a alteração de aminoácidos localizados em um domínio citoplasmático.

4.4.10 p.Leu597Ser

A mutação p.L597S (rs55638457) foi encontrada em heterozigose em apenas um indivíduo (1,1%) da série de casos estudada (Paciente 2778). Esta mutação consiste na troca de uma leucina por uma serina no aminoácido 597 que é codificado pelo éxon 16. Foi primeiramente descrita por Campbell et al. (2001),

também em heterozigose, em aproximadamente 4,2% (3/72) de seus indivíduos estudados portadores de SAVA. Embora esta alteração tenha sido observada em uma pequena parcela de nossa população de estudo (1/88), trata-se de uma mutação comumente relatada em diversos estudos que envolvem surdez (PRYOR et al., 2005; PERA et al., 2008; KAHIRIZI et al., 2009; CHEN et al., 2011; DOSSENA et al., 2011b; RENDTORFF et al., 2013). Esta alteração foi identificada em um paciente que também evidenciou a alteração c.35delG em homozigose, mutação que justifica o estabelecimento da surdez hereditária; mesmo assim, foi investigado o possível papel isolado desta alteração para a PANS hereditária não-sindrômica pré-lingual.

Resultados relativos à funcionalidade e patogenicidade desta alteração, no entanto, têm sido conflitantes. Através da análise *in silico* de patogenicidade, p.Leu597Ser evidenciou *scores* relativos à patogenicidade para dois dos três *softwares* de predição utilizados neste estudo (SIFT *score* e PolyPhen-2). Pera et al. (2008) em seu estudo, evidenciaram tal alteração apenas no grupo controle, enquanto Choi et al. (2009) observaram esta mutação em ambos os grupos controle e teste. Os dois grupos realizaram ainda, análises funcionais a fim de avaliar o transporte de íons/tráfego intracelular de SLC26A4/pendrina mutados, e evidenciaram que embora houvesse uma diminuição da atividade da proteína mutada, tal diminuição não era significativa em relação ao genótipo selvagem. Pourová et al. (2010), também citam p.L597S como uma variante não patogênica uma vez que em sua população de estudo, a frequência desta mutação foi similar entre os grupos controle e teste, bem como, apresentavam-se em um único alelo. Apesar destes indícios, p.L597S afeta um aminoácido localizado em regiões conservadas evolutivamente em ortólogos de SLC26A4 (ver Figura 2) e dados do *1000 Genomes Project* (1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2012) reforçam a potencial relação desta alteração com o fenótipo uma vez que o nucleotídeo mutado apresenta baixa frequência alélica dentre várias populações não-afetadas (1% nas populações Americana e Européia). Desta forma, sugere-se que tal mutação pode não ser penetrante e evidenciar patogenicidade quando apenas um alelo é afetado. Assim, supõe-se que a mutação em heterozigose somente possa causar algum efeito funcional quando associada a alguma outra

alteração em *trans* que, por exemplo, possa levar a uma maior penetrância (KÜHNEN et al., 2014).

4.4.11 p.Val609Gly

A mutação p.Val609Gly (rs17154335) trata-se da troca de uma valina por uma glicina no aminoácido 609 codificado pelo éxon 17. Esta foi a segunda alteração mais comumente encontrada neste estudo, sendo observada em heterozigose em aproximadamente 5,7% (5/88) dos pacientes. p.V609G foi descrita por Pryor et al. (2005) e Albert et al. (2006), sendo identificada em heterozigose em 2,6% (1/39) e 0,9% (1/109) de pacientes portadores de SAVA, respectivamente. A mutação não foi identificada na população utilizada como controle, em ambos os estudos. Os grupos citam ainda, tal alteração envolvendo um aminoácido não conservado evolutivamente (ver Figura 2) o sugerem tal mutação como não-patogênica e sim um polimorfismo benigno raro. Já Pera et al. (2008), citam p.V609G com frequência similar entre os grupos teste e controle, ao estudar a população Espanhola. Dados do *1000 Genomes Project* (1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2012) evidenciam uma frequência alélica em torno de 4% na população geral (não-afetada), sendo relatada na população Africana (15%) e Americana (2%).

A não-patogenicidade desta mutação também é reforçada por nosso estudo, uma vez que a análise *in silico* não evidenciou scores relativos à patogenicidade para esta mutação (ver Tabela 6). Mesmo a mutação sendo não-patogênica, a forte correlação estatística do genótipo de SLC26A4 com o fenótipo não é diminuída (PRYOR et al., 2005). Frente à ambigüidade quanto a patogenicidade desta mutação, Dossena et al. (2011a), realizaram testes funcionais a fim de caracterizar o papel de p.V609G no efluxo/influxo de íons iodeto e constataram que a atividade de transporte de íons pela proteína mutada é reduzida comparada à pendrina selvagem, mas não completamente nula. Entretanto, é sabido que a pendrina é uma proteína responsável pela troca de íons Cl^- e HCO_3^- no ouvido interno, rim e vias aéreas, sendo o íon iodeto importante para a função tireoidiana

(SHCHEYNIKOV et al., 2008; WANGEMANN et al., 2007; ITO et al., 2011), o que põe em dúvida o papel de p.Val609Gly no estabelecimento da surdez.

Moraes et al. (2013), observaram em seu estudo a presença de p.Val609Gly em heterozigose em um de seus pacientes, dentre os 23 portadores de SAVA analisados. A mesma alteração não foi encontrada nos indivíduos controle. O grupo ressaltou a importância desta alteração em conjunto com um potencial segundo alelo mutado, presente em íntrons, região promotora ou outras regiões, bem como outros genes, não investigados em seu estudo. Em nosso estudo, dos cinco pacientes evidenciados como portadores da mutação p.V609G, em dois observou-se heterozigose composta com a mutação chr7:g.107301238C>G (ver Tabela 5), presente na região promotora de SLC26A4, também de patogenicidade duvidosa, o não nos permite inferir sobre o papel deste genótipo no fenótipo. Assim, a investigação destas famílias seria útil para o melhor entendimento do papel destas mutações no fenótipo.

Um terceiro paciente apresentou ainda, dupla heterozigose com o gene GJB2 (p.Val27Ile). Tal mutação no gene GJB2 foi classificada como patogênica apenas para um dos *softwares* de predição *in silico* utilizados (PolyPhen-2) (ver Tabela 6). p.Val27Ile (rs2274084) trata-se de um polimorfismo que foi primeiramente descrito por Kelley et al. (1998) e evidências têm reforçado tal variante como benigna uma vez que esta tem sido observada em heterozigose, heterozigose composta e/ou homozigose em muitos indivíduos não afetados, inclusive na população brasileira (KENNA et al., 2001; GUO et al., 2008; CASTRO et al., 2013; CHEN et al., 2014). Assim, acredita-se que para este paciente, bem como para aqueles que apresentaram p.Val609Gly em heterozigose e heterozigose composta com chr7:g.107301238C>G, o diagnóstico molecular para a surdez hereditária ainda permanece duvidoso.

4.5 Considerações finais

Na série de casos estudada, 23,9% (21/88) dos pacientes portadores de surdez neurossensorial não-sindrômica pré-lingual atendidos pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto evidenciaram alterações sugeridas como patogênicas nos genes GJB2, GJB6 e SLC26A4. Dentre elas: c.35delG, p.Arg127Cys e p.Arg184Trp em GJB2; del(GJB6-D13S1830) e del(GJB6-D13S1854) em GJB6; e chr7:g.107301201T>C, p.Gly139Arg, p.Ile300Leu, p.Asn324Tyr e p.Asn382Lys em SLC26A4. Destas, 19,3% apresentaram genótipos sugeridos como responsáveis pela surdez hereditária nestes pacientes.

A prevalência de alterações nos genes GJB2 e GJB6 foi de 18,2% (12,5% para GJB2; 2,3% para GJB6 e; 3,4% para GJB2/GJB6), enquanto que para o gene SLC26A4 foi de 28,4% (25/88). Apesar da prevalência de alterações nos genes investigados não diferirem significativamente entre si, a análise complementar de SLC26A4 contribuiu para um potencial diagnóstico molecular para 9,1% dos casos. Vale ressaltar que a investigação molecular de MT-RNR1 não evidenciou alterações dentre os 88 pacientes estudados. Isto demonstra a importância do gene SLC26A4, junto àqueles genes já utilizados como padrão para a investigação molecular de surdez hereditária (que explicaram o fenótipo em 10,2% dos casos) e, reforça a sua potencial contribuição para o processo de aconselhamento genético. Entretanto, sugere-se uma investigação funcional adicional a fim de se caracterizar o real papel das mutações identificadas em SLC26A4 para o estabelecimento da surdez.

Nossos dados sugerem também, a presença de outros genes ou regiões envolvidas com o fenótipo, uma vez que mesmo com a análise dos quatro genes aqui investigados, aproximadamente 80,7% da série de casos permaneceu com o diagnóstico molecular desconhecido. Aqueles casos com mutações monoalélicas, sem evidências de patogenicidade, que não foram suficientes para justificar o fenótipo, também reforçam idéia da existência de outras mutações. Para isso, a investigação familiar, bem como a adoção de ferramentas de análise em larga escala, tais como a análise de mutações em um painel de genes relacionados à

surdez, podem constituir ferramentas importantes para o diagnóstico molecular da surdez hereditária.

5 CONCLUSÕES

Dentre os casos estudados, a maioria era portadora de surdez profunda (55,7%); 87,5% dos indivíduos apresentaram surdez não progressiva; 28,4% relataram a presença de casos familiares; e 13,6% da série de casos relatou consanguinidade entre os pais. Fatores de risco para a surdez foram descritos em 26,1% destes casos, dos quais a presença de otites de recorrência (7,9%) e prematuridade (10,2%) foram aqueles relatados com mais frequência.

A investigação molecular dos genes GJB2, GJB6, MT-RNR1 e SLC26A4 permitiu a identificação de dezessete diferentes variantes em 40,9% (36/88) dos indivíduos portadores de PANS não-sindrômica pré-lingual atendidos pelo serviço de Genética Médica do Hospital das Clínicas da FMRP – USP. Destes, apenas 21 pacientes (23,9%) evidenciaram alterações sugeridas como patogênicas nos genes GJB2, GJB6 e SLC26A4.

A prevalência de mutações nos genes GJB2, GJB6 e MT-RNR1 foi de 18,2% (12,5% para GJB2; 2,3% para GJB6; 3,4% para GJB2/GJB6 e de 0% para MT-RNR1).

A prevalência de alterações no gene SLC26A4 foi de 28,4% (25/88) e para nenhum destes casos foi relatada SAVA.

Dentre as alterações encontradas no gene SLC26A4, três constituem mutações não descritas: p.Gly139Arg, p.Ile254Val, p.Asn382Lys. As mutações p.Gly139Arg e p.Asn382Lys foram sugeridas como patogênicas.

Os genótipos mais frequentes foram a c.35delG/c.35delG no gene GJB2 (5,7%), a dupla heterozigose com o gene GJB6 c.35delG/del(GJB6-D13S1854) (3,4%) e chr7:g.107301238C>G no gene SLC26A4, que se apresentou em heterozigose em 6,8% da população bem como em heterozigose composta (4,5%) e em dupla heterozigose com o gene GJB2 (1,1%), sendo relatada também junto com um caso de homozigose em GJB2 e com um caso de dupla heterozigose de GJB2/GJB6.

Assim, constatou-se que através da análise dos genes GJB2 e GJB6 foi possível explicar o estabelecimento da surdez hereditária em aproximadamente 10,2% dos casos e, a investigação adicional do gene SLC26A4 sugere a

explicação para a surdez genética para aproximadamente 9,1% destes casos. Dentre as alterações neste último, 5,7% constituíram casos de heterozigose preditas como patogênicas (p.Ile300Leu; p.Asn324Tyr; p.Asn382Lys), 2,3% de casos de heterozigose composta (chr7:g.107301201T>C/chr7:g.107301238C>G e chr7:g.107301238C>G/p.Gly139Ar) e 1,1% de casos de dupla heterozigose com GJB2 (chr7:g.107301238C>G/c.35delG).

Sugere-se que, com a análise complementar do gene SLC26A4 dezessete pacientes dentre os 88 casos estudados (19,3%) tiveram o diagnóstico molecular para surdez hereditária.

O gene SLC26A4 pode contribuir significativamente para o diagnóstico molecular da surdez hereditária. Assim, a investigação deste gene poderia ser considerada como prioritária após a triagem inicial com GJB2, GJB6 e MT-RNR1, ou até mesmo ser considerada para investigação paralela, dada a frequência de alterações nele encontradas em pacientes com PANS pré-lingual. Isto ajudaria, por consequência, no aconselhamento genético das famílias afetadas.

REFERÊNCIAS

1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature**, n. 491, p. 56-65, 2012.

ADZHUBEI, I.; JORDAN, D. M.; SUNYAEV, S. R. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. **Current Protocols in Human Genetics**, 2013.

ALBERT, S.; BLONS, H.; JONARD, L.; et al. SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. **European journal of human genetics: EJHG**, v. 14, p. 773–779, 2006.

ANDRADE, G. M. Q. DE; RESENDE, L. M. DE; GOULART, E. M. A.; et al. Hearing loss in congenital toxoplasmosis detected by newborn screening. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 74, n. 1, p. 21–28, 2008.

ANGELI, S.; LIN, X.; LIU, X. Z. Genetics of Hearing and Deafness. **Anatomical Record**, v. 295, p. 1812–1829, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520**: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

BARDIEN, S.; HUMAN, H.; HARRIS, T.; et al. A rapid method for detection of five known mutations associated with aminoglycoside-induced deafness. **BMC medical genetics**, v. 10, p. 1-9, 2009.

BATISSOCO, A. C.; ABREU-SILVA, R. S.; BRAGA, M. C. C.; et al. Prevalence of GJB2 (connexin-26) and GJB6 (connexin-30) mutations in a cohort of 300 Brazilian hearing-impaired individuals: implications for diagnosis and genetic counseling. **Ear and hearing**, v. 30, p. 1–7, 2009.

BECK, C.; CARMELO, J. Identification and genotype / phenotype correlation of mutations in a large German cohort with hearing loss. **European Archives of Otorhinolaryngology**, 2014.

BIALAS, K. M.; SWAMY, G. K.; PERMAR, S. R. Perinatal Cytomegalovirus and Varicella Zoster Virus Infections. **Clinics in Perinatology**, v. 42, p. 61–75, 2015.

BIELECKI, I.; HORBULEWICZ, A.; WOLAN, T. Risk factors associated with hearing loss in infants: An analysis of 5282 referred neonates. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 75, n. 7, p. 925–930, 2011.

BINDU, L. H.; REDDY, P. P. Genetics of aminoglycoside-induced and prelingual non-syndromic mitochondrial hearing impairment: a review. **International journal of audiology**, v. 47, p. 702–707, 2008.

BOLZ, H.; SCHADE, G.; EHMER, S.; et al. Phenotypic variability of non-syndromic hearing loss in patients heterozygous for both c.35delG of GJB2 and the 342-kb deletion involving GJB6. **Hearing Research**, v. 188, p. 42–46, 2004.

BOULAY, A. C.; DEL CASTILLO, F. J.; GIRAUDET, F.; et al. Hearing Is Normal without Connexin30. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 2, p. 430–434, 2013.

BOYLE, A. P.; HONG, E. L.; HARIHARAN, M.; et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. **Genome Research**, v. 22, p. 1790–1797, 2012.

BROWN, K. A.; JANJUA, A. H.; KARBANI, G.; et al. Linkage studies of non-syndromic recessive deafness (NSRD) in a family originating from the Mirpur region of Pakistan maps DFNB1 centromeric to D13S175. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 1, p. 169–173, 1996.

CAMPBELL, C.; CUCCI, R. A.; PRASAD, S.; et al. Pendred syndrome, DFNB4, and PDS/SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations. **Human Mutation**, v. 17, p. 403–411, 2001.

CASTRO, L. S. S. DE; MARINHO, A. N. D. R.; RIBEIRO RODRIGUES, E. M.; et al. A study of GJB2 and delGJB6-D13S1830 mutations in Brazilian non-syndromic deaf children from the Amazon Region. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 1, p. 95–99, 2013.

CHAI, Y.; PANG, X.; CHEN, D.; et al. Molecular Etiology of Non-Dominant , Hearing Impairment in Chinese Hans. **American Journal of Medical Genetics Part A**, p. 1–5, 2014.

CHANG, E.; KÖLLN, K. A.; NISHIMURA, C.; et al. Pendred/BOR Homepage, Molecular Otolaryngology Research Laboratory. Disponível em: <<http://www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor/>>. Acesso em: 20 fev. 2015

CHEN, N.; TRANEBJÆRG, L.; RENDTORFF, N. D.; SCHRIJVER, I. Mutation analysis of SLC26A4 for pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss by high-resolution melting. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 13, n. 4, p. 416–426, 2011.

CHEN, T.; JIANG, L.; LIU, C.; et al. Update of the Spectrum of GJB2 Mutations in 107 Patients with Nonsyndromic Hearing Loss in the Fujian Population of China. **Annals of Human Genetics**, v. 78, p. 235–242, 2014.

CHOI, B. Y.; STEWART, A. K.; MADEO, A. C.; et al. Hypo-functional SLC26A4 variants associated with nonsyndromic hearing loss and enlargement of the vestibular aqueduct: genotype-phenotype correlation or coincidental polymorphisms? **Human Mutation**, v. 30, n. 4, p. 599–608, 2009.

CHORA, J. R. G. D. B. M.; MATOS, T. D. M.; MARTINS, J. H. F.; et al. DFNB1-associated deafness in Portuguese cochlear implant users: Prevalence and impact on oral outcome. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 74, p. 1135–1139, 2010.

COHEN, B. E.; DURSTENFELD, A.; ROEHM, P. C. Viral Causes of Hearing Loss: A Review for Hearing Health Professionals. **Trends in hearing**, v. 18, p. 1–17, 2014.

CORDEIRO-SILVA, M.; BARBOSA, A.; SANTIAGO, M.; et al. Mutation analysis of GJB2 and GJB6 genes in Southeastern Brazilians with hereditary nonsyndromic deafness. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 1309–1313, 2011.

DA SILVA, L. P. A.; QUEIROS, F.; LIMA, I. Etiology of Hearing Impairment in Children and Adolescents of a Reference Center APADA in the city of Salvador, state of Bahia. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 1, p.33-36, 2006.

DAHL, H. H. M.; SAUNDERS, K.; KELLY, T. M.; et al. Prevalence and nature of connexin 26 mutations in children with non-syndromic deafness. **Medical Journal of Australia**, v. 175, p. 191–194, 2001.

DAI, C. F.; MANGIARDI, D.; COTANCHE, D. A.; STEYGER, P. S. Uptake of fluorescent gentamicin by vertebrate sensory cells in vivo. **Hearing Research**, v. 213, p. 64–78, 2006.

DE VRIES, L. S. DE; LARY, S.; WHITELAW, A. G.; DUBOWITZ, L. M. S. Relationship of serum bilirubin levels and hearing impairment in newborn infants. **Early human development**, v. 15, p. 269–77, 1987.

DEGNER, J. F.; PAI, A. A.; PIQUE-REGI, R.; et al. DNase I sensitivity QTLs are a major determinant of human expression variation. **Nature**, v. 482, n. 7385, p. 390–394, 2012.

DEL CASTILLO, F. J.; DEL CASTILLO, I.. The DFNB1 subtype of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 17, n. 3, p. 3252–3274, 2011.

DEL CASTILLO, F. J.; RODRÍGUEZ-BALLESTEROS, M.; ALVAREZ, A; et al. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. **Journal of medical genetics**, v. 42, p. 588–594, 2005.

DEL CASTILLO, I.; MORENO-PELAYO, M. A; DEL CASTILLO, F. J.; et al. Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study. **American journal of human genetics**, v. 73, p. 1452–1458, 2003.

DEL CASTILLO, I.; VILLAMAR, M.; MORENO-PELAYO, M. A.; et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. **The New England journal of medicine**, v. 346, p. 243–249, 2002.

DONG, C.; WEI, P.; JIAN, X.; et al. Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. **Human Molecular Genetics**, p. 1–13, 2015.

DOSSENA, S.; BIZHANOVA, A.; NOFZIGER, C.; et al. Identification of Allelic Variants of Pendrin (SLC26A4) with Loss and Gain of Function. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 467–476, 2011a.

DOSSENA, S.; NOFZIGER, C.; TAMMA, G.; et al. Molecular and functional characterization of human pendrin and its allelic variants. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 451–66, 2011b.

DOSSENA, S.; RODIGHIERO, S.; VEZZOLI, V.; et al. Functional characterization of wild-type and mutated pendrin (SLC26A4), the anion transporter involved in Pendred syndrome. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 43, p. 93–103, 2009.

DOWLATI, M. A.; DERA KHSHANDEH-PEYKAR, P.; HOUSHMAND, M.; et al. Novel nucleotide changes in mutational analysis of mitochondrial 12SrRNA gene in patients with nonsyndromic and aminoglycoside-induced hearing loss. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 2689–2695, 2013.

DU, W.; WANG, Q.; ZHU, Y.; WANG, Y.; GUO, Y. Associations between GJB2, Mitochondrial 12S rRNA, SLC26A4 Mutations, and Hearing Loss among Three Ethnicities. *BioMed Research International*, ID 746838, v. 2014, 2014.

DUMAN, D.; TEKIN, M. Autosomal recessive nonsyndromic deafness genes: a review. **Frontiers in Bioscience**, v. 17, p. 2213, 2013.

DUMAN, D.; SIRMACI, A.; CENGİZ, F. B.; OZDAG, H.; TEKIN, M. Screening of 38 genes identifies mutations in 62% of families with nonsyndromic deafness in Turkey. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 15, n. 1, p. 29–33, 2011.

ELIÇORA, S. Ş.; ÖZTÜRK, M.; SEVINÇ, R.; et al. Risk factors for otitis media effusion in children who have adenoid hypertrophy. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 79, p. 374–377, 2015.

ER, T. K.; CHANG, J. G. High-resolution melting: Applications in genetic disorders. **Clinica Chimica Acta**, v. 414, p. 197–201, 2012..

ERALI, M.; VOELKERDING, K. V.; WITTEWER, C. T. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 85, p. 50–58, 2008.

ERALI, M.; WITTEWER, C. T. High resolution melting analysis for gene scanning. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 250–261, 2010.

ESTIVILL, X.; FORTINA, P.; SURREY, S.; et al. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. **Lancet**, v. 351, p. 394–398, 1998a.

ESTIVILL, X.; GOVEA, N.; BARCELÓ, E.; et al. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by

treatment of aminoglycosides. **American journal of human genetics**, v. 62, p. 27–35, 1998b.

EVERETT, L. A; BELYANTSEVA, I. A; NOBEN-TRAUTH, K.; et al. Targeted disruption of mouse Pds provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome. **Human molecular genetics**, v. 10, n. 2, p. 153–161, 2001.

EVERETT, L. A; GLASER, B.; BECK, J. C.; et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). **Nature genetics**, v. 17, p. 411–422, 1997.

FREI, K.; RAMSEBNER, R.; LUCAS, T.; et al. Screening for monogenetic del(GJB6-D13S1830) and digenic del(GJB6-D13S1830)/GJB2 patterns of inheritance in deaf individuals from Eastern Austria. **Hearing Research**, v. 196, p. 115–118, 2004.

GIROTTTO, G.; ABDULHADI, K.; BUNIELLO, A.; et al. Linkage study and exome sequencing identify a BDP1 mutation associated with hereditary hearing loss. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 6–12, 2013.

GIROTTTO, G.; MEZZAVILLA, M.; ABDULHADI, K.; et al. Consanguinity and Hereditary Hearing Loss in Qatar. **Human Heredity**, v. 77, p. 175–182, 2014.

GRIFA, A; WAGNER, C. A; D'AMBROSIO, L.; et al. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. **Nature genetics**, v. 23, p. 16–18, 1999.

GUO, Y.-F.; LIU, X.-W.; GUAN, J.; et al. GJB2, SLC26A4 and mitochondrial DNA A1555G mutations in prelingual deafness in Northern Chinese subjects. **Acta otolaryngologica**, v. 128, p. 297–303, 2008.

HADJ-KACEM, H.; KALLEL, R.; BELGUITH-MAALEJ, S.; et al. SLC26A4 variations among Graves' hyper-functioning thyroid gland. **Disease Markers**, v. 29, p. 63–69, 2010.

HAN, X.-H.; FAN, Y.; WEI, Q.-J.; XING, G.-Q.; CAO, X. Understanding of the molecular evolution of deafness-associated pathogenic mutations of connexin 26. **Genetica**, v. 142, p. 555–562, 2014.

HILGERT, N.; SMITH, R. J. H.; VAN CAMP, G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: Which ones should be analyzed in DNA diagnostics? **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 681, p. 189–196, 2009.

HOANG-DINH, E.; AHMAD, S.; CHANG, Q.; et al. Diverse deafness mechanisms of connexin mutations revealed by studies using in vitro approaches and mouse models. **Brain Research**, v. 1277, p. 52–69, 2009.

HUYGHE, J. R.; LAER, L. VAN; HENDRICKX, J. J.; et al. Genome-wide SNP-Based Linkage Scan Identifies a Locus on 8q24 for an Age-Related Hearing Impairment Trait. **American Journal of Human Genetics**, v. 83, p. 401–407, 2008.

INTERNATIONAL HAPMAP PROJECT. The International HapMap Project. **Nature**, v. 426, p. 789-796, 2003.

ITO, T.; CHOI, B. Y.; KING, K. A.; et al. SLC26A4 genotypes and phenotypes associated with enlargement of the vestibular aqueduct. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 545–552, 2011.

ITO, T.; NOGUCHI, Y.; YASHIMA, T.; OHNO, K.; KITAMURA, K. Hereditary hearing loss and deafness genes in Japan. **Journal of Medical and Dental Sciences**, v. 57, p. 1–10, 2010.

JANG, J. H.; JUNG, J.; KIM, A. R.; et al. Identification of Novel Functional Null Allele of SLC26A4 Associated with Enlarged Vestibular Aqueduct and Its Possible Implication. **Audiology and Neurotology**, v. 19, p. 319–326, 2014.

KAHRIZI, K.; MOHSENI, M.; NISHIMURA, C.; et al. Identification of SLC26A4 gene mutations in Iranian families with hereditary hearing impairment. **European Journal of Pediatrics**, v. 168, p. 651–653, 2009.

KALLEL, R.; NIASME-GRARE, M.; BELGUTH-MAALEJ, S.; et al. Screening of SLC26A4 gene in autoimmune thyroid diseases. **International Journal of Immunogenetics**, v. 40, p. 284–291, 2013.

KARACA, Ç. T.; OYSU, Ç.; TOROS, S. Z.; NAİBOĞLU, B. A. V.; et al. Is Hearing Loss in Infants Associated With Risk Factors? Evaluation of the Frequency of Risk Factors. **Clinical and Experimental Otorhinolaryngology**, v. 7, n. 4, p. 260–263, 2014.

KELLEY, P. M.; HARRIS, D. J.; COMER, B. C.; et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. **American journal of human genetics**, v. 62, p. 792–799, 1998.

KELSELL, D. P.; DUNLOP, J.; STEVENS, H. P.; et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. **Nature**, v.387, 1997.

KENNA, M. A.; WU, B. L.; COTANCHE, D. A.; KORF, B. R.; REHM, H. L. Connexin 26 Studies in Patients With Sensorineural Hearing Loss. **Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery**, v. 127, p. 1037–1042, 2001.

KENNESON, A.; CANNON, M. J. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, p. 253–276, 2007.

KHABORI, M. AL; PATTON, M. A. Consanguinity and deafness in Omani children. **International journal of audiology**, v. 47, p. 30–33, 2008.

KHURANA, E.; FU, Y.; COLONNA, V.; et al. Integrative annotation of variants from 1092 humans: application to cancer genomics. **Science**, v. 342, 2013.

KONINGS, A.; LAER, L. VAN; MICHEL, S.; et al. Variations in HSP70 genes associated with noise-induced hearing loss in two independent populations. **European journal of human genetics: EJHG**, v. 17, p. 329–335, 2009.

KOPP, P.; KARAMANOGLU ARSEVEN, O.; SABACAN, L.; et al. Phenocopies for Deafness and Goiter Development in a Large Inbred Brazilian Kindred with Pendred ' s Syndrome Associated with a Novel Mutation in the PDS Gene*. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, n. 1, p. 336–341, 1999.

KÜHNEN, P.; TURAN, S.; FRÖHLER, S.; et al. Identification of PENDRIN (SLC26A4) mutations in patients with congenital hypothyroidism and “apparent” thyroid dysgenesis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, p. 169–176, 2014.

LI, B.; KRISHNAN, V. G.; MORT, M. E.; et al. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. **Bioinformatics**, v. 25, n. 21, p. 2744–2750, 2009.

LI, H.; WANG, Q.; STEYGER, P. S. Acoustic trauma increases cochlear and hair cell uptake of gentamicin. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

LI, R.; XING, G.; YAN, M.; et al. Cosegregation of C-insertion at position 961 with the A1555G mutation of the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family with maternally inherited hearing loss. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 124A, p. 113–117, 2004.

LI, W. S.; GANG, Y. U. L.; PING, L. I. U. R.; ZHAN, Z. H. U. W.; MIN, G. A. O. W. Gene-Gene Interaction of GJB2 , SOD2 , and CAT on Occupational Noise-induced Hearing Loss in Chinese Han Population. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 27, n. 12, p. 965–968, 2014.

LIN, F.; LI, D.; WANG, P.; et al. Autosomal recessive non-syndromic hearing loss is caused by novel compound heterozygous mutations in TMC1 from a Tibetan Chinese family. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 78, p. 2216–2221, 2014.

LOCHER, H.; DE GROOT, J. C. M. J.; IPEREN, L. V; HUISMAN, M. A. FRIJNS, J. H. M.; LOPES, S. M. C. S. Development of the stria vascularis and potassium regulation in the human fetal cochlea: insights into hereditary sensorineural hearing loss. **Developmental Neurobiology**, Accepted Article, doi: 10.1002/dneu.22279, 2015.

LU, Y.; ZHOU, X.; JIN, Z.; et al. Resolving the genetic heterogeneity of prelingual hearing loss within one family: Performance comparison and application of two targeted next generation sequencing approaches. **Journal of Human Genetics**, v. 59, p. 599–607, 2014.

LUNTZ, M.; YEHUDAI, N.; HAIFLER, M.; SIGAL, G.; MOST, T. Risk factors for sensorineural hearing loss in chronic otitis media. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 133, n. 1, p. 1173–1180, 2013.

MADDEN, C.; HALSTED, M.; MEINZEN-DERR, J.; et al. The influence of mutations in the SLC26A4 gene on the temporal bone in a population with enlarged vestibular aqueduct. **Archives of otolaryngology--head & neck surgery**, v. 133, p. 162–168, 2007.

MANZOLI, G. N.; ABE-SANDES, K.; BITTLES, A. H.; et al. Non-syndromic hearing impairment in a multi-ethnic population of Northeastern Brazil. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 7, p. 1077–1082, 2013.

MARLOW, E.; HUNT, L.; MARLOW, N. Sensorineural hearing loss and prematurity. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition** 2000, n. 82, p. F141–F144, 2000.

MELO, U. S.; SANTOS, S.; CAVALCANTI, H. G.; et al. Strategies for genetic study of hearing loss in the Brazilian northeastern region. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, v. 5, n. 1, p. 11–21, 2014.

MERCER, S.; MUTTON, P.; DAHL, H. H. M. Identification of SLC26A4 mutations in patients with hearing loss and enlarged vestibular aqueduct using high-resolution melting curve analysis. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 15, n. 5, p. 365–368, 2011.

MOHAMOUD, H. S. A.; HUSSAIN, M. R. M.; EL-HAROUNI, A. A; et al. First Comprehensive In Silico Analysis of the Functional and Structural Consequences of SNPs in Human GalNAc-T1 Gene. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2014, ID 904052, 2014.

MORAES, V. C. S. DE; SANTOS, N. Z. P. DOS; RAMOS, P. Z.; et al. Molecular analysis of SLC26A4 gene in patients with nonsyndromic hearing loss and EVA: Identification of two novel mutations in Brazilian patients. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 77, p. 410–413, 2013.

MOTTA, L. H. C. DA; FÉLIX, T. M.; SOUZA, L. T. DE; et al. Prevalence of the 35delG mutation in deaf South Brazilian infants submitted to cochlear implantation. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 76, p. 287–290, 2012.

MULHERAN, M.; HARPUR, E. S. The effect of gentamicin and furosemide given in combination on cochlear potentials in the guinea pig. **British journal of audiology**, v. 32, p. 47–56, 1998.

NAJMABADI, H.; KAHRIZI, K. Genetics of non-syndromic hearing loss in the Middle East. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 78, n. 12, p. 2026–2036, 2014.

NG, P. C.; HENIKOFF, S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 7, p. 61–80, 2006.

OLIVEIRA, C. A. DE; ALEXANDRINO, F.; CHRISTIANI, T. V.; et al. Molecular genetics study of deafness in Brazil: 8-Year experience. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 143, p. 1574–1579, 2007.

PALLARES-RUIZ, N.; BLANCHET, P.; MONDAIN, M.; CLAUSTRES, M.; ROUX, A.-F. A large deletion including most of GJB6 in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? **European journal of human genetics: EJHG**, v. 10, p. 72–76, 2002.

PARK, H. J.; LEE, S. J.; JIN, H. S.; et al. Genetic basis of hearing loss associated with enlarged vestibular aqueducts in Koreans. **Clinical Genetics**, v. 67, n. 12, p. 160–165, 2005.

PARK, H.-J.; SHAUKAT, S.; LIU, X.-Z.; et al. Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. **Journal of medical genetics**, v. 40, p. 242–248, 2003.

PERA, A.; DOSSENA, S.; RODIGHIERO, S.; et al. Functional assessment of allelic variants in the SLC26A4 gene involved in Pendred syndrome and nonsyndromic EVA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 18608–18613, 2008.

PIATTO, B; SECCHES L.V.; ARROYO M.A.S.; et al. Nonsyndromic Deafness - Molecular Update. **The Open Biology Journal**, v. 2, p. 80–90, 2009.

PIATTO, V. B.; NASCIMENTO, E. C. T.; ALEXANDRINO, F.; et al. Genética molecular da deficiência auditiva não-sindrômica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 71, n. 2, p. 216–223, 2005.

PIQUE, L. M.; BRENNAN, M.; DAVIDSON, C. J.; et al. Mutation analysis of the SLC26A4 , FOXI1 and KCNJ10 genes in individuals with congenital hearing loss. **PeerJ** 2, n. e384, p. 1–16, 2014.

POUROVÁ, R.; JANOUŠEK, P.; JUROVČÍK, M.; et al. Spectrum and frequency of SLC26A4 mutations among czech patients with early hearing loss with and without enlarged vestibular aqueduct (EVA). **Annals of Human Genetics**, v. 74, p. 299–307, 2010.

PREZANT, T. R.; AGAPIAN, J. V; BOHLMAN, M. C.; et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. **Nature genetics**, v. 4, p. 289–294, 1993.

PRYOR, S. P.; MADEO, A C.; REYNOLDS, J. C.; et al. SLC26A4/PDS genotype-phenotype correlation in hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA): evidence that Pendred syndrome and non-syndromic EVA are distinct clinical and genetic entities. **Journal of medical genetics**, v. 42, p. 159–165, 2005.

QIAN, L.; YUBIN, J.; BING, H; et al. Comparative study of mutation spectrums of MT-RNR1 m.1555A>G, GJB2, and SLC26A4 between familial and sporadic patients with nonsyndromic sensorineural hearing loss in Chinese Han. **Chinese Medical Journal**, v. 127, n. 18, p. 3233–3237, 2014.

RENDTORFF, N.; SCHRIJVER, I.; LODAHL, M.; et al. SLC26A4 mutation frequency and spectrum in 109 Danish Pendred syndrome/DFNB4 probands and a report of nine novel mutations. **Clinical Genetics**, v. 84, n. 1, p. 388–391, 2013.

RODRIGUEZ-PARIS, J.; TAMAYO, M. L.; GELVEZ, N.; SCHRIJVER, I. Allele-Specific impairment of GJB2 expression by GJB6 deletion del(GJB6-d13s1854). **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.

ROYAUX, I. E.; SUZUKI, K.; MORI, A.; et al. Pendrin, the protein encoded by the pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. **Endocrinology**, v. 141, n. 2, p. 839–845, 2000.

ROZENFELD, J.; EFRATI, E.; ADLER, L.; et al. Transcriptional regulation of the pendrin gene. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 385–396, 2011.

SALVAGO, P.; MARTINES, E.; LA MATTINA, E.; et al. Distribution and phenotype of GJB2 mutations in 102 Sicilian patients with congenital non syndromic sensorineural hearing loss. **International Journal of Audiology**, p. 1–6, 2014.

SANCHEZ, H. A.; VERSELIS, V. K. Aberrant Cx26 hemichannels and keratitis-ichthyosis-deafness syndrome: insights into syndromic hearing loss. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, p. 1–10, 2014.

SANDERS, M. S.; JONGE, R. C. J. DE; TERWEE, C. B.; et al. Addition of host genetic variants in a prediction rule for post meningitis hearing loss in childhood: a model updating study. **BMC infectious diseases**, v. 13, p. 340, 2013.

SAUNA, Z. E.; KIMCHI-SARFATY, C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. **Nature reviews. Genetics**, v. 12, n. 10, p. 683–691, 2011.

SHCHEYNIKOV, N.; YANG, D.; WANG, Y.; et al. The Slc26a4 transporter functions as an electroneutral Cl⁻/I⁻/HCO₃⁻ exchanger: role of Slc26a4 and Slc26a6 in I⁻ and HCO₃⁻ secretion and in regulation of CFTR in the parotid duct. **The Journal of physiology**, v. 586, p. 3813–3824, 2008.

SHEARER, A. E.; BLACK-ZIEGELBEIN, E. A.; HILDEBRAND, M. S.; et al. Advancing genetic testing for deafness with genomic technology. **Journal of medical genetics**, v. 50, n. 9, p. 1–8, 2013.

SMITH, J.H.; BALE JR., J.F.; WHITE, K. R. Sensorineural hearing loss in children. **The Lancet**, v. 18, p. 879–890, 2005.

SMITH, R. J. H.; SHEARER, A. E.; HILDEBRAND, M. S.; et al. Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. 1999 [Atualizado em 9 jan. 2014]. In: PAGON, R. A.; ADAM, M. P.; AMEMIYA, A.; et al., editors. **GeneReviews® [Internet]**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1434/>>. Acesso em: 20 fev. 2015.

STENSON, P.D.; MORT, M.; BALL, E.V.; et al. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. **Human Genetics**, v. 133, n. 1, p. 1-9, 2014.

TANG, H. Y; FANG, P.; WARD, P. A.; et al. DNA Sequence Analysis of GJB2, Encoding Connexin 26: Observations From a Population of Hearing Impaired Cases and Variable Carrier Rates, Complex Genotypes, and Ethnic Stratification of Alleles Among Controls. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 140A, p. 2401–2415, 2006.

TANG, W.; QIAN, D.; AHMAD, S.; et al. A Low-Cost Exon Capture Method Suitable for Large-Scale Screening of Genetic Deafness by the Massively-Parallel Sequencing Approach. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 16, n. 6, p. 536–542, 2012.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a hub for protein information. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. D204-D212, 2015.

TSUKAMOTO, K.; SUZUKI, H.; HARADA, D.; et al. Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese. **European journal of human genetics: EJHG**, v. 11, p. 916–922, 2003.

UTRERA, R.; RIDAURA, V.; RODRÍGUEZ, Y.; et al. Detection of the 35delG/GJB2 and del(GJB6-D13S1830) mutations in Venezuelan patients with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. **Genetic testing**, v. 11, n. 4, p. 347–352, 2007.

VAN CAMP, G.; SMITH, R. Hereditary Hearing loss Homepage. Disponível em: <<http://hereditaryhearingloss.org/>>. Acesso em: 20 Fev. 2015.

VALVASSORI, G.E.; CLEMIS, J.D. The large vestibular aqueduct syndrome. **Laryngoscope**, v. 88, n. 5, p. 723-728, 1978.

VENSELAAR, H.; BEEK, T. A H. TE; KUIPERS, R. K. P.; HEKKELMAN, M. L.; VRIEND, G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 548, 2010.

WANGEMANN, P.; NAKAYA, K.; WU, T.; et al. Loss of cochlear HCO₃⁻ secretion causes deafness via endolymphatic acidification and inhibition of Ca₂⁺ reabsorption in a Pendred syndrome mouse model. **Renal Physiology - American Journal of Physiology**, v. 292, n. 5, p. F1345–F1353, 2007.

WHO. World Health Organization. Deafness and hearing loss. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>>. Acesso em: 28 fev. 2015.

WIENER-VACHER, S. R.; OBEID, R.; ABOU-ELEW, M. Vestibular impairment after bacterial meningitis delays infant posturo-motor development. **Journal of Pediatrics**, v. 161, n. 2, p. 246–251, 2012.

WILCOX, S. A; SAUNDERS, K.; OSBORN, A H.; et al. High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. **Human genetics**, v. 106, p. 399–405, 2000.

WU, C. C.; LU, Y. C.; CHEN, P. J.; et al. Phenotypic analyses and mutation screening of the SLC26A4 and FOXI1 genes in 101 Taiwanese families with bilateral nonsyndromic enlarged vestibular aqueduct (DFNB4) or pendred syndrome. **Audiology and Neurotology**, v. 15, p. 57–66, 2010.

YANG, T.; SMITH, R. J. H. The c.-103T>C Variant in the 5'-UTR of SLC26A4 Gene: A Pathogenic Mutation or Coincidental Polymorphism? **Human Mutation**, v. 30, n. 10, pp. 1469–1470, 2009.

YANG, T.; VIDARSSON, H.; RODRIGO-BLOMQVIST, S.; et al. Transcriptional control of SLC26A4 is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4). **American journal of human genetics**, v. 80, p. 1055–1063, 2007.

YAZDANPANAHI, N.; TABATABAIEFAR, M. A.; FARROKHI, E.; et al. Compound heterozygosity for two novel SLC26A4 mutations in a large Iranian pedigree with Pendred syndrome. **Clinical and Experimental Otorhinolaryngology**, v. 6, n. 4, p. 201–208, 2013.

YEHUDAI, N.; MOST, T.; LUNTZ, M. Risk factors for sensorineural hearing loss in pediatric chronic otitis media. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 79, p. 26–30, 2015.

ZENNER, H.P.; PLINKERT, P.K. A.C. and D.C. motility of mammalian auditory sensory cells-a new concept in hearing physiology. **Polish Journal of Otolaryngology**. v. 46, n.4, p. 333-349, 1992.

APÊNDICE A – Dados clínicos e moleculares dos 88 pacientes estudados.

Tabela 1 - Caracterização clínica e molecular dos 88 pacientes estudados portadores de Surdez Neurossensorial Não-sindrômica Pré-lingual.

Paciente	Grau de Perda	Progressiva	Fatores de risco	Caso familiar	Consanguinidade	Resultados análise molecular			
						SLC26A4	GJB2	GJB6	MT-RNR1
1994	Severa	N	N	NR	NR	ND	ND	ND	ND
2264	Severa	N	N	N	NR	chr7:g.107301238C>G/wt	c.35delG/wt	ND	ND
2266	Profunda	N	N	N	NR	ND	ND	ND	ND
2267	Profunda	N	Prematuridade Hiperbilirrubinemia	S IRMÃ	N	p.Val609Gly/wt [GTT>GGT](T/G)	ND	ND	ND
2268	Profunda a Anacusia	N	N	NR	NR	ND	ND	ND	ND
2269	Profunda	N	Prematuridade Baixo peso ao nascer*	N	NR	ND	ND	ND	ND
2271	Profunda	N	N	N	NR	ND	ND	ND	ND
2282	Profunda a Anacusia	N	N	N	N	ND	c.35delG/wt p.Arg184Trp/wt [CGG>TGG] (C/T)	ND	ND
2288	Profunda a Anacusia	N	Otites de recorrência	N	S	ND	ND	ND	ND
2292	Profunda	N	N	N	N	p.Asn382Lys/wt [AAC>AAG](C/G)	ND	ND	ND
2297	Profunda	N	N	S IRMÃ	N	ND	ND	ND	ND
2299	Severa	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2301	Moderadamente severa	N	N	N	N	ND	c.35delG/wt	ND	ND
2314	Profunda	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2416	Profunda	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2587	Profunda	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND

Continua.

Tabela 1 - Caracterização clínica e molecular dos 88 pacientes estudados portadores de Surdez Neurossensorial Não-sindrômica Pré-lingual.

Continuação.

Paciente	Grau de Perda	Progressiva	Fatores de risco	Caso familiar	Consanguinidade	Resultados análise molecular			
						SLC26A4	GJB2	GJB6	MT-RNR1
2615	Severa	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2627	Severa	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2638	Moderadamente severa	S	N	S IRMÃ	N	ND	ND	ND	ND
2641	Profunda	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2642	Severa	N	NΔ	N	N	ND	ND	ND	ND
2643	Profunda a Anacusia	N	N	N	S	ND	ND	ND	ND
2644	Moderada a Profunda	S	N	S IRMÃOS	N	chr7:g.107301238C>G/wt	ND	ND	ND
2647	Profunda	S	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2650	Profunda	N	N	N	S	p.Ala189Ser/wt [GCC>TCC](G/T)	ND	ND	ND
2671	Profunda a Anacusia	N	Hiperbilirrubinemia	N	N	ND	c.35delG/ c.35delG	ND	ND
2672	Severa	N	N	S IRMÃ	N	ND	ND	ND	ND
2676	Moderada	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2683	Severa	S	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2685	Profunda	N	Otitis de recorrência	N	S	ND	ND	ND	ND
2696	Profunda	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2698	Profunda	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2711	Profunda	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2755	Severa	N	N	N	N	p.Asn324Tyr/wt [AAT>TAT](A/T)	ND	ND	ND
2757	NR	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2768	Profunda	N	N	N	S Primos em 1º grau	ND	c.35delG/ c.35delG	ND	ND
2769	Profunda	N	N	S IRMÃ	S Primos em 1º grau	ND	ND	ND	ND

Continua.

Tabela 1 - Caracterização clínica e molecular dos 88 pacientes estudados portadores de Surdez Neurossensorial Não-sindrômica Pré-lingual.

Continuação.

Paciente	Grau de Perda	Progressiva	Fatores de risco	Caso familiar	Consanguinidade	Resultados análise molecular			
						SLC26A4	GJB2	GJB6	MT-RNR1
2770	Moderada	S	N	N	N	chr7:g.107301238C>G/wt	ND	ND	ND
2772	Moderada	N	Prematuridade	S IRMÃOS	S	ND	ND	ND	ND
2778	Profunda	N	N	N	N	p.Leu597Ser/wt [TTA>TCA](T/C)	c.35delG/ c.35delG	ND	ND
2782	Severa	N	N	S MÃE E IRMÃOS	N	ND	ND	ND	ND
2786	NR	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2787	Profunda	N	N	S IRMÃOS	N	chr7:g.107301238C>G/wt p.Val609Gly/wt [GTT>GGT](T/G)	ND	ND	ND
2808	Profunda	N	Prematuridade Otites de recorrência	N	N	ND	ND	ND	ND
2843	Moderada	N	N	N	N	p.Ile254Val/wt [ATC>GTC](A/G)	ND	ND	ND
2853	Moderada	N	N	N	N	ND	c.35delG/wt	D13S1854/wt	ND
2905	Profunda	S	N	N	S Primos em 1º grau	chr7:g.107301238C>G/wt	ND	ND	ND
2906	Profunda	N	N	S MÃE E IRMÃOS	N	ND	c.35delG/wt	ND	ND
2922	Severa	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2939	Profunda	S	N	N	N	ND	ND	ND	ND
2940	Profunda	N	Otites de recorrência	N	N	ND	ND	ND	ND
2950	Profunda	S	Prematuridade	S TIO	N	ND	ND	ND	ND
2958	Profunda	N	Rubéola intra- uterina	N	N	ND	ND	ND	ND
2966	Profunda	N	N	N	NR	ND	ND	D13S1830/wt	ND

Continua.

Tabela 1 - Caracterização clínica e molecular dos 88 pacientes estudados portadores de Surdez Neurossensorial Não-sindrômica Pré-lingual.

Continuação.

Paciente	Grau de Perda	Progressiva	Fatores de risco	Caso familiar	Consanguinidade	Resultados análise molecular			
						SLC26A4	GJB2	GJB6	MT-RNR1
2967	Profunda	S	N	N	N	ND	ND	D13S1830/wt	ND
2975	Profunda	S	N	S TIO, AVÔ E PRIMO	N	ND	ND	ND	ND
3000	Severa	S	N	N	N	ND	ND	ND	ND
3020	Profunda	N	Má formação da orelha interna ^v	N	N	chr7:g.107301201T>C/wt chr7:g.107301238C>G/wt	ND	ND	ND
3025	Profunda	N	N	S IRMÃ	N	p.Ile300Leu/wt [ATT>CTT](A/C)	ND	ND	ND
3048	Profunda	N	N	N	S Primos em 1º grau	ND	c.35delG/ c.35delG	ND	ND
3049	Moderadamente severa	N	Meningite neonatal	N	N	ND	ND	ND	ND
3052	Severa	N	Prematuridade	S TIA	N	ND	c.35delG/wt	D13S1854	ND
3055	Severa	N	N	S IRMÃO	S Primos em 2º grau	p.Ile300Leu/wt [ATT>CTT](A/C)	ND	ND	ND
3059	Severa	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND
3057	Severa	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND
3067	Profunda	N	N	N	N	p.Val609Gly/wt [GTT>GGT](T/G)	p.Val27Ile/wt [GTC>ATC] (G/A)	ND	ND
3077	Profunda	N	Prematuridade Baixo peso ao nascer*	N	N	ND	ND	ND	ND
3080	Profunda	N	N	S PRIMOS	N	chr7:g.107301238C>G/wt p.Val609Gly/wt [GTT>GGT](T/G)	ND	ND	ND
3100	Profunda	N	NΔ	S IRMÃO	N	ND	ND	ND	ND
3101	Moderada	N	N	N	N	p.Gly5Gly/wt [GGC>GGA](C/A)	ND	ND	ND

Continua.

Tabela 1 - Caracterização clínica e molecular dos 88 pacientes estudados portadores de Surdez Neurossensorial Não-sindrômica Pré-lingual.

Continuação.

Paciente	Grau de Perda	Progressiva	Fatores de risco	Caso familiar	Consanguinidade	Resultados análise molecular			
						SLC26A4	GJB2	GJB6	MT-RNR1
3108	Moderada	N	Hiperbilirrubinemia	S PRIMO	N	chr7:g.107301238C>G/wt	ND	ND	ND
3122	Moderada	N	N	S MÃE	N	ND	ND	ND	ND
3130	Profunda	N	NR	N	N	p.Val609Gly/wt [GTT>GGT](T/G)	ND	ND	ND
3131	Profunda	N	N	N	S Primos em 2º grau	chr7:g.107301238C>G/wt p.Asn324Tyr/wt [AAT>TAT](A/T)	c.35delG/wt	D13S1854	ND
3137	Profunda	N	Toxoplasmose intra-uterina	S AVÓ E PRIMA	N	ND	ND	ND	ND
3152	Profunda	N	Prematuridade Baixo peso ao nascer*	N	N	ND	ND	ND	ND
3153	Profunda	N	N	S MÃE	S Primos em 1º grau	ND	ND	ND	ND
3164	Profunda	N	Otitis de recorrência	N	N	ND	ND	ND	ND
3188	Severa	N	Prematuridade Baixo peso ao nascer*	N	N	chr7:g.107301238C>G/wt	ND	ND	ND
3196	Profunda	N	Otitis de recorrência	N	N	p.Ile300Leu/wt [ATT>CTT](A/C)	ND	ND	ND
3252	Moderada	N	N	S AVÓ E TIOS	S Avós maternos	ND	ND	ND	ND
3254	Profunda	N	N	N	N	chr7:g.107301238C>G/wt	ND	ND	ND
3301	Profunda	N	N	N	N	chr7:g.107301238C>G/wt	c.35delG/ c.35delG	ND	ND
3306	Severa	N	Otitis de recorrência	S AVÓ	N	ND	ND	ND	ND
3318	Moderada	N	N	S IRMÃO	N	chr7:g.107301238C>G/wt p.Gly139Arg/wt [GGA>AGA](G/A)	ND	ND	ND
3320	Profunda	N	N	S TIOS	N	ND	ND	ND	ND

Continua.

Tabela 1 - Caracterização clínica e molecular dos 88 pacientes estudados portadores de Surdez Neurossensorial Não-sindrômica Pré-lingual.

Conclusão.

Paciente	Grau de Perda	Progressiva	Fatores de risco	Caso familiar	Consanguinidade	Resultados análise molecular			
						SLC26A4	GJB2	GJB6	MT-RNR1
3324	Profunda	N	Hiperbilirrubinemia	N	N	ND	p.Arg127Cys/wt [CGC>TGC] (C/T)	ND	ND
3326	Profunda	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND

“N” refere-se à ausência do fator estudado e “S” à presença do fator estudado. “NR” corresponde a um fato na relatado. “SAVA” refere-se à Síndrome do Aqueduto Vestibular Alargado. “ND” refere-se à nada detectado (nenhuma alteração encontrada) neste gene, neste paciente. “wt” refere-se à presença de um alelo *wild type* ou selvagem. *Baixo peso ao nascer corresponde a ≤ 1500 g. †Tomografia computadorizada dos ouvidos: malformação da orelha interna à direita com provável partição incompleta tipo I. À esquerda, provável cavidade única. Redução do material na cavidade cirúrgica direita. Foco de descontinuidade óssea do tegmen timpânico com comunicação com a fossa temporal. Cadeia ossicular invisibilizada. NΔ representa aqueles pacientes que não apresentaram fatores de risco mas em que outros achados foram relatados como suspeita de Síndrome de Usher (paciente 2642) e Síndrome do Aqueduto Vestibular Alargado (paciente 3100)

APÊNDICE B – Imagens das curvas brutas de *melting* sugestivas de alterações pela técnica de HRM e seus respectivos cromatogramas que confirmam as mutações pelo seqüenciamento pela metodologia de Sanger.

Figura 1. Mutação chr7:g.107301238C>G. (A) Padrão de curvas obtido através da análise por HRM e (B) cromatograma obtido por seqüenciamento Sanger, evidenciando a troca de um C→G na posição genômica 107301238 no éxon1 do gene SLC26A4.

Figura 2. Mutação p.Gly5Gly. (A) Padrão de curvas obtido através da análise por HRM e (B) cromatograma obtido por seqüenciamento Sanger, evidenciando a troca de um C→A causando uma troca sinônima no aminoácido 5 (Gly) codificado no éxon 2 do gene SLC26A4.

Figura 3. Mutação p.Ala189Ser. (A) Padrão de curvas obtido através da análise por HRM e (B) cromatograma obtido por seqüenciamento Sanger, evidenciando a troca de um G→T causando uma troca no aminoácido 189 (Ala→Ser) codificado no éxon 5 do gene SLC26A4.

Figura 4. Mutação p.Ile300Leu. (A) Padrão de curvas obtido através da análise por HRM e (B) cromatograma obtido por seqüenciamento Sanger, evidenciando a troca de um A→C causando uma troca no aminoácido 300 (Ile→Leu) codificado no éxon 7 do gene SLC26A4.

Figura 5. Mutação p.Asn324Tyr. (A) Padrão de curvas obtido através da análise por HRM e (B) cromatograma obtido por seqüenciamento Sanger, evidenciando a troca de um A→T causando uma troca no aminoácido 324 (Asn→Tyr) codificado no éxon 8 do gene SLC26A4.

Figura 6. Mutação p.Leu597Ser. (A) Padrão de curvas obtido através da análise por HRM e (B) cromatograma obtido por seqüenciamento Sanger, evidenciando a troca de um T→C causando uma troca no aminoácido 597 (Leu→Ser) codificado no éxon 16 do gene SLC26A4.

Figura 7. Mutação p.Val609Gly. (A) Padrão de curvas obtido através da análise por HRM e (B) cromatograma obtido por seqüenciamento Sanger, evidenciando a troca de um T→G causando uma troca no aminoácido 609 (Val→Gly) codificado no éxon 17 do gene SLC26A4.

ANEXO A - Carta de aprovação do projeto de pesquisa do comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HC-FMRP).

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 13 de fevereiro de 2008.

Ofício nº. 469/2008.
CEP/ MG V

Prezada Senhora,

O trabalho intitulado **“ESTUDO MOLECULAR EM PACIENTES COM SURDEZ NEUROSENSORIAL NÃO-SINDRÔMICA ATENDIDOS NO HCRP”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 260ª Reunião Ordinária, realizada em 12/02/2008, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o Processo HCRP nº. 8736/2007.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da Pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
MARIA JULIANA RODOVALHO DORIQUEI
PROF. DR. WILSON ARAÚJO DA SILVA JUNIOR (ORIENTADOR)
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto - FUNDHERP

Comitê de Ética em Pesquisa HC e FMRP-USP - Campus Universitário

FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186

Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 10 de dezembro de 2014.

Ofício n.º 4486/2014
CEP/MGV

PROCESSO HCRP Nº. 8736/2007

Prezado Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 400ª Reunião Ordinária, realizada em 08/12/2014, analisou e aprovou a solicitação de emenda, bem como o projeto de pesquisa datado de 2014 e o relatório parcial da pesquisa: “ESTUDO MOLECULAR EM PACIENTES COM SURDEZ NEUROSSENSORIAL NÃO-SINDRÔMICA ATENDIDOS NO HCRP”.

Atenciosamente,

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. WILSON ARAUJO DA SILVA JR
Departamento de Genética da FMRP-USP

Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil / CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br