

**RENATA WATANABE NONOSE**

**ESTUDOS MOLECULARES NA SURDEZ DE HERANÇA AUTOSSÔMICA RECESSIVA:  
O PAPEL DO GENE *SLC26A4***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto

Versão original

São Paulo  
2013

## RESUMO

Nonose RW. Estudos moleculares na surdez de herança autossômica recessiva: o papel do gene *SLC26A4*. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Mutações no gene *SLC26A4* estão relacionadas a dois distúrbios de herança autossômica recessiva, a síndrome de Pendred (SP) e uma forma de surdez não sindrômica (DFNB4). A síndrome de Pendred é caracterizada por surdez sensorineural congênita e, frequentemente, por bócio ou por disfunções da tireóide. Ambos os distúrbios têm características similares quanto à surdez: bilateral, pré-lingual ou pós-lingual, frequentemente grave ou profunda e que pode estar associada a malformações cócleo-vestibulares, como dilatação do aqueduto vestibular ou displasia de Mondini. O objetivo do estudo foi verificar se mutações no gene *SLC26A4* são causa frequente de surdez hereditária de herança autossômica recessiva em famílias brasileiras. Essas famílias foram selecionadas por apresentarem histórico de surdez não sindrômica e genealogias que sugerem provável herança autossômica recessiva. Foi realizada a análise de haplótipos de microssatélites ligados ao gene *SLC26A4*, seguida do sequenciamento dos 20 exons codificadores nas famílias em que o padrão de segregação dos microssatélites foi compatível com ligação a esse gene. Outro objetivo do estudo foi identificar mutações nesse gene, também por meio de sequenciamento, em pacientes da casuística com suspeita clínica de síndrome de Pendred (surdez e disfunções da tireóide) ou que apresentaram surdez associada a malformações cócleo-vestibulares. Os casos em que o sequenciamento indicou mutações em um único alelo (monoalélicas) ou resultados normais também foram investigados por MLPA (*Multiplex ligation-probe amplification*), técnica que detecta variação de números de cópias de segmentos de DNA. Nesse estudo, entre as 70 famílias genotipadas com relação aos microssatélites, 16 mostraram resultados compatíveis com ligação ao gene em estudo. Nas demais 54, a participação do gene *SLC26A4* foi excluída. Em dois desses 16 propósitos, foram encontradas 4 mutações diferentes, provavelmente patogênicas, em heterozigose composta, sendo três delas novas, c.1003T>G (p.F335V), c. 1553G>A (p.W518X) e c.2235+2T>C (IVS19+2T>C), e uma já descrita, c.84C>A (p.S28R). Com relação ao grupo dos pacientes que apresentaram surdez associada a malformações cócleo-vestibulares ou suspeita de síndrome de Pendred, três propósitos apresentaram pelo menos uma mutação provavelmente patogênica no gene *SLC26A4*. Em dois propósitos foram encontradas mutações monoalélicas em heterozigose, provavelmente patogênicas, sendo uma delas nova, IVS7+2T>C, e outra já descrita como provavelmente patogênica, c.1246A>C (p.T416P). No outro propósito foi encontrada uma mutação em homozigose, c.898A>C (p.I300L), a qual já foi descrita como rara (0,9% de heterozigotos em população saudável) em banco de dados, porém não há informações elucidativas quanto a sua patogenicidade quando em homozigose. Estudos dessas variantes provavelmente patogênicas serão conduzidos futuramente em populações de controles ouvintes. Portanto, em uma amostra da população brasileira, mutações provavelmente patogênicas no gene *SLC26A4* explicaram 3% dos casos selecionados pela surdez de herança autossômica recessiva e cerca de 20% dos casos isolados em que a surdez ocorreu associada a malformações cócleo-vestibulares ou suspeita de síndrome de Pendred apresentaram pelo menos uma mutação patogênica nesse gene. Esses dados reforçam a importância da triagem de mutações nesse gene em brasileiros,

especialmente nos casos familiares de surdez com provável herança autossômica recessiva, assim como nos casos isolados de surdez associada a malformações cócleo-vestibulares.

Palavras-chave: Surdez. Genética. Mutação. Síndrome de Pendred. DFNB4. Gene *SLC26A4*.

## ABSTRACT

Nonose RW. Molecular studies in autosomal recessive deafness: the role of *SLC26A4* gene. [Masters thesis (Biotechnology)] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Mutations in the *SLC26A4* gene are associated with two autosomal recessive disorders, Pendred syndrome (PS) and a form of non-syndromic deafness (DFNB4). Pendred syndrome is characterized by congenital sensorineural deafness and, frequently, by goiter or by thyroid dysfunctions. Both disorders have similar audiologic characteristics: bilateral, pre-lingual or post-lingual deafness, often severe or profound, which may be associated with abnormalities of the inner ear, such as dilatation of the vestibular aqueduct or Mondini dysplasia. The aim of this study was to determine whether mutations in the *SLC26A4* gene are a frequent cause of hereditary deafness among Brazilian families presenting autosomic recessive transmission. These families were selected due to history of non-syndromic deafness and pedigrees that suggest probable autosomal recessive inheritance. This goal was achieved through the analysis of microsatellite haplotypes linked to the *SLC26A4* gene, followed by sequencing of the 20 coding exons in families in which the pattern of segregation of microsatellites was consistent with linkage to the gene. Another aim of this study was identify mutations in the *SLC26A4* gene, also by sequencing, in individuals with clinically suspected Pendred syndrome (deafness and thyroid dysfunction) or who presented cochleovestibular malformations. Cases in which sequencing revealed mutations in only one allele (monoallelic) or normal results were also investigated by MLPA (Multiplex ligation-amplification probe), technique that detects copy-number variations. In this study, 70 families had microsatellites genotyped. In 16 families, segregation proved to be compatible with linkage to the gene. In the remaining 54 families, the participation of the *SLC26A4* gene was excluded. In two of the 16 probands, four different mutations, probably pathogenic, were found in compound heterozygosis, three of them being novel mutations, c.1003T> G (p.F335V), c. 1553G> A (p.W518X) and c.2235 +2 T> C (IVS19 +2 T> C), and one had already been described, c.84C> A (p.S28R). Regarding the patients who presented deafness associated with cochleovestibular malformations or suspected Pendred syndrome, three subjects showed at least one probably pathogenic mutation in the *SLC26A4* gene. In two probands, the probably pathogenic mutations were found in only one allele, one being a novel mutation, IVS7 +2 T> C, and another had been previously described, c.1246A> C (p.T416P). In the other proband, a homozygous mutation, c.898A> C (p.I300L) was found, which had already been described as rare (0,9% of heterozygotes in healthy population) in databases, but there is no information regarding the pathogenicity of this mutation in homozygosis. In the near future, screening of these probably pathogenic variants will be performed in populations of hearing controls. Therefore, in a sample from the Brazilian population, probably pathogenic mutations in the *SLC26A4* gene explain about 3% of the cases selected by autosomal recessive deafness and were present in about 20% of isolated cases where deafness occurred associated with cochleovestibular malformations or suspected Pendred syndrome, in at least one allele. These data indicate the importance of screening of this gene among Brazilians, especially in familial cases of deafness with probably autosomal recessive inheritance, as well as in isolated cases of deafness associated with cochleovestibular malformations.

Keywords: Deafness. Genetics. Mutation. Pendred syndrome. DFNB4. *SLC26A4* gene.

# 1 INTRODUÇÃO

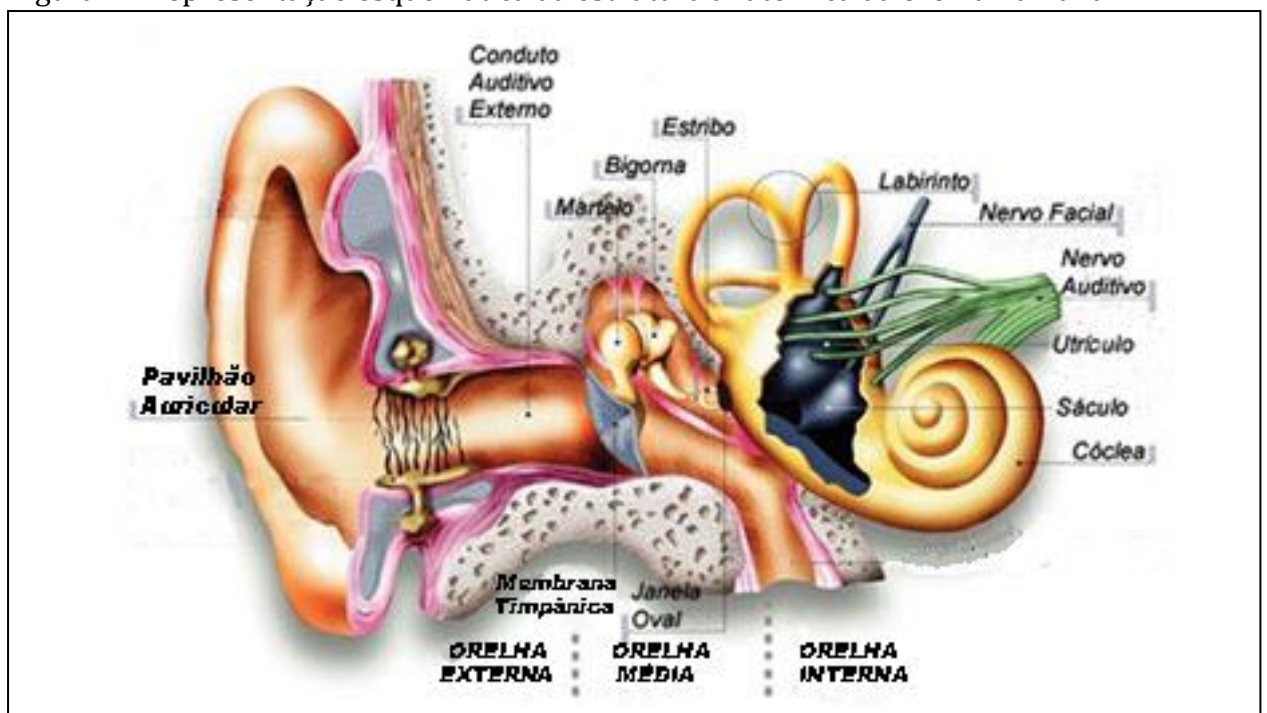
## 1.1 Estrutura da orelha

A orelha pode ser dividida, do ponto de vista didático, em três regiões anatomicamente e funcionalmente distintas: orelha externa, orelha média e orelha interna (figura 1).

A orelha externa é formada pelo pavilhão auricular e conduto auditivo externo. Ela capta as ondas sonoras provenientes de uma grande área, propagando-as sobre a membrana timpânica, que constitui o limite medial da orelha externa, separando-a da orelha média.

A orelha média é uma cavidade cheia de ar escavada no osso temporal, constituída pela membrana timpânica, cavidade timpânica, células mastoideas, antro mastoideo e tuba auditiva, na qual residem os ossículos: martelo, bigorna e estribo. Devido ao acoplamento mecânico da membrana timpânica aos ossículos, a energia resultante da vibração das ondas sonoras é amplificada e conduzida por eles até a orelha interna (Petit, 1996).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura anatômica da orelha humana



Fonte: Modificado de Só Biologia (Grupo Virtuous – Tecnologia educacional, 2012).

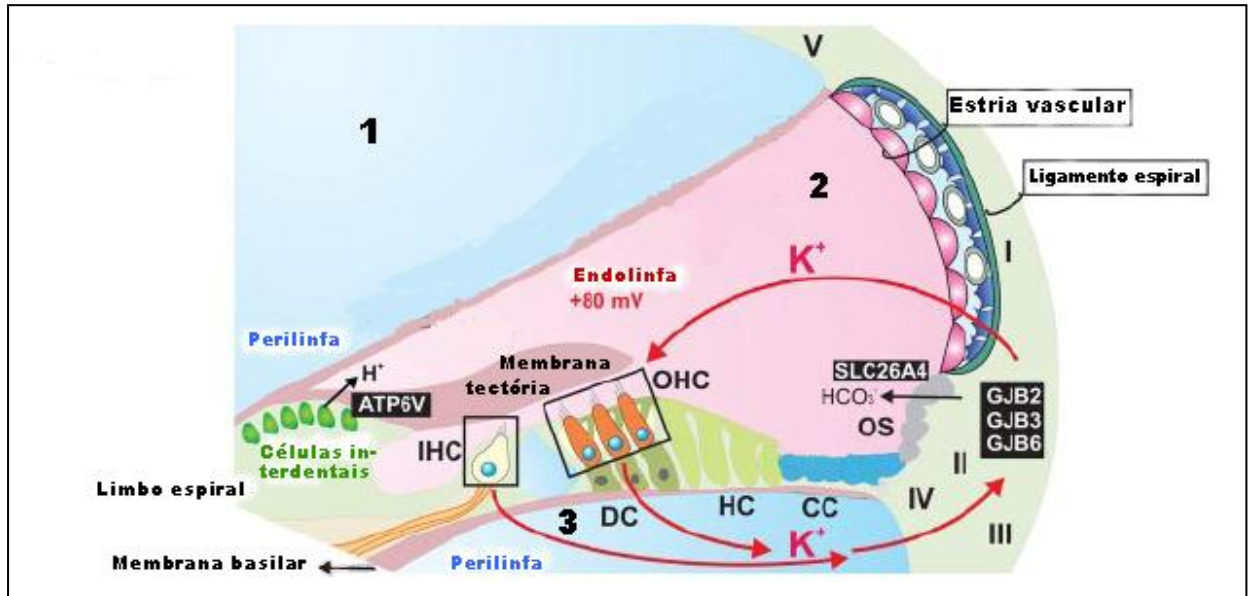
A orelha interna está localizada na porção petrosa do osso temporal. É constituída pelo labirinto ósseo, labirinto membranoso. O labirinto ósseo é revestido por membranas que constituem o labirinto membranoso e essas duas estruturas são preenchidas por líquidos (perifinfa e/ou endolinfa). A orelha interna limita-se com a orelha média pelas janelas oval e redonda. A orelha interna apresenta em sua porção anterior, a cóclea, responsável pela transdução da onda sonora mecânica em estímulo elétrico, e em sua porção posterior, o vestíbulo, composto pelo sáculo, utrículo e os três canais semicirculares, responsáveis por captar os sinais biológicos de aceleração angular e linear da cabeça no espaço, convertendo-os em sinais elétricos que irão contribuir para o fenômeno do equilíbrio (Baloh, Honrubia, 2001; Kandel et al., 2000).

A cóclea é um canal ósseo-membranoso em forma de caracol, dividido em três compartimentos longitudinais: escala vestibular, escala média (ou duto coclear) e escala timpânica. Esses compartimentos são preenchidos por fluidos: perilinfa, endolinfa e perilinfa, respectivamente (revisão em Dror, Avraham, 2009).

Em seu compartimento central, escala média, está localizado o órgão de Corti, epitélio sensorial auditivo propriamente dito. Esse órgão, situado sobre a membrana basilar, é constituído por células de suporte e células ciliadas (internas e externas), representadas nas figuras 2 e 5 (revisão em Dror, Avraham, 2009). Diferentemente do que se observa nos epitélios sensoriais auditivos de outros vertebrados, existem diversos tipos de células de suporte em mamíferos, incluindo a espécie humana. Dentre as células de suporte temos: (a) as células de Deiters que separam as células ciliadas externas; (b) as células Pillar que separam as células ciliadas externas das células ciliadas internas, formando o túnel de Corti; (c) as células Falangeais e (d) *Borders* que separam as células ciliadas internas; (e) as células de Hensen e (f) *Claudius* (Driver, Kelley, 2009). Sabe-se que no período embrionário, as células de suporte atuam como células-tronco ou progenitoras da orelha interna, função esta ativamente bloqueada após maturação do epitélio sensorial auditivo. Já as células ciliadas internas desempenham a função da transdução do som em sinais nervosos, enquanto que as externas apresentam tanto elementos sensoriais quanto motores, contribuem para uma maior sensibilidade e discriminação das frequências por meio da amplificação da recepção do som (Kandel et al., 2000). Na porção apical das células ciliadas estão presentes projeções especializadas denominadas cílios, dispostos em escada, dos menores deles (estereocílios) aos maiores deles (cinocílios). Por fim, uma membrana

acelular, denominada membrana tectória, repousa sobre os cílios das células ciliadas (revisão em Dror, Avraham, 2009).

Figura 2 - Esquema representando os compartimentos da cóclea.



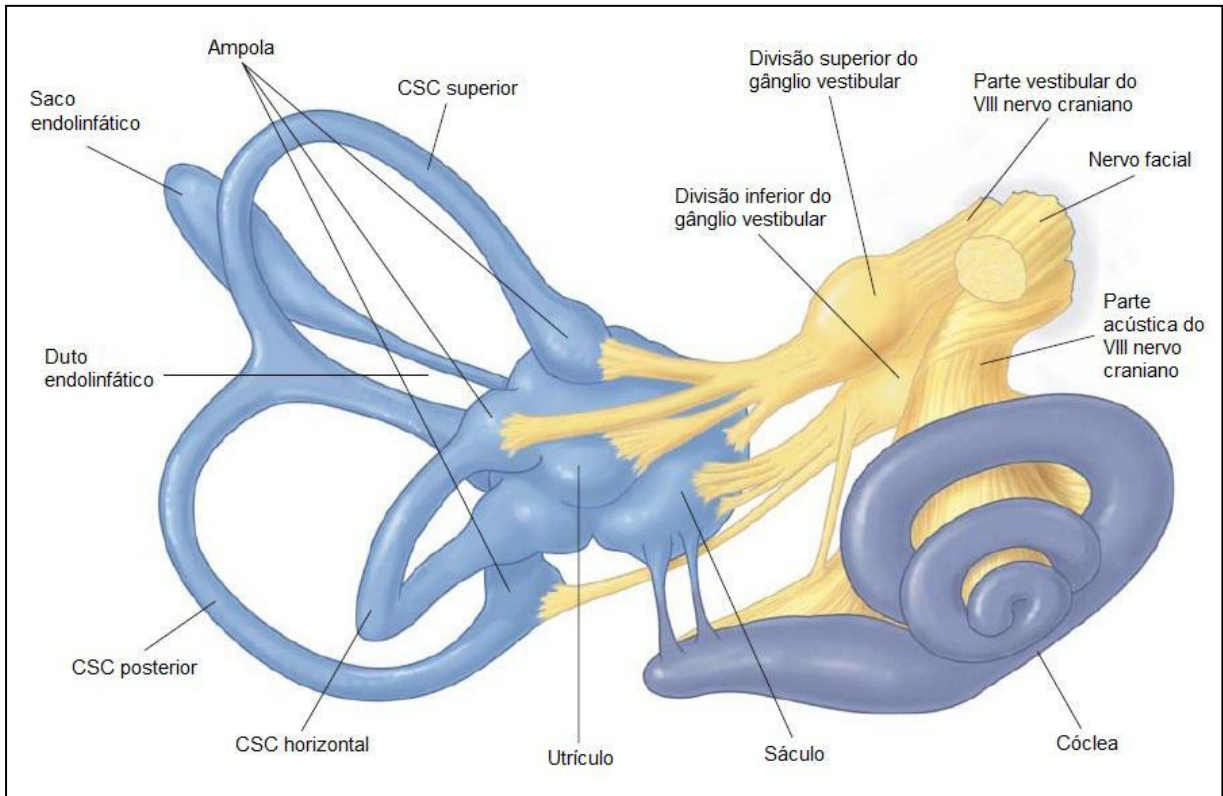
1: escala vestibular. 2: escala média ou duto coclear. 3: escala timpânica. DC: células Deiter's. CC: células Claudius'. HC: células Hensen's. OS: células do sulco externo. I-V: tipos de fibrócitos especializados.

Fonte: Modificada de Lang et al. (2007).

O vestíbulo (sáculo, utrículo e canais semicirculares) é preenchido por endolinfa e juntos abrigam as cinco estruturas sensoriais do sistema vestibular periférico a cada lado do crânio, compostas pelas duas máculas e pelas três cúpulas. O utrículo e o sáculo são também chamados de órgãos otolíticos. Deles originam-se os dutos que irão se unir para formar o duto endolinfático. Este atravessa o aqueduto vestibular e termina no saco endolinfático, cuja função ainda não está definida (Baloh, Honrubia, 2001). Os canais semicirculares são três de cada lado, denominados de superior ou anterior, lateral ou horizontal e posterior ou frontal. Cada canal tem uma extremidade dilatada chamada de ampola e uma extremidade não ampolar (figura 3). O sistema vestibular periférico também é constituído por células de suporte e células ciliadas (Baloh, Honrubia, 2001).



Figura 3 - Representação esquemática da cóclea, do sistema vestibular periférico juntamente com o ducto endolinfático e o saco endolinfático.



CSC: canal semicircular.

Fonte: Modificada de MedicinaNET (Corpo Editorial da MedicinaNET, 2012).

## 1.2 Fisiologia da audição

O principal órgão responsável pela audição é a orelha, a qual capta o som e transforma-o em estímulos nervosos que são enviados ao nervo auditivo para chegar ao cérebro.

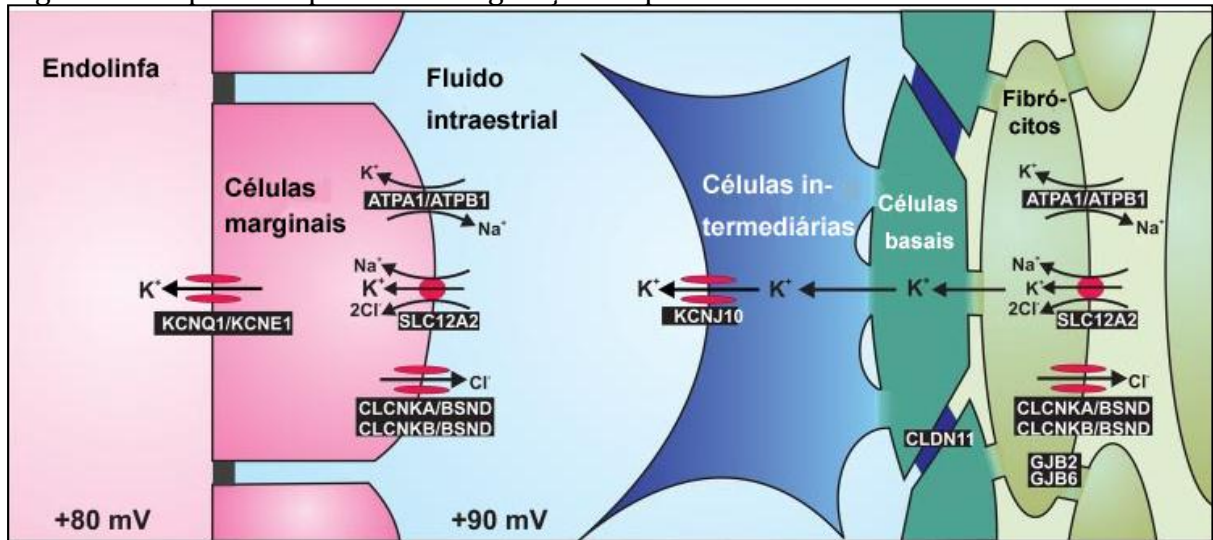
Quando o som é captado, fluidos se movem pela escala média e fazem vibrar a membrana basilar e a membrana tectória. As vibrações são o gatilho para a deflexão dos estereocílios das células ciliadas internas, permitindo o influxo de íons potássio por meio da abertura de canais que irão despolarizar a membrana dessas células. Essa despolarização provoca liberação de vesículas contendo neurotransmissores nas células ciliadas internas ou externas que irão desencadear o impulso nervoso e assim transmitir a informação ao cérebro via nervo acústico (revisão em Dror, Avraham, 2009).

O mecanismo básico de transdução tanto na cóclea quanto no sistema vestibular periférico é o mesmo, pois apesar de possuírem necessidades eletroquímicas diferentes, ambos dependem da ciclagem de  $K^+$  entre a endolinfa e a perilinf. Por exemplo, na

cóclea, onde a diferença de composição iônica entre endolinfa (escala média) e a perilinfa (escalas timpanica e vestibular) gera o potencial endococlear, que é de fundamental importância para a transdução do estímulo sonoro em estímulo elétrico (Baloh, Honrubia, 2001; Kandel et al., 2000).

O potencial endococlear é essencialmente um potencial de equilíbrio de  $K^+$  que é gerado pelo canal de  $K^+$  (KCNJ10) nas células intermediárias da estria vascular (representada nas figuras 2 e 4), em conjunto com uma baixa concentração de  $K^+$  no fluido intraestrial e uma alta concentração de  $K^+$  citosólica nas células intermediárias (Marcus et al., 2002; Tacheuchi et al., 2000).

Figura 4 - Esquema representando geração do potencial endococlear na estria vascular.



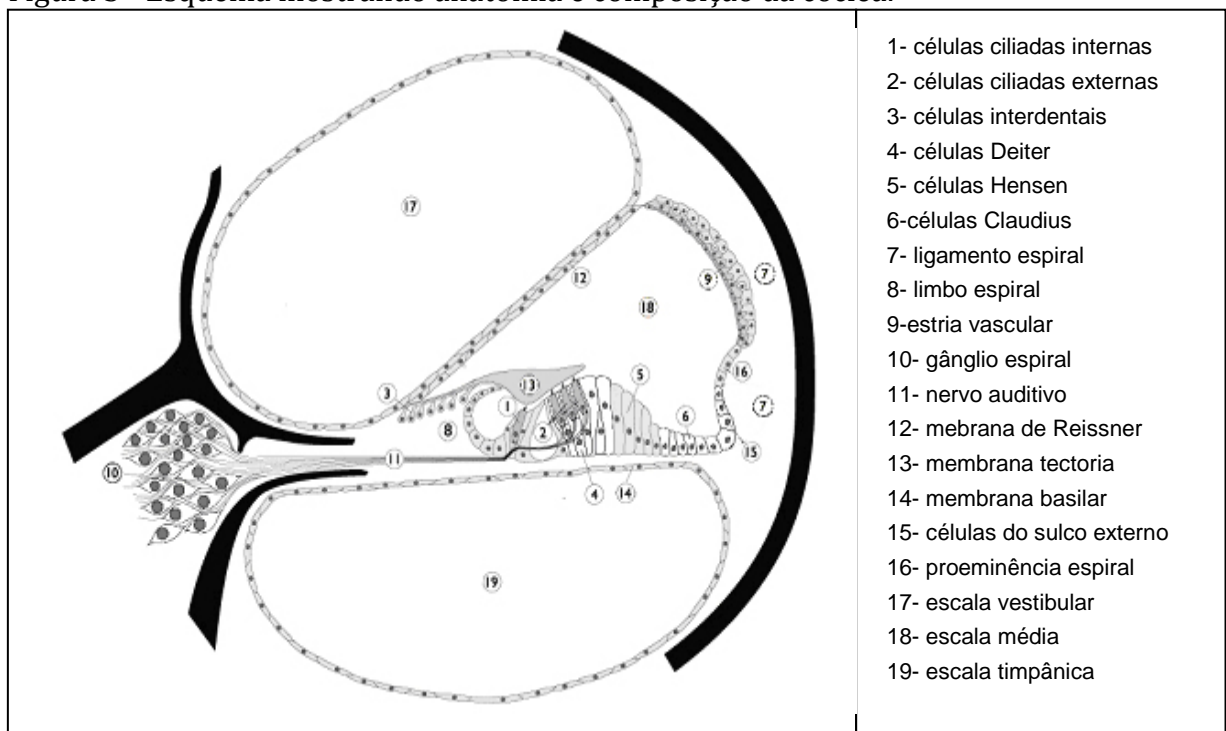
Fonte: Modificada de Lang et al. (2007).

### 1.2.1 Manutenção do pH na orelha interna

Uma característica fundamental à manutenção da homeostase da orelha interna é o pH da endolinfa. Na cóclea e no utrículo, o pH endolinfático é levemente alcalino (pH 7,5). No saco endolinfático, o pH é mais ácido (pH 6,6 – 7,1). A presença dessas diferenças ressalta que a homeostasia de fluido nos diferentes compartimentos da orelha interna é controlada pelo transporte de íons local no epitélio adjacente ao invés de ocorrer simplesmente por meio de fluxo de fluidos entre os compartimentos da orelha interna, o que permitiria prever que o pH seria igual em todos os compartimentos (Salt, 2001).

A homeostase do pH endolinfático de toda a orelha interna depende da secreção de  $H^+$  e  $HCO_3^-$ . Células epiteliais que expressam  $H^+$ -ATPase na sua membrana apical incluem células interdentais do limbo espiral (figura 2), células marginais da estria vascular assim como do duto endolinfático e as células epiteliais do saco endolinfático (Dou et al., 2004; Karet et al., 1999; Stankovic et al., 1997). Além disso, as células epiteliais que expressam na sua membrana apical o permutador transmembrânico aniônico  $HCO_3^-$  (pendrina) incluem: as células da proeminência espiral, células epiteliais do sulco externo, células fusiformes da estria vascular e células de suporte da cóclea (Claudius, Deiters' e Hensen's), representadas na figura 5, assim como as células da membrana apical do duto endolinfático e do saco endolinfático (Dou et al., 2004; Everett et al., 1999; Wangemann et al., 2004; Yoshino et al., 2004; Yoshino et al., 2006). Yoshino et al., em 2006, também identificou a expressão da pendrina, por meio de microscopia eletrônica, nos estereocílios das células ciliadas internas e externas em camundongos, porém não há outros relatos da expressão dessa proteína nessas estruturas.

Figura 5 - Esquema mostrando anatomia e composição da cóclea.



Fonte: Modificada de Van Camp e Smith (2012).

Aparentemente, os principais tamponantes da endolinfa coclear também são o  $CO_2$  e  $HCO_3^-$  (Hultcrantz et al., 1997; Porubsky et al., 1972). Células marginais da estria

vascular são importantes fontes locais de  $\text{CO}_2$  devido a sua alta taxa metabólica e ao uso da via das pentoses (Marcus et al., 1978).

A anidrase carbônica na estria vascular, no ligamento espiral e no limbo espiral captura metabolicamente derivados de  $\text{CO}_2$  e converte-os em  $\text{HCO}_3^-$  (Lim et al., 1983; Okamura et al., 1996; Spicer, Schulte, 1991). O  $\text{HCO}_3^-$  gerado pode ser secretado na endolinfa por meio da pendrina (permutador transmembrânico aniônico -  $\text{HCO}_3^-$ ) (Nakaya et al., 2007; Wangemann et al., 2007). O aumento da taxa metabólica durante a estimulação acústica causa uma alcalinização da endolinfa, o que resulta de um aumento da secreção do  $\text{HCO}_3^-$  (Ikeda, Morizono, 1988).

Portanto, a homeostase do pH endolinfático, além da sua composição iônica, é também um fator essencial para manutenção da audição e prevenção do quadro clínico de surdez.

### **1.3 Deficiência auditiva**

A existência de deficiência auditiva na infância, independentemente de seu grau, faz com que a criança apresente dificuldades educacionais, uma vez que muitas das situações de aprendizagem são primariamente auditivas. Além de essa deficiência prejudicar o desenvolvimento da linguagem oral, posteriormente as capacidades de leitura e escrita podem ser também alteradas, já que são funções linguísticas construídas a partir da fala.

De acordo com dados da *World Health Organization* (WHO, 2012) aproximadamente 360 milhões de pessoas no mundo inteiro sofrem desse distúrbio e é estimado que cerca de 30% dos adultos exibirão perda auditiva significativa a partir dos 65 anos de idade. Em países desenvolvidos, a taxa de perda auditiva congênita permanente entre recém-nascidos é de 1 por 500 nascidos vivos (Smith et al., 2012). No Brasil, estimou-se que 4 em 1000 indivíduos apresentem o defeito ao nascimento, sendo que até a década de noventa a deficiência auditiva hereditária era responsável por cerca de 16% do total de casos de surdez no país (Braga et al., 1999). Portanto, a deficiência auditiva é considerada um dos transtornos sensoriais mais comuns em todo o mundo (Bitner-Glindzicz, 2002).

A definição do termo surdez utilizado nesse estudo é a de qualquer déficit ou comprometimento auditivo independente do tipo ou grau, embora para alguns especialistas o termo deva ser reservado para perdas graves ou profundas.

As perdas de audição podem ser classificadas quanto ao seu grau, à idade de seu aparecimento e ao local da lesão auditiva. Quanto ao grau, as perdas podem ser classificadas em deficiência auditiva leve (21-40 dB); deficiência auditiva moderada (41-70 dB), deficiência auditiva grave (71-90 dB) e deficiência auditiva profunda (acima de 91 dB) (Davis, Silvermam, 1970).

Em relação ao momento de aparecimento, a deficiência auditiva é classificada de acordo com o período da aquisição da linguagem, podendo ser dividida, então, em pré-lingual e pós-lingual.

Pode ainda ser classificada, quanto ao local da lesão, em: surdez de transmissão (condutiva), quando o problema se localiza na orelha externa ou média e impede fisicamente a condução do som; surdez de percepção (sensorineural) quando o problema se localiza na orelha interna (células ciliadas do órgão coclear de Corti) e/ou no nervo auditivo coclear ou até afetando vias auditivas em qualquer ponto do tronco ou do encéfalo; ou ainda, surdez denominada de mista, quando há afecção condutiva e sensorineural concomitantes.

As causas de deficiência auditiva são inúmeras e podem ser agrupadas de modo simplificado em ambientais ou genéticas.

Um grande número de fatores ambientais pode ser responsável pela perda auditiva no período pré-natal. Por exemplo, infecções congênicas (toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes e sífilis) e o diabetes materno, podem levar à surdez. Já no período peri-natal, atuam fatores como: hiperbilirrubinemia em nível que necessite de exosanguíneotransfusão, prematuridade, anoxia, infecção hospitalar. No período pós-natal, a meningite e os medicamentos ototóxicos são fatores que podem levar à surdez (Smith et al., 2012).

#### **1.4 Deficiência auditiva de etiologia genética**

O sistema auditivo é complexo e especializado e requer a interação de diversos genes e proteínas para funcionar normalmente. Existem evidências da ação de mecanismos gênicos em cascata no desenvolvimento do sistema auditivo humano. O

estudo da surdez genética tem auxiliado a compreensão de como a orelha interna funciona em nível molecular, mostrando que muitos genes codificam bombas ou canais iônicos, fatores de transcrição, componentes da matriz extracelular, componentes do citoesqueleto celular, moléculas transportadoras (por exemplo, proteínas essenciais para o tráfego de vesículas sinápticas), moléculas sinalizadoras, receptores, reguladores da proliferação celular, enzimas diversas e proteínas das junções comunicantes, para comunicação intercelular (Eisen, Ryugo, 2007).

Levantamentos epidemiológicos com relação à surdez têm consistentemente mostrado que, em países desenvolvidos, cerca de 50% dos casos de surdez na infância podem ser atribuídos a fatores genéticos, que na maioria das vezes estão associados à mutação em um único gene (Bitner-Glindzicz, 2002).

A deficiência auditiva de etiologia genética pode ser dividida em formas sindrômicas, que respondem por cerca de 30% dos indivíduos com surdez pré-lingual e ocorre geralmente associada a síndromes reconhecidas, e formas não sindrômicas, que correspondem a cerca de 70% dos indivíduos com surdez geneticamente determinada, os quais não apresentam qualquer outra característica clínica (Petersen, Willems, 2006).

Um grande número de síndromes já foi descrito em que a deficiência auditiva é uma das anomalias associadas, além de diversos defeitos na formação embriológica da orelha e cerca de 35 genes já foram mapeados no genoma humano relacionados com estas síndromes (Van Camp, Smith, 2012).

Algumas das principais síndromes que apresentam surdez como um de seus sinais mais característicos são: a síndrome de Waardenburg (com defeitos de pigmentação e hipertelorismo) – OMIM#193500, a síndrome de Treacher-Collins (com anormalidades craniofaciais) – OMIM# 154500, a síndrome de Usher (com retinose pigmentar) – OMIM#276900, a síndrome de Pendred (com bócio) – OMIM#274600, a síndrome de Alport (com defeitos renais) – OMIM#301050 e a síndrome branquio-oto-renal (com defeitos craniofaciais e renais) – OMIM#113650.

As deficiências auditivas sindrômicas podem ocasionar alterações condutivas, sensorineurais ou ambas. Em contraste, as perdas auditivas não sindrômicas pré-linguais são quase que exclusivamente sensorineurais (Bitner-Glindzicz, 2002; Van Laer et al., 2003).

A surdez hereditária constitui um exemplo notável das doenças geneticamente heterogêneas, ou seja, que apesar de clinicamente semelhantes, são condicionadas por mecanismos de transmissão diferentes ou por mutações em *loci* diferentes.

### 1.5 Surdez hereditária não-sindrômica

Estão relacionados à surdez hereditária não-sindrômica em torno de 66 *loci* responsáveis por perda auditiva de herança autossômica recessiva e, desses, 41 já tiveram seus genes identificados; são cerca de 49 *loci* autossômicos dominantes, sendo que desses, 27 genes já foram identificados; cinco é o número de *loci* de deficiência auditiva ligada ao cromossomo X, com três genes identificados; e são sete as mutações principais do DNA mitocondrial, localizadas em dois genes (Van Camp, Smith, 2012). Continuamente são localizados e identificados novos genes, estimando-se que venham a atingir um número total entre 100 a 200 *loci* (Kimberling, 2000; Sundstrom et al., 1999).

Numerados de acordo com a época de descoberta, os *loci* dominantes carregam o prefixo DFNA (Deafness Autosomal Dominant – Surdez Autossômica Dominante), os *loci* recessivos carregam o prefixo DFNB (Deafness Neurosensory Autosomal Recessive – Surdez Sensorineural Autossômica Recessiva). Os *loci* ligados ao X anteriormente carregavam o prefixo DFN. Atualmente o prefixo DFNX (Deafness X-linked – Surdez Ligada ao Cromossomo X) passou a ser adotado, no intuito de reduzir confusão na terminologia. Mutações mitocondriais são designadas pela posição da mutação no DNA mitocondrial (Song et al., 2012; Van Camp, Smith, 2012).

Além do enorme número de genes relacionados com a surdez, há outros fatores que aumentam a complexidade da genética da audição. Tem sido observado que, num mesmo gene, mutações estão associadas a diferentes padrões de herança. Por exemplo, há mutações diferentes que ocorrem no mesmo gene e que se comportam como dominantes ou recessivas (por exemplo, nos genes *GJB2*, *GJB6*, *MYO6*, *MYO7A*, *TECTA*, *TMC1*). Ainda, estudos moleculares também têm demonstrado que diferentes mutações no mesmo gene podem causar surdez-sindrômica e não-sindrômica (nos genes *CDH23*, *COL11A2*, *DDP1*, *DSPP*, *GJB2*, *GJB3*, *GJB6*, *MYO7A*, *MYH9*, *PCDH15*, *POU3F4*, ***SLC26A4***, *USH1C*, *WES1*).

### **1.5.1 Surdez de Herança Mitocondrial**

Algumas mutações específicas do DNA mitocondrial têm sido consideradas causas importantes de deficiência auditiva. Contribuem com pelo menos 1% dos casos de surdez não síndrômica ou síndrômica (Zelante et al., 1997) e alcançaram a proporção de 2% dos casos em uma amostra da população brasileira (Abreu-Silva et al., 2006). A mitocôndria humana contém sua própria molécula de DNA (DNAm) responsável pela codificação de 37 genes, os quais estão envolvidos no complexo processo de fosforilação oxidativa e produção de ATP ou na própria síntese protéica mitocondrial. Em relação à surdez hereditária não-síndrômica de herança mitocondrial, existem dois genes principais: o gene *MTRNR1*, que codifica a subunidade 12S do RNAr, e o *MTTS1*, que codifica o RNAt<sup>Ser(UCN)</sup> (Kokotas et al., 2007). A primeira mutação associada à perda auditiva não-síndrômica foi a A1555G do gene da subunidade 12S RNAr, descrita pela primeira vez em uma grande família árabe-israelense (Prezant et al., 1993). Juntamente com a mutação c.35delG do gene *GJB2*, é uma das mutações mais frequentes que causam perda auditiva. Algumas mutações mitocondriais, como a A1555G, têm sido identificadas em diferentes populações e podem estar associadas à surdez secundária ao uso de antibióticos aminoglicosídeos (Abreu-Silva et al., 2006; Estivill et al., 1998; Kokotas et al., 2007).

### **1.5.2 Surdez de Herança Ligada ao Cromossomo X**

Apenas 2 a 3% dos casos de surdez apresentam herança ligada ao cromossomo X, geralmente recessiva. A perda auditiva pode ser caracterizada como: congênita, sensorineural progressiva, em altas frequências, mas pode ocorrer perda auditiva mista. De acordo com a mudança do prefixo de DFN para DFNX, os quatro *loci* existentes DFN2, DFN3, DFN4 e DFN6 passam a ser conhecidos como DFNX1, DFNX2, DFNX3 e DFNX4, e um novo *locus*, DFNX5, antes conhecido como AUNX (*locus* de neuropatia auditiva ligada ao X), passa a ser categorizado como um *locus* de surdez não síndrômica ligado ao X, assim como os anteriores. O antigo *locus* DFN1 foi reclassificado como uma forma de surdez síndrômica ligada ao X, atualmente conhecida como síndrome de Mohr-Tranebjaerg (Song et al., 2012).



### **1.5.3 Surdez de Herança Autossômica Dominante**

O padrão de herança autossômica dominante responde por cerca de 15% dos casos de surdez. Quase todos os genes relacionados à herança autossômica dominante determinam fenótipo de perda auditiva pós-lingual e progressiva, além de geralmente determinar comprometimento sensorineural. As perdas de herança dominante manifestam-se, geralmente, na segunda ou terceira década de vida, permitindo o desenvolvimento normal da linguagem (Petit, 1996; Van Camp, Smith, 2012; Van Laer et al., 1999).

Até o momento, não se observou um gene que esteja mais frequentemente associado à surdez com esse tipo de herança à maneira como ocorre com o gene *GJB2* em relação à herança autossômica recessiva (Van Camp, Smith, 2012).

### **1.5.4 Surdez de Herança Autossômica Recessiva**

Dentre os casos de surdez não sindrômica hereditária, o padrão de herança autossômico recessivo é o mais frequentemente encontrado (75% a 80% dos casos genéticos). Em sua maioria, as perdas auditivas de herança autossômica recessiva são neurosensoriais, pré-linguais, estacionárias, comprometendo todas as frequências. Cerca de 50% dos casos de surdez não sindrômica autossômica recessiva são devidos a mutações no locus *DFNB1*, no gene *GJB2*, que codifica a conexina 26 (Cx26) (Smith et al, 2012).

Já foram descritas 111 mutações diferentes no gene *GJB2* da Cx26. Mutações como c.35delG, c.235delC e c.167delT são as que predominam nas populações européia, japonesa e judaica Ashkenazi, respectivamente (Ballana et al., 2012).

O gene vizinho ao *GJB2* é o *GJB6*, o qual codifica a Conexina 30. Eles estão localizados na mesma região cromossômica, no locus *DFNB1*, distanciando-se um do outro por cerca de 35kb e codificando proteínas que apresentam 77% de identidade de sequência (Dahl et al., 1996). Grandes deleções como a del(*GJB6*-D13S130) (del Castillo et al., 2002) e a del(*GJB6*-D13S1854) (del Castillo et al., 2005) são encontradas em associação com mutações no gene *GJB2*, levando à deficiência auditiva. Portanto, a presença de duas mutações em genes diferentes levou à hipótese de que a surdez de herança autossômica recessiva pode estar associada a uma mutação em um segmento

regulatório ou em uma região de controle de *loci* regulando a co-expressão desses dois genes, *GJB2* e *GJB6* (Common et al., 2005; Wilch et al., 2006; Wilch et al., 2010).

Outros *loci* como DFNB4 (gene *SLC26A4* ou *PDS*), DFNB9 (gene *OTOF*), DFNB12 (gene *CDH23*), DFNB7/11 (gene *TMC1*), seguidos do DFNB 8/10 (gene *TMPRSS3*) e DFNB3 (gene *MYO15A*) também parecem ter contribuição significativa como causa de surdez pré-lingual recessiva.

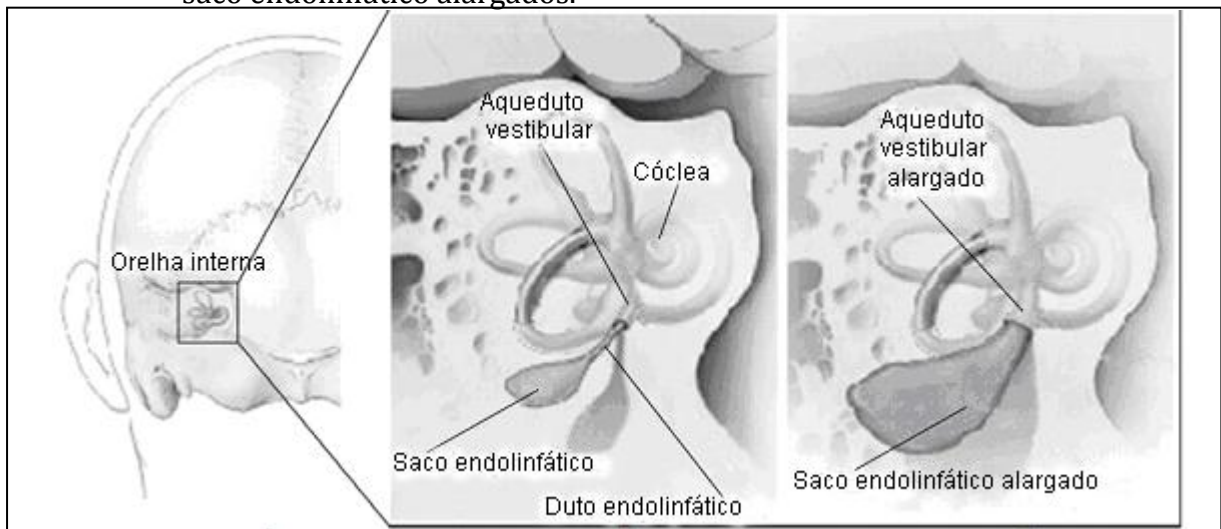
A cada dia que passa, novos genes relacionados à deficiência auditiva são descobertos na tentativa de aprimorar estratégias de triagem e de diagnóstico de casos de surdez desconhecida, contribuindo, assim, para o processo de aconselhamento genético.

### **1.6 O gene *SLC26A4/PSD* (pendrina)**

Mais de 200 mutações diferentes no gene *SLC26A4* estão relacionadas a dois distúrbios de herança autossômica recessiva, a síndrome de Pendred (SP) e uma forma de deficiência auditiva não sindrômica (DFNB4) que pode ou não estar associada com malformação da orelha interna (Guo et al., 2010). Dentre essas mutações, a maioria foi vista apenas em uma única família (Cama et al., 2009; Campbell et al., 2001).

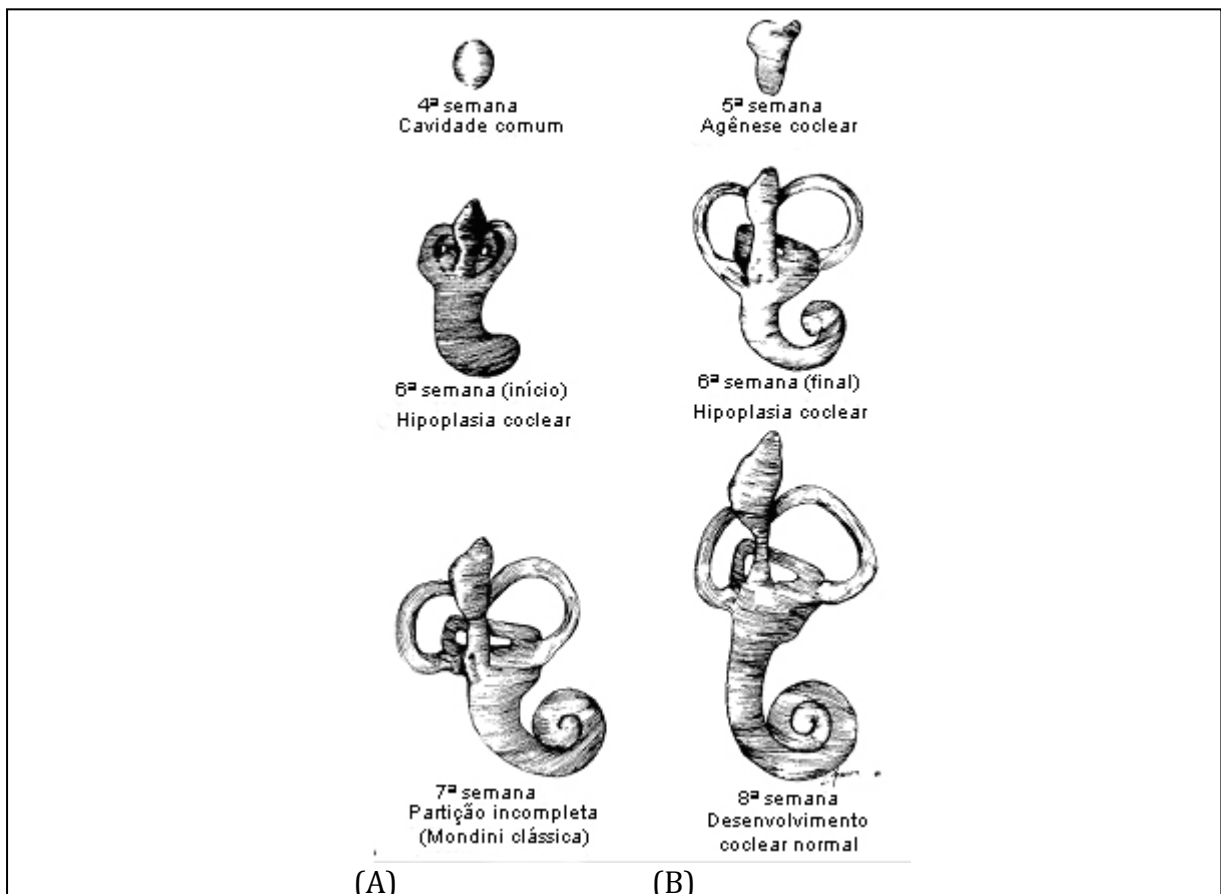
A síndrome de Pendred é caracterizada por perda auditiva sensorineural congênita e bócio, que normalmente se desenvolve na segunda década de vida e é associado com hipotireoidismo em 44% dos casos (Reardon et al., 1999). Pacientes com síndrome de Pendred ou com surdez não sindrômica ligada ao DFNB4, além de apresentarem mutações no gene *PDS/SLC26A4*, têm em comum características similares quanto à surdez: bilateral, pré-lingual ou pós-lingual, frequentemente grave ou profunda com evolução variável e que pode estar associada a anomalias da orelha interna, como dilatação do aqueduto vestibular e displasia de Mondini (Cross et al., 1999; Phelps et al., 1998). Como o próprio nome diz, o aqueduto vestibular alargado é a dilatação anormal da porção do aqueduto vestibular (figura 6). A displasia de Mondini é caracterizada por um giro basal normal, mas um decréscimo do número dos giros superiores, ou seja, partição incompleta dos giros superiores, representada na figura 7 (Romo et al., 2003).

Figura 6 - Esquema representando a anatomia normal da região cócleo-vestibular comparada com a anatomia alterada na presença de aqueduto vestibular e saco endolímfático alargados.



Fonte: Modificada de Vestibular Disorders Association (Veda's Staff, 2012)

Figura 7 - Representação esquemática mostrando as fases do desenvolvimento da cóclea.



(A) Displasia de Mondini clássica. (B) Cóclea normalmente desenvolvida.

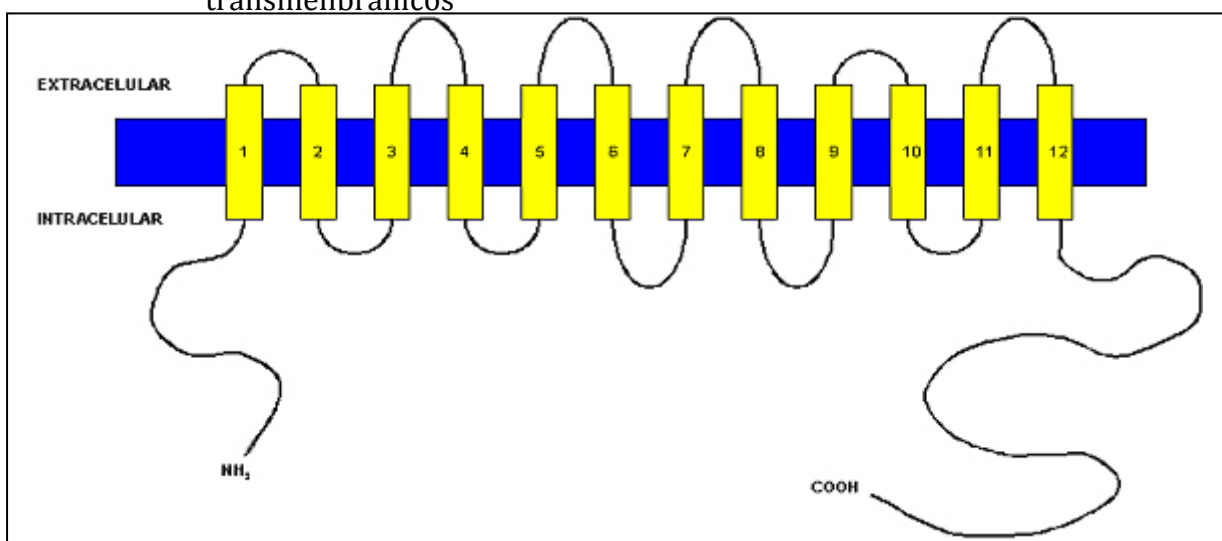
Fonte: Modificada de Romo et al. (2003).

Apesar da descrição clássica da síndrome de Pendred incluir o bócio como característica importante ao diagnóstico, estudos de grandes famílias com síndrome de Pendred revelam que esse sinal, ou outras alterações da tireóide não ocorrem em todos os afetados. De fato, estudo com grandes famílias com muitos afetados revelaram que o bócio está presente em cerca de metade dos pacientes enquanto que o aqueduto vestibular alargado ocorreu em todos os afetados que foram submetidos a exames de imagem (TC) (Masmoudi et al., 2000). Portanto, o aqueduto vestibular alargado parece ser manifestação mais frequente do que as manifestações relacionadas à tireóide. Além disso, Reardon et al. (2000) destacam que a inconsistência na presença do bócio dificulta muito o diagnóstico clínico da síndrome nos casos isolados, em que somente estão presentes o aqueduto vestibular alargado ou alterações da cóclea.

O gene *SLC26A4* contém 21 exons, sendo 20 deles codificadores (exon 2 ao exon 21). Localizado no braço longo do cromossomo 7, esse gene codifica a pendrina, uma proteína expressa em vários tecidos, incluindo principalmente orelha interna, tireóide e rins.

A pendrina é um permutador transmembrânico aniônico, pertencente à família 26 de transportadores de solutos, com a previsão de ser composta por 12 domínios transmembrânicos (figura 8). Esses transportadores realizam trocas de cloreto, iodeto, bicarbonato e formato (Everett et al., 1997).

Figura 8 - Representação esquemática da proteína pendrina com 12 domínios transmembrânicos



Fonte: Modificada de Chang et al. (2012)

A maioria dos genes que codificam transportadores epiteliais ou canais de troca de íons na orelha interna são similarmente expressos em epitélio tubular renal. Conseqüentemente, ambos os epitélios são similarmente sensíveis à intervenção farmacológica. Mutações patogênicas em tais genes, como o gene *SLC26A4/PDS*, podem levar simultaneamente ao quadro clínico de surdez e aos possíveis danos no transporte tubular renal (Lang et al., 2007).

Estudos realizados com camundongos *PDS-knockout* vêm demonstrando a importância desse gene, uma vez que os resultados são animais com orelhas internas aparentemente desenvolvidas normalmente até o 15º dia da fase embrionária, e após este período, ocorre grave dilatação endolinfática. Além deles serem surdos, apresentam sinais de disfunção vestibular (Everett et al., 2001).

Choi et al. (2011), por meio de estudo com camundongos transgênicos binários, cuja expressão do gene *SLC26A4* podia ser induzida com doxiciclina demonstrou que a pendrina é necessária durante um período crucial e limitado do desenvolvimento da orelha interna para audição normal. Este período crítico corresponde ao estágio durante o qual a cóclea cresce rapidamente e reflete em uma maior sensibilidade da orelha interna a alterações no pH endolinfático ou da homeostasia iônica nesse momento.

Esses estudos apontam o papel da pendrina na manutenção do equilíbrio ácido-base na orelha interna, pois a endolinfa apresenta baixo valor do pH, alta concentração de  $Ca^{2+}$  e perda completa do potencial endococlear em camundongos *slc26a4*<sup>-/-</sup>, quando comparada com camundongos selvagens e camundongos heterozigotos. No entanto, a relação entre a função da pendrina e a composição iônica da endolinfa permanece indefinida (Rozenfeld et al., 2011).

Estudos funcionais também têm mostrado que diferentes mutações na sequência do gene *SLC26A4* acarretam efeitos diferentes na atividade transportadora da pendrina. Além disso, desde quando essa proteína foi descrita na literatura até agora, ainda há controvérsias quanto ao seu número de domínios transmembrânicos. O efeito variável de cada mutação na função, expressão e localização da pendrina pode explicar parcialmente a heterogeneidade clínica observada entre os indivíduos afetados (Dror et al., 2011). Com o passar dos anos, uma longa lista de mutações no gene *SLC26A4* relacionadas à perda auditiva humana foi publicada na literatura (Chang et al., 2012), mas não foi atualizada desde 2007. Uma revisão atualizada do período de 2007 a 2012

contendo a lista de mutações descritas, baseada na Pendred/BOR homepage (Chang et al., 2012), está apresentada na tabela 1.

Apesar do esforço de grupos de pesquisa do mundo todo em predizer o quadro clínico de todas as mutações distribuídas na sequência do gene *SLC26A4*, ainda não se tem definida uma correlação genótipo-fenótipo. A estrutura complexa da pendrina como uma proteína transmembrânica limita a capacidade de se prever fielmente o efeito de uma única mutação. No futuro, com a estrutura cristalina da pendrina definida talvez seja possível associar um genótipo específico à gravidade do fenótipo (Dror et al., 2011).

Inúmeros estudos com relação à identificação de mutações no gene *SLC26A4* foram e vêm sendo realizados nas mais variadas populações.

Em uma triagem realizada em 20 indivíduos não aparentados, do centro-oeste dos Estados Unidos, com surdez não síndrômica e dilatação do aqueduto vestibular, foram identificadas três pessoas (15%) com mutações no gene da pendrina (Scott et al., 2000).

Tsukamoto et al. (2003) averiguaram 42 famílias japonesas, 10 famílias com SP e 32 famílias com surdez não síndrômica associada à dilatação do aqueduto vestibular. O grupo de Tsukamoto concluiu que mutações no gene *PDS* estão presentes e são significativamente responsáveis pelo quadro clínico em 90% das famílias com SP e em 78,1% das famílias com surdez não síndrômica associada com dilatação do aqueduto vestibular. O espectro de mutações no gene *PDS* em japoneses inclui novas mutações diferentes das encontradas em estudos em caucasianos. Dentre as novas mutações detectadas nesse estudo, 53% delas correspondem à mutação p.H723R, o que sugere um possível efeito do fundador. Portanto, a origem geográfica do paciente é importante e deve ser levada em consideração quando se aplicam testes genéticos.

Albert et al. (2006) realizaram um estudo com 109 pacientes de 100 famílias não aparentadas, que apresentavam surdez não síndrômica de herança autossômica recessiva e dilatação do aqueduto vestibular. Esses indivíduos foram analisados em relação ao gene da pendrina por meio de triagem molecular com dHPLC e sequenciamento. Foram detectados 91 alelos variantes possivelmente patogênicos nas 100 famílias, sendo que 19 deles nunca haviam sido descritos. A frequência de mutações no gene *SLC26A4* foi de 40% nas famílias do estudo, com mutações bialélicas detectadas em 24%. A incidência de mutações no gene *SLC26A4* é considerada alta em pacientes com surdez e dilatação do aqueduto vestibular e essas mutações podem representar

mais de 4% dos casos de deficiência auditiva não síndrômica. Portanto, nessa população caucasiana, o *SLC26A4* pode ser considerado o segundo gene mais frequente relacionado à surdez não síndrômica, perdendo apenas para o *GJB2*.

De acordo com a revisão de Smith et al. (2012), os únicos dois genes conhecidos por estarem associados com a Síndrome de Pendred/DFNB4 são *SLC26A4* (aproximadamente 50% dos indivíduos afetados) e *FOXI1* (aproximadamente 1% dos indivíduos afetados), sugerindo heterogeneidade genética.

Yang et al. (2007) identificaram e caracterizaram um elemento em “cis”, no promotor do gene *SLC26A4* que se liga ao produto do gene *FOXI1*, um ativador transcricional do gene *SLC26A4*. A casuística do trabalho contou com 429 probandos com diagnóstico clínico de SP ou surdez não síndrômica associada com aqueduto vestibular alargado, com ou sem displasia coclear. A triagem de mutações no promotor do gene *SLC26A4* e na região de código do gene *FOXI1* foi completa em todos os pacientes com somente uma ou nenhuma mutação no gene *SLC26A4*. Em 9 pacientes com SP ou surdez não síndrômica associada ao aqueduto vestibular alargado, uma mutação nova, c.-103T>C, foi detectada nesse elemento regulatório do *SLC26A4* e que interfere na ligação com o *FOXI1*, abolindo completamente a ativação transcricional mediada por *FOXI1*. Eles também identificaram 6 pacientes com mutações monoalélicas no *FOXI1* que comprometem a sua capacidade de ativar a transcrição do *SLC26A4*. Em uma das famílias estudadas, o fenótipo de aqueduto vestibular alargado ocorreu em um indivíduo duplo-heterozigoto, o qual carregava mutações monoalélicas em ambos os genes, *SLC26A4* e *FOXI1*. O resultado desse estudo sugere herança digênica para explicar o fenótipo de aqueduto vestibular alargado.

Em 2007, Lai et al. estudaram 7 pacientes chineses não aparentados, os quais apresentavam SP, e identificaram em 6 deles mutações bialélicas no gene *SLC26A4*, incluindo uma mutação do tipo *missense* nova, c.1079C>T.

Lee et al. (2008) sequenciaram o gene da pendrina em 7 pacientes coreanos com malformações na orelha interna, incluindo aqueduto vestibular alargado, com perda auditiva de severa a profunda. Eles observaram em 4 dos 7 pacientes mutações bialélicas no gene. Foram encontradas duas variantes patogênicas já descritas e uma mutação nova foi encontrada, a p.Q421P.

O estudo de Pera et al. (2008b) caracterizou 105 pacientes espanhóis de 47 famílias não aparentadas com SP ou surdez não síndrômica associada com aqueduto

vestibular alargado e 20 famílias com perda auditiva não sindrômica autossômica recessiva, nas quais marcadores *STRs* segregaram com o *locus* DFNB4. Em 18 famílias, o quadro clínico pode ser explicado por mutações bialélicas no gene da pendrina, enquanto que um único alelo mutado foi encontrado em um paciente com perda unilateral e aqueduto vestibular alargado na mesma orelha. No total foram identificadas 24 mutações, incluindo 8 mutações novas (c.262G>A, c.419C>A, c.1238A>C, c.1271G>A, c.1454C>G, c.1541C>A, c.1238delA e c.1001+5G>T). Esse mesmo grupo de pesquisadores também caracterizou uma nova deleção multi-exônica de 14kb abrangendo desde o íntron 3 até o íntron 6 (g.8091T\_22145Cdel). Das 20 famílias, nas quais os marcadores segregam com o *locus* DFNB4, em 4 delas foram encontradas as mutações no gene *SLC26A4*, c.419C>A (p.P140H), c.1468G>A (p.G497S), c.1541C>A (p.Q514K), c.412G>T (p.V138F), c.1001+1G>A (IVS8+1G>A) em homozigose, c.920C>T (p.T307M) e c.1238delA (p.Q413X), as quais são as prováveis causas do quadro clínico de surdez dessas famílias.

No estudo realizado por Yuan et al. (2009), um total de 227 crianças não aparentadas com perda auditiva sensorio-neural bilateral de moderada a profunda, sem causa genética molecularmente diagnosticada, foram triadas em relação ao gene *SLC26A4*. Foram identificados 28 pacientes com duas mutações patogênicas confirmadas e um heterozigoto composto para duas variantes não descritas, p.Y235C e p.R470H, as quais muito provavelmente são patogênicas. Em 21 pacientes foi encontrado apenas um alelo mutante no gene *SLC26A4* e em dois pacientes foram identificadas novas variantes *missense*, p.I491T e p.L597S, as quais são provavelmente patogênicas. Portanto, nesse estudo foi encontrado um total de 7 mutações patogênicas diferentes (IVS7-2A>G, p.E37X, p.K77I, p.S391R, p.N392Y, p.T410M e p.H723R) e 5 novas prováveis variantes patogênicas (p.Y375C, p.R470H, p.I491T, p.L597S e p.H723D).

Yang et al., em 2009, realizaram um estudo com 89 pacientes com diagnóstico clínico de surdez associado a EVA/síndrome de Pendred e que são portadores de um único alelo mutado na região de código do gene *SLC26A4*. As amostras desses 89 pacientes selecionados foram submetidas à triagem em busca de mutações no gene *KCNJ10* (canal de K<sup>+</sup>), que juntamente com a mutação no gene *SLC26A4*, explicassem o quadro clínico apresentado pelos pacientes. Tanto mutações na região promotora do gene *SLC26A4* quanto deleções nesse gene foram previamente excluídas nessa casuística. O grupo de Yang identificou dois duplo-heterozigotos com mutações



provavelmente patogênicas nos genes *SLC26A4* e *KCNJ10*. Um dos duplo-heterozigotos *SLC26A4/KCNJ10* apresenta as mutações c.1003T>C (p.F335L)/c.581C>A (p.P194H) e o outro, c.919-2A>G/c.1042C>T (p.R348C). O resultado desse estudo indica que pode ocorrer uma interação patogênica entre mutações nos genes *SLC26A4* e *KCNJ10*, o que sugere que a herança digênica possa estar associada com disfunções na orelha interna.

Wu et al. (2010) triaram regiões codificadoras e promotoras dos genes *SLC26A4* e *FOXI1* (fator de transcrição do gene da pendrina) em 101 famílias da Ilha Formosa, cujos probandos apresentavam aqueduto vestibular alargado bilateralmente. Foi identificado um total de 17 alelos variantes nas regiões codificadoras do gene *SLC26A4*, incluindo 11 variantes *missense*, duas variantes *nonsense*, uma variante *frameshift* e três variantes de sítio de *splicing*. Dos 101 probandos, 63 tinham dois alelos mutados (62%), 24 tinham um alelo mutado (24%) e 14 não tinham alelo mutado no gene *SLC26A4*. Em relação aos promotores do gene *SLC26A4* e ao *FOXI1*, os resultados mostraram dois polimorfismos comuns, c.-964A>C no promotor do gene *SLC26A4* e c.-279G>A no promotor do gene *FOXI1*, confirmados por comparação das frequências alélicas entre os probandos e os controles normais. Uma variante incomum no promotor do gene *SLC26A4* (c.-2554G>A) foi identificada em uma das famílias, herdada em *trans* com outra mutação no *SLC26A4*, a p.G497R, mas não foi possível comprovar sua patogenicidade. Portanto, apesar da estratégia extensiva de triagem de mutação no *SLC26A4* e regiões genômicas relacionadas, a causa da patologia continua indeterminada em muitas das famílias com surdez não-sindrômica associada ao aqueduto vestibular alargado ou SP.

Pourová et al. (2010) selecionaram para pesquisa 303 pacientes tchecos não aparentados com perda auditiva precoce: 298 com surdez não sindrômica associada ou não com aqueduto vestibular alargado e/ou displasia de Mondini (27 casos familiares e 271 casos isolados) e 5 com SP. Foram encontrados 26 pacientes com pelo menos uma mutação patogênica no gene *SLC26A4*, 8 com mutações bialélicas e 18 com mutação monoalélica. Foram detectadas 21 mutações diferentes, sendo que 4 delas nunca foram descritas (c.841G>A em um paciente com mutações bialélicas; c.431T>C, c.554G>C e c.1554G>A em pacientes com mutações monoalélicas). Nos 18 casos com apenas uma mutação detectada a técnica de MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*) foi empregada na tentativa de buscar a segunda mutação, mas não foram encontradas deleções nem duplicações no gene *SLC26A4*.

O estudo de Duman et al. (2011) incluiu 49 famílias turcas não aparentadas com no mínimo três crianças afetadas nascidas de casamentos consanguíneos, apresentando quadro de surdez não- síndrômica. Foram identificadas 22 mutações diferentes, em homozigose, em 11 genes diferentes, sendo que em apenas uma das famílias foi detectada uma nova mutação patogênica no gene *SLC26A4*, a c.1198delT (p.C400VfsX32).

Wang et al. (2011) realizaram triagem dos genes mais comuns que causam surdez (*GJB2*, *SLC26A4* e *MT-RNR1*) em 14.913 recém-nascidos de 11 províncias da China. Com relação à triagem do gene da pendrina, foram detectados um heterozigoto composto para *SLC26A4/SLC26A4* (c.919-2A>G/c.2168A>G), um duplo-heterozigoto para *SLC26A4/GJB2* (c.919-2A>G/c.235delC) e 120 heterozigotos para mutações em *SLC26A4*. Desses 122 portadores de mutação em heterozigose no gene *SLC26A4* (incluindo o duplo-heterozigoto), 15 apresentavam surdez.

No estudo de Zhao et al. (2012) foram selecionados pacientes diagnosticados com aqueduto vestibular alargado acompanhado de surdez não síndrômica. Dentre esses pacientes, 68 apresentavam um alelo mutado para o gene *SLC26A4* e 39 não apresentavam mutações detectáveis nesse gene. As amostras desses 107 pacientes foram triadas quanto a variações no número de cópias por meio da técnica de MLPA. Os resultados sugeriram que variações no número de cópias no gene *SLC26A4* não são fatores significativos que poderiam explicar casos de aqueduto vestibular alargado não síndrômico. Entretanto, o grupo de Zhao considerou prematuro concluir que variações no número de cópias não contribuem de alguma forma no quadro de aqueduto vestibular alargado.

No Brasil, de Moraes et al. (2013) realizaram um estudo com 23 pacientes não aparentados com surdez não síndrômica com aqueduto vestibular alargado. Foram encontradas 13 variações diferentes no gene da pendrina em 9 dos 23 casos estudados, sendo 11 já descritas (10 provavelmente patogênicas e uma com patogenicidade até o momento indefinida) e duas novas mutações possivelmente patogênicas na região de código (p.G149R e p.P142L).

No gene da pendrina, três mutações c.707T>C (p.L236P), c.1246A>C (p.T416P) e c.1001+1G>A (IVS8+1G>A) aparentemente são mais frequentes do que as outras nas populações de descendentes de europeus do norte e representam 50% dos alelos da

doença de Pendred em indivíduos com diagnóstico confirmado para síndrome com essa origem geográfica (revisão de Smith, Van Camp, 2012).

De acordo com a literatura citada acima e outros estudos (Choi et al., 2009; Jonard et al., 2010; Kahrizi et al., 2009; Kim et al., 2009; Mahdieh et al., 2010; Pryor et al., 2005; Reyes et al., 2009), a diversidade de mutações distintas no gene da pendrina, tal como a variação de frequência relativa de cada uma delas nos mais variados grupos estudados, chama atenção para a importância da triagem desse gene nas diferentes populações e destaca o fato de que em muitos dos pacientes submetidos à triagem de mutações no gene *SLC26A4* são identificadas mutações monoalélicas. A partir desse fato, até o momento, há duas hipóteses principais para explicar o grande número de indivíduos com apenas uma mutação identificada no gene da pendrina: de acordo com a primeira delas, a segunda mutação nesses pacientes estaria em outros genes como o *FOXI1* e o *KCNJ10*; e na segunda hipótese, a segunda mutação seria do tipo variações no número de cópias. Essas variações não são passíveis de caracterização por técnica de sequenciamento convencional, mas são detectáveis por MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*), como foi aplicado nos estudos de Pourová et al. (2010) e Zhao et al. (2012). Esses trabalhos são os únicos que incorporaram esta técnica com o objetivo de verificar se variações no número de cópias explicariam em parte o mecanismo de patogenicidade nos casos com mutações monoalélicas.

Tabela 1 - Lista de mutações já descritas no gene *SLC26A4* - modificada e atualizada da Pendred/Bor homepage (Chang et al., 2012).

(continua)

	Alteração nucleotídica	Alteração do aminoácido	Nº de famílias	Região gênica	Domínio da proteína	Referência
	-23177_164+1027del24368ins7		1	exon 1-2		Anwar et al., 2009
1	1-32G>A			intron 1		Pera et al., 2008b
2	3'-2A>G	SS	3	intron 1		Pendred /Bor homepage
3	2T>C	M1T	2	2	NH2	Pendred /Bor homepage
4	3G>C	M1I	1	2	NH2	Banghova et al., 2008
	17G>T	G6V	1	2	NH2	Hochman et al., 2010
		S8X				Jiang et al., 2010
5	28C>A	P10T	1	2	NH2	Pendred /Bor homepage
6		S23X	1			Pendred /Bor homepage
7	70C>G	R24G	1	2	NH2	Pendred /Bor homepage
	71G>T	R24L	2	2	NH2	Anwar et al., 2009
8	84C>A	S28R	3	2	NH2	Pendred /Bor homepage
9	85G>C	E29Q	4	2	NH2	Pendred /Bor homepage
	87G>T	E29D	1	2	NH2	Cirello et al., 2012
10	109G>T	E37X	1	2	NH2	Wang et al., 2007
11	127C>A	R43S	1	2	NH2	Pendred /Bor homepage
12	129insC		1	2	NH2	Pendred /Bor homepage
13	149T>G	L50R	1	2	NH2	Pendred /Bor homepage
14	165-32A>G			intron 2		Pera et al., 2008b
15	165-13T>G	SS	1	intron 2		Choi et al., 2009
16	165-1G>A (IVS2-1G>A)	SS	3	intron 2		Pendred /Bor homepage
17	IVS2_IVS3 del 4kB		1			Pendred /Bor homepage
18	170C>A	S57X	1	3	NH2	Pendred /Bor homepage
19		T67S		3	NH2	Snabbon et al., 2007
20	200C>G	T67S	1	3	NH2	Dai et al., 2008
21	203T>C	L68P	1	3	NH2	Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
	218delA	E73fs96X	1	3	NH2	Huang et al., 2011
22	225C>G	L75L		3	NH2	Pera et al., 2008b
23	227C>T	P76L	1	3	NH2	Wang et al., 2007
24	230A>T	K77I		3	NH2	Pendred /Bor homepage
25	232T>C	Y78H	1	3	NH2	Guo et al., 2010
26	233A>G	Y78C	3	3	NH2	Pendred /Bor homepage
27	235C>T	R79X				Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
28		R79X		3		Kahrizi et al., 2009
29		D87Y		3		Zhao et al., 2009
30	262G>A (PNP)	V88I	1	3	1	Pera et al., 2008a
31		S90L	5	3		Pendred /Bor homepage
32	281C>T	T94I	1	3		Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
33	281C>T	T94I	2	3	1	Wang et al., 2007
34	279delT	X96	1	3	1	Pendred /Bor homepage
	304+2T>C	SS	1	intron 3		Anwar et al., 2009
	305-2A>G	SS		intron 3		Chen et al., 2011

Tabela 1 - Lista de mutações já descritas no gene *SLC26A4* - modificada e atualizada da Pendred/Bor homepage (Chang et al., 2012).

(continuação)

	Alteração nucleotídica	Alteração do aminoácido	Nº de famílias	Região gênica	Domínio da proteína	Referência
35	311C>T	A104V	1	4	1	Pendred /Bor homepage
36	314A>G	Y105C	1	4	1	Pendred /Bor homepage
37	317C>A	A106D	1	4	1	Pendred /Bor homepage
38	322delC		1			Pendred /Bor homepage
39	334C>T	P112S	1	4	alça EC 1	Wang et al., 2007
40	338delT		2	4		Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
41	347G>T	G116V	1	4		Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
42	349 C>T	L117F	1	4	2	Pendred /Bor homepage
43	349delC	X125	1	4	2	Wang et al., 2007
44	365insT	X131	3	4		Pendred /Bor homepage
45		P123S	1	4		Pendred /Bor homepage
46	387delC	X144	1	4	2	Wang et al., 2007
47	395C>T	T132I	1	4	alça IC1	Pendred /Bor homepage
48	398T>A	S133T	2	4	alça IC 1	Pendred /Bor homepage
49		S133X	1	4	alça IC 1	Pendred /Bor homepage
50	401G>T	R134I	1			Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
51	404A>G	H135R	1	4	alça IC 1	Reyes et al., 2009
52	406delTCTCA	FS135 (X178)	1		alça EC 2	Pendred /Bor homepage
53		S137P	1			Pendred /Bor homepage
54	412G>T	V138F	12	4	3	Pendred /Bor homepage
55		V138X	1	4	3	Pendred /Bor homepage
56	25bp del + 5 bp ins	V138X	1	4	3	Pendred /Bor homepage
57	412G>C	V138L	3	4	3	Choi et al., 2009
	413T>A	V138D	1	4	3	Chen et al., 2012
	414delT	V138fs144	1	4	3	Huang et al., 2011
58	415+4A>G	X141	1	intron 4		Pendred /Bor homepage
59	415+7 A>G (IVS4+7A>G)	X141	1	intron 4	3	Pendred /Bor homepage
60	416-1G>A (IVS4-1G>A)	SS		intron 4	3	Snabbon et al., 2007; Palos et al., 2008
61	416G>C	G139A	2	5	3	Pendred /Bor homepage
	416G>T	G139V	1	5	3	Anwar et al., 2009
62	419C>A	P140H	1	5	3	Pera et al., 2008a
	427G>C	V143L		5	3	Chen et al., 2011
63	429delA		1			Pendred /Bor homepage
64		P142R	1			Pendred /Bor homepage
65	431T>C	V144A	1	5		Pourová et al., 2010
66	439A>G	M147V	3	5	3	Pendred /Bor homepage
	440T>C	M147T	1	5	3	Rebeh et al., 2010
67	441G>A	M147I	1	5	3	Jonard et al., 2010
	463A>G	M155V		5		Chen et al., 2011
68		S166N	1			Pendred /Bor homepage
69	336-377insT	X180	1	4	alça EC 2	Pendred /Bor homepage

Tabela 1 - Lista de mutações já descritas no gene *SLC26A4* - modificada e atualizada da Pendred/Bor homepage (Chang et al., 2012).

(continuação)

	Alteração nucleotídica	Alteração do aminoácido	Nº de famílias	Região gênica	Domínio da proteína	Referência
70	IVS4-IVS6del1.8kb		2	intron 4		Pendred /Bor homepage
71	530A>G	D177G	1	5		Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
72	554G>C	R185T	1	5		Pourová et al., 2010
73	565G>T	A189S	1	5	4	Pendred /Bor homepage
74	578C>T	T193I	2	5	4	Pendred /Bor homepage; Palos et al., 2008
75	589G>A	G197R	1	5	4	Wang et al., 2007
	496delA	S166fs171X	1	5	4	Huang et al., 2011
76	IVS5+1G>T	SS	1	intron 5	4	Ito et al., 2010
77	601-17C>T (IVS5-17C>T)			intron 5		Pera et al., 2008b
78	IVS5-1G>A		1	intron 5		Pendred /Bor homepage
79	611G>T	G204V	1	6	4	Wang et al., 2007
80	626G>T	G209V	10	6	alça IC 2	Pendred /Bor homepage
81	659T>C	V220A	1	6		Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
		A227P		6		Jiang et al., 2010
	694G>A	V231M	1	6		Anwar et al., 2009
82	697G>C	V233L	1	6		Pendred /Bor homepage
83	706C>G	L236V	1	6		Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
84	707T>C	L236P	29	6	alça EC 3	Pendred /Bor homepage
85	716T>A	V239D	4			Pendred /Bor homepage
86	749T>C	V250A	1	6		Dai et al., 2009
87	754T>C	S252P	1			Pendred /Bor homepage
88	753-756delCTCT	X286	1	6	alça IC 3	Pendred /Bor homepage
89	757A>G	I253V	1	6	alça IC 3	Dai et al., 2008; Yuan et al., 2012
90	766-2 A>G (IVS6-2A>G)	SS	38	intron 6		Pendred /Bor homepage
91	783_784insT	X286	2	7	alça IC 3	Pendred /Bor homepage
92	796G>A	D266N	1	7		Dai et al., 2009
93	811G>C	D271H	2	7	6	Pendred /Bor homepage
94	812A>G	D271G	1	7	6	Wang et al., 2007
95	841G>A	V281I	1	7		Pourová et al., 2010
96	845G>A	C282Y	1	7		Pendred /Bor homepage
97	872G>A	R291Q	1	7		Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
98	886A>G	I296V	1	7		Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
99	890delC	302X				Pendred /Bor homepage
100	898A>C	I300L	1	7		Pendred /Bor homepage
101	907G>C	E303Q	1	7		Dai et al., 2009
102	916-917insG/916insG	X329	3	7		Wang et al., 2007; Dai et al., 2009
103	917delT	X308	1	7	7	Pendred /Bor homepage
104	918+1 G>A (IVS 7+1G>A)	SS	1	intron 7		Pendred /Bor homepage
105	919-2A>G (IVS7-2 A>G)	SS	2	intron 7		Pendred /Bor homepage
106	941C>A	S314X	1	8	7	Cama et al., 2009

Tabela 1 - Lista de mutações já descritas no gene *SLC26A4* - modificada e atualizada da Pendred/Bor homepage (Chang et al., 2012).

(continuação)

	Alteração nucleotídica	Alteração do aminoácido	Nº de famílias	Região gênica	Domínio da proteína	Referência
107	946G>T	G316X	2	8	7	Wang et al., 2007; Dai et al., 2009
108	964A>G	N322D	1	8		Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
109	965insA			8		Kahrizi et al., 2009
110	970 A>T	N324T	1	8		Pendred /Bor homepage
111		N324Y	1	8		Rodrigues-Paris et al., 2010
112	1001G>T	G334V	1	8		Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
113		G334V		8	alça EC 4	Kahrizi et al., 2009
114	1001+1G>A (IVS 8+1 G>A)	SS	24	intron 8		Pendred /Bor homepage
115	IVS8+4A>G	SS	1			Pendred /Bor homepage
116	IVS8+5G>C	SS	1	intron 8		Wu et al., 2008
117	1001+5G>T (IVS8+5G>T)	SS	1	intron 8	alça EC 4	Pera et al., 2008a
	1002-9A>C			intron 8	alça EC 4	Chen et al., 2011
118	1002-4C>G	SS	1			Pendred /Bor homepage
	1002-1G>T (IVS8-1G>T)	SS	1	intron 8		Lai et al., 2012
119	1003T>C	F335L	3	9	alça EC 4	Pendred /Bor homepage
120		F354S	1			Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
121	1061T>C	F354S	3	9	8	Dai et al., 2009
122		F355S	1	9		Pendred /Bor homepage
123	1079C>T	A360V	1	9	8	Lai et al., 2007
		G368X	1	9		Lai et al., 2012
124	1105A>G	K369E	1	9	alça IC 4	Pendred /Bor homepage
125	1115C>T	A372V	3	9	alça IC 4	Pendred /Bor homepage
126	1124A>G	Y375C	2	9	alça IC 4	Dai et al., 2008; Yuan et al., 2009
127	1149delC	FS383	2	9	alça IC 4	Pendred /Bor homepage
	IVS9+1G>A	SS	1			Huang et al., 2011
128	IVS9+3A>G		4	intron 9		Pendred /Bor homepage
129	IVS9-1G>A	SS		intron 9	alça IC 4	Snabbon et al., 2007
130	1151A>G	E384G	14	10	alça IC 4	Pendred /Bor homepage
131	1160C>T	A387V	2	10	9	Pendred /Bor homepage
132		S391N	1			Pendred /Bor homepage
133	1172G>A	S391N	1	10	9	de Wolf et al., 2010
134		N392Y	1	10	9	Pendred /Bor homepage
135	1175A>G	N392S	1	10	9	Wang et al., 2007
136	1181-3delTCT	S394del	1	10	9	Pendred /Bor homepage
137	1197delT	X430 (FS400)	8	10	10	Pendred /Bor homepage
138	1199insT	X467	1	10		Dai et al., 2009
139	1225C>T	R409C	1	10	alça EC 5	Wu et al., 2010
140	1226G>C	R409P	1			Pendred /Bor homepage
141	1226G>A	R409H	7	10	alça EC 5	Pendred /Bor homepage
142	1229C>T	T410M	11	10	alça EC 5	Pendred /Bor homepage
143	1229C>G	T410R		10	alça EC 5	Pendred /Bor homepage
144	1231G>C	A411P	2	10	alça EC 5	Pendred /Bor homepage

Tabela 1 - Lista de mutações já descritas no gene *SLC26A4* - modificada e atualizada da Pendred/Bor homepage (Chang et al., 2012).

(continuação)

	Alteração nucleotídica	Alteração do aminoácido	Nº de famílias	Região gênica	Domínio da proteína	Referência
145	1238A>C	Q413P	1	10	alça EC 5	Pera et al., 2008a
146	1238delA	Q413RfsX54	1	10	alça EC 5	Pera et al., 2008a
147	1246A>C	T416P	25	10	alça EC 5	Pendred /Bor homepage
148	1259C>T	T420I	1	10	alça EC 5	Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
149		T420I		10	alça EC 5	Kahrizi et al., 2009
	1261C>A	Q421K		10	alça EC 5	Chen et al., 2011
150	1262A>G	Q421R	1	10	alça EC 5	Pendred /Bor homepage
151	1262A>C	Q421P	1	10	alça EC 5	Wang et al., 2007; Lee et al., 2008
152	1264-1G>C	SS	2	intron 10	alça EC 5	Pendred /Bor homepage
153	IVS10-12T>A		1	intron 10		Pendred /Bor homepage
	1264-477_2090-4927del11202		1			Anwar et al., 2009
154	1265T>A	V422D	1	11	alça EC 5	Banghova et al., 2008
155	1271G>A	G424D	1	11	alça EC 5	Pera et al., 2008a
	1277T>A	I426N		11	alça EC 5	Chen et al., 2011
156	1284_1286delTGC	A429del	2	11	alça EC 5	Pendred /Bor homepage
157		G439R	1	11	10	Ito et al., 2010
158	1318A>T	K440X	1	11	10	Wang et al., 2007
159	1334T>G	L445W	14	11	alça IC 5	Pendred /Bor homepage
160	1334-1335insAGTC	X467	2	11	alça EC 6	Pendred /Bor homepage
161	1336C>T	Q446X	1	11	alça IC 5	Wang et al., 2007
162	1337A>G	Q446R	1	11	alça IC 5	Pendred /Bor homepage
	1340delA	K447fs454X	1	11		Huang et al., 2011
165	1341delG	X453 (FS446)	2	11	11	Pendred /Bor homepage
	1341+3A>C	SS	1	intron 11		Anwar et al., 2009
163		S448X	1	12		Pendred /Bor homepage
164	1343C>T	S448L	1	12		Pendred /Bor homepage
166	1363A>T	I455F	1	12		Pendred /Bor homepage
167	1371C>A	N457K	1			Pendred /Bor homepage
168		FS464	1			Pendred /Bor homepage
169		L465W	2			Pendred /Bor homepage
170	1398-1399delITG	X466	1			Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
171	1408C>T	R473C	1	12		Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
172	1409G>A	R470H	1	12	alça EC 6	Yuan et al., 2009
	1438-14A>G		1	intron 12		Hochman et al., 2010
173	IVS12-6insT			intron 12		Dai et al., 2008
174	1440T>A	V480D	1	13	12	Pendred /Bor homepage
175	1454C>G	T485R	1	13	12	Pera et al., 2008a
	1454T>C	T485M	1	13	12	Mercer et al., 2011; Chen et al., 2011
176	1458_1459insT	I487Yfs39		13	12	Brownstein et al., 2008
177	1468A>C	I490L	1	13	12	Pendred /Bor homepage
178	1472T>C	I491T	2	13	12	Dai et al., 2008; Yuan et al., 2009



Tabela 1 - Lista de mutações já descritas no gene *SLC26A4* - modificada e atualizada da Pendred/Bor homepage (Chang et al., 2012).

(continuação)

	Alteração nucleotídica	Alteração do aminoácido	Nº de famílias	Região gênica	Domínio da proteína	Referência
179	1489G>A	G497S	3	13	12	Pendred /Bor homepage
180	1489G>C	G497R	1	13	12	Pendred /Bor homepage
181		T505N	1			Pendred /Bor homepage
	1520delT	L507X	1	13		Huang et al., 2011
	1522A>G	T508A	1	13		Yuan et al., 2012
182	1523C>A	T508N	3	13	COOH	Pendred /Bor homepage
183		Q514R	1			Pendred /Bor homepage
184	1536-1538delAG	X524	2	13	COOH	Pendred /Bor homepage
185	1540C>T	Q514X	1	13	COOH	Wang et al., 2007
186	1541C>A	Q514K	3	13	COOH	Pera et al., 2008a
187	1544+9C>G (IVS13+9C>G)	SS	1	intron 13	COOH	Pendred /Bor homepage
	1544+9C>T	SS		intron 13	COOH	Chen et al., 2011
	IVS13-1insC	SS	1	intron 13	COOH	Chen et al., 2012
188	1548insC		1			Pendred /Bor homepage
189	1554G>A	W518X	1	14		Pourová et al., 2010
190	1555-6delAA		1	14	COOH	Reyes et al., 2009
191	1561-1571insCTTGGAATGGC	S523fsX548	1	14	COOH	Fugazzola et al., 2007
192	1579 A>G	T527A	1	14	COOH	Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
193	1579A>C	T527P	1	14	COOH	Asakura et al., 2010
194	1586delT			14	COOH	Pendred /Bor homepage
195	1586T>G	I529S	1	14	COOH	Wang et al., 2007
196	1588T>C	Y530H	12	14	COOH	Pendred /Bor homepage
197		Y530S	1	14	COOH	Pendred /Bor homepage
198	1594A>C	S532R	2	14	COOH	Wang et al., 2007
		S532I		14	COOH	Usami et al., 2012
	1594AG>T	S532fsX545	1	14	COOH	Huang et al., 2011
199	1614C>T	N358N	1	14	COOH	Jonard et al., 2010
200	1614+1G>A	SS	5	intron 14	COOH	Pendred /Bor homepage
	1614+1G>C	SS		intron 14	COOH	Chen et al., 2011
	1614+7A>G	SS		intron 14	COOH	Chen et al., 2011
201	1615-7A>G		1	intron 14		Pendred /Bor homepage
202	IVS14-2A>G (1615-2A>G)	SS	1	intron 14		Simões-Teixeira et al., 2011
203	1615-1G>A	SS	1	intron 14	COOH	Pendred /Bor homepage
	1615-2A>G	SS	1	intron 14	COOH	Chen et al., 2011
204	1625C>G	P542R	1	15	COOH	Choi et al., 2009
205	1634T>A	V545A	1	15	COOH	Reyes et al., 2009
206		S552I	1		COOH	Pendred /Bor homepage
207	1652insT		1		COOH	Pendred /Bor homepage
208	1666T>C	Y556H	1	15	COOH	Pendred /Bor homepage
209	1667A>G	Y556C	1	15	COOH	Pendred /Bor homepage
210	1673A>T	N558I	1	15	COOH	Wang et al., 2007
211	1687-92delA		1	15		Reyes et al., 2009
	1691insA		1	15	COOH	Chen et al., 2012
	1692_1693insA	C565MfsX8	1	15		Anwar et al., 2009

Tabela 1 - Lista de mutações já descritas no gene *SLC26A4* - modificada e atualizada da Pendred/Bor homepage (Chang et al., 2012).

(continuação)

	Alteração nucleotídica	Alteração do aminoácido	Nº de famílias	Região gênica	Domínio da proteína	Referência
212	1693insA	X573	1	15		Dai et al., 2009
213	1694G>A	C565Y	3	15	COOH	Pendred /Bor homepage
214	IVS15+5G>A (1705+5 G>A)		4	intron 15		Pendred /Bor homepage
215	1708-18T>A (IVS15-18T>A)			intron 15		Pera et al., 2008b
216	1708G>A	V570I	1	16	COOH	Pendred /Bor homepage
217		F572L		16	COOH	Zhao et al., 2009
218	1716T>A	F572L	1	16	COOH	Siem et al., 2010
219	1717G>C	D573H	1	16	COOH	Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
220	1717G>T	D573Y	1	16	COOH	Wang et al., 2007
221		R581S		16	COOH	Pendred /Bor homepage
222	1746delG	X585	1	16	COOH	Wang et al., 2007
223	1751C>A	A584E	1	16	COOH	Pendred /Bor homepage
224	1786C>T	Q596X	1	16	COOH	Wu et al., 2010
225	1790T>C	L597S	9	16	COOH	Pendred /Bor homepage
226	IVS16-6G>A		1	intron 16		Pendred /Bor homepage
	1825delG					Li et al., 2010
227	1826 T>G	V609G	2	17	COOH	Pendred /Bor homepage
228	1863delT		1			Pendred /Bor homepage
229		S610X	1			Pendred /Bor homepage
230	1870C>G	L624V	1	17	COOH	Pendred /Bor homepage
231		E625X	1	17	COOH	Pendred /Bor homepage
232	1880T>G	L627R	1	17	COOH	Jonard et al., 2010
233	1898delA	FS634	2	17	COOH	Pendred /Bor homepage
	1919G>A	W640X	1	17	COOH	Chen et al., 2012
	1924T>C	S642P		17	COOH	Chen et al., 2011
234	1958T>C	V653A	1	17	COOH	Pendred /Bor homepage
235		S657N	1	17	COOH	Pendred /Bor homepage
236	1975G>C	V659L	1	17	COOH	Pendred /Bor homepage
237		D661E	1	17	COOH	Guo et al., 2008
238		S666F	1	17	COOH	Pendred /Bor homepage
239	2000T>G	F667C	1	17	COOH	Pendred /Bor homepage
	2000T>C	F667S	1	17	COOH	Chen et al., 2012
240	2003T>C	L668P	1	17	COOH	Pendred /Bor homepage Comunicação pessoal à MORL
	2006A>T	D669V	1	17	COOH	Guo et al., 2010
241	2015G>A	G672E	3	17	COOH	Pendred /Bor homepage
242		L676Q	1			Pendred /Bor homepage
243	2048T>C	F683S	1	18	COOH	Pendred /Bor homepage
244	2054G>T	R685I	1	18	COOH	Wang et al., 2007
245	2059G>T	D687Y	1	18	COOH	Pendred /Bor homepage
246	2082delA		1	18	COOH	Reyes et al., 2009
248		S694P	1			Pendred /Bor homepage
	2086C>T	Q696X	4	18	COOH	Huang et al., 2011; Lai et al., 2012; Chen et al., 2012

Tabela 1 - Lista de mutações já descritas no gene *SLC26A4* - modificada e atualizada da Pendred/Bor homepage (Chang et al., 2012).

(conclusão)

	Alteração nucleotídica	Alteração do aminoácido	Nº de famílias	Região gênica	Domínio da proteína	Referência
247	IVS18+G>A (2089+1G>A)		1	intron 18		Pendred /Bor homepage
249	2090A>C	D697A	1	19		Dai et al., 2009
250	2111insGCTGG	X722	1	19	COOH	Pendred /Bor homepage
251	2130C>T	D710D	1	19	COOH	Pendred /Bor homepage
252		D711X	1	19	COOH	Pendred /Bor homepage
253	2139T>G	I713M	1	19	COOH	Pendred /Bor homepage
254	2127delT	X719	3	19	COOH	Pendred /Bor homepage
255	2145G>T	K715N	1	19		Dai et al., 2009
	2153T>C	F718S	1	19	COOH	Mercer et al., 2011
256	2162C>T	T721M	5	19	COOH	Pendred /Bor homepage
257	2167C>G	H723D	2	19	COOH	Dai et al., 2008; Yuan et al., 2009
258	2168A>G	H723R	34	19	COOH	Pendred /Bor homepage
259		D724G	1	19	COOH	Pendred /Bor homepage
260		D724N	1	19	COOH	Pendred /Bor homepage
261	2182-2183insG	Y728X	1	19	COOH	Pendred /Bor homepage
		Y728H		19	COOH	Jiang et al., 2010
	2190G>T	Q730H		19	COOH	Chen et al., 2011
262	2211G>C	E737D	2	19		Dai et al., 2009
263	2217G>A	G740S	1	19	COOH	Pendred /Bor homepage
264	2219G>T	G740V	1	19	COOH	Pendred /Bor homepage
265	2320-22T>C			intron 20		Pera et al., 2008b
266	2326C>T	R776C	2	21	COOH	Pendred /Bor homepage
267	2343A>G	X781W (X823)	1	21	COOH	Pendred /Bor homepage
268	2498A>T			21		Pera et al., 2008b

SS: sítio de *splicing*. MORL: Molecular Otolaryngology Research Laboratory. IC: intracelular. EC:extracelular. NH2: extremidade amino. COOH: extremidade carboxi.

Fonte: Modificado de Chang et al. (2012).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, nosso estudo estimou que cerca de 3% dos casos de surdez não sindrômica de provável herança autossômica recessiva são devidos a mutações no gene *SLC26A4* e que cerca de 20% dos casos de surdez associada à dilatação do aqueduto vestibular e/ou displasia de Mondini, outras malformações cócleo-vestibulares ou suspeita de síndrome de Pendred apresentaram pelo menos uma mutação provavelmente patogênica nesse gene (13,3% com mutações monoalélicas e 6,7% com mutações bialélicas).

Em geral, os estudos da literatura sobre busca de mutações no gene *SLC26A4* corroboram a importância da triagem molecular desse gene, em especial, nos casos de surdez não sindrômica associada ao aqueduto vestibular alargado e/ou outras malformações cócleo-vestibulares, ou suspeita de síndrome de Pendred. No entanto, no nosso estudo, o grupo composto pelas famílias triado por apresentar surdez de provável herança autossômica recessiva e haplótipos compatíveis com segregação do gene *SLC26A4* foi o que permitiu o maior número de diagnósticos moleculares concluídos, quando comparado ao grupo dos 15 indivíduos com disfunção da tireóide ou alterações morfológicas da orelha interna.

Idealmente, exames como tomografias e ressonâncias deveriam ser solicitados a todos os pacientes surdos. Infelizmente, nessa casuística não foi possível averiguar completamente a ocorrência de dilatação do aqueduto vestibular ou/e outras malformações cócleo-vestibulares, pois esses exames têm custos altos e requerem espera em filas enormes nos serviços públicos, o que torna sua realização rotineira muito difícil. Vale ressaltar também que nos casos com suspeita de síndrome de Pendred (com disfunção da tireóide), nenhuma mutação no gene *SLC26A4* foi encontrada. Esse resultado pode ser devido ao fato de que: a) esses pacientes apresentam hipotireoidismo isolado, que é uma condição frequente na população, e a presença da surdez é uma coincidência; b) o número amostral é pequeno.

A ausência de mutações bialélicas nesse grupo de 15 pacientes (em que está faltando o conjunto completo de sinais clínicos da síndrome) corrobora uma dificuldade já apontada por outros pesquisadores com relação aos diagnósticos clínicos quando o afetado é caso isolado na família. Vale ressaltar que apesar da Síndrome de Pendred e da surdez associada ao locus *DFNB4* serem apresentadas como duas entidades distintas no

banco de dados (OMIM), alguns trabalhos têm sugerido que ambas podem, na realidade, representar condições que fazem parte do espectro da variação fenotípica relacionada às mutações no gene *SLC26A4* (Masmoudi et al., 2000; Tsukamoto et al., 2003).

Nosso estudo revelou quatro mutações novas (c.1003T>G, c.1553G>A, IVS19+2T>C, IVS7+2T>C) dentre um total de 7 provavelmente patogênicas encontradas. A detecção dessas e de outras possíveis mutações no gene *SLC26A4* são contribuições interessantes, principalmente, porque elucidaram a etiologia de uma parcela dos casos de surdez de herança autossômica recessiva, o que torna esse gene um importante alvo de estudo nas mais diversificadas populações.

Portanto, o resultado global desse estudo enfatiza a relevância da triagem do gene *SLC26A4* nos casos familiares, nos quais os haplótipos são compatíveis com segregação do gene, assim como nos casos de surdez não sindrômica associada ao aqueduto vestibular alargado e/ou outras malformações cócleo-vestibulares. Nos casos com diagnóstico clínico definido de síndrome de Pendred, a triagem em busca de mutações nesse gene também será certamente válida, mas casos assim não foram averiguados para serem incluídos nessa amostra.

O aprofundamento de questões relacionadas à possível herança digênica poderão ser valiosas no intuito de esclarecer a razão da detecção de um número tão elevado de pacientes com mutações monoalélicas em nosso estudo e nos vários semelhantes descritos na literatura.

## REFERÊNCIAS\*

Abreu-Silva RS. Pesquisa de mutações mitocondriais associadas à deficiência auditiva. [dissertação (Mestrado em Genética)]. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; 2003.

Abreu-Silva RS, Batisso AC, Lezirovitz K, Romanos J, Rincon D, Auricchio MTBM, Otto PA, Mingroni-Netto RC. Correspondence regarding Ballana et al., "Mitochondrial 12S rRNA gene mutations affect RNA secondary structure and lead to variable penetrance in hearing impairment". *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343:675–6.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. Polyphen-2. [cited 2012 Nov 30]. Available from: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.

Albert S, Blons H, Jonard L, Feldmann D, Chauvin P, Loundon N, Sergent-Allaoui A, Houang M, Joannard A, Schmerber S, Delobel B, Leman J, Journel R, Catros H, Dollfus H, Eliot MM, David A, Calais C, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Huy PTB, Lacombe D, Duriez F, Francannet C, Bitoun P, Petit C, Garabédian EN, Couderc R, Marlin S, Denoyelle F. SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *Eur J Hum Genet*. 2006;14:773–9.

Applied Biosystems. GeneMapper. [cited 2012 Sep 10]. Available from: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/support/software/dna-sequencing/genemapper.html>

Asakura Y, Narumi S, Muroya K, Fujita K, Aida N, Hasagawa T, Adachi M. A patient with Pendred syndrome whose goiter progressed with normal serum thyrotropin and iodine organification. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(7):1793-7.

Anwar S, Riazuddin S, Ahmed ZM, Tasneem S, Ateeq-ul-Jaleel, Khan SY, Griffith AJ, Friedman TB, Riazuddin S. SLC26A4 mutation spectrum associated with DFNB4 deafness and Pendred's syndrome in Pakistanis. *J Hum Genet*. 2009 May;54(5):266-70.

Ballana E, Ventayol M, Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Connexins and deafness Homepage. [cited 2012 Jan 30]. Available from: <http://www.crg.es/deafness>.

Baloh RW, Honrubia V. Clinical neurophysiology of the vestibular System. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2001.

Banghova K, Al Taji E, Cinek O, Novotna D, Pourova R, Zapletalova J, Hnikova O, Lebl J. Pendred syndrome among patients with congenital hypothyroidism detected by neonatal screening: identification of two novel PDS/SLC26A4 mutations. *Eur J Pediatr*. 2008 Jul;167(7):777-83.

---

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Batissoco AC. Mutações nos genes *GJB2* e *GJB6* em indivíduos com deficiência auditiva [dissertação (Mestrado em Genética)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2006.

Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bul.* 2002; 63:73-94. Review.

Braga MCC, Otto PA, Spinelli M. Recurrence Risks in cases of Nonsyndromic Deafness. *Braz J Dys and Speech-ear Dis.* 1999;2:33-40.

Brownstein ZN, Dror AA, Gilony D, Migirov L, Hirschberg K, Avraham KB. A novel *SLC26A4* (PDS) deafness mutation retained in the endoplasmic reticulum. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008 Apr;134(4):403-7.

Cama E, Alemanno MS, Bellacchio E, Santarelli R, Carella M, Zelante L, Palladino T, Inches I, di Paola F, Arslan E, Melchionda S. Identification of a novel mutation in the *SLC26A4* gene in an Italian with fluctuating sensorineural hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009 Oct;73(10):1458-63.

Campbell C, Cucci RA, Prasad S, Green GE, Edeal JB, Galer CE, Karniski LP, Sheffield VC, Smith RJ. Pendred syndrome, *DFNB4*, and *PDS/SLC26A4* identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2001;17(5):403-11.

Center for Biological Sequence Analysis. NetGene2 Server. [cited 2012 Jan 30]. Available from: [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

Chang E, Kölln KA, Nishimura C, Fischer S, Smith, RJ. Pendred/BOR homepage. [cited 2012 Dec 10]. Available from: <http://www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor/>.

Chen K, Wang X, Sun L, Jiang H. Screening of *SLC26A4*, *FOXI1*, *KCNJ10*, and *GJB2* in bilateral deafness patients with inner ear malformation. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012 Jun;146(6):972-8.

Chen N, Tranebjærg L, Rendtorff ND, Schrijver I. Mutation analysis of *SLC26A4* for Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss by high-resolution melting. *J Mol Diagn.* 2011 Jul;13(4):416-26.

Choi BY, Kim HM, Ito T, Lee KY, Li X, Monahan K, Wen Y, Wilson E, Kurima K, Saunders TL, Petralia RS, Wangemann P, Friedman TB, Griffith AJ. Mouse model of enlarged vestibular aqueducts defines temporal requirement of *Slc26a4* expression for hearing acquisition. *J Clin Invest.* 2011 Nov;121(11):4516-25.

Choi BY, Stewart AK, Nishimura KK, Cha WJ, Seong MW, Park SS, Kim SW, Chun YS, Chung JW, Park SN, Chang SO, Kim CS, Alper SL, Griffith AJ, Oh SH. Efficient molecular genetic diagnosis of enlarged vestibular aqueducts in East Asians. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009;13(5):679-87.

Cirello V, Bazzini C, Vezzoli V, Muzza M, Rodighiero S, Castorina P, Maffini A, Bottà G, Persani L, Beck-Peccoz P, Meyer G, Fugazzola L. Molecular and functional studies of 4 candidate loci in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Apr 4;351(2):342-50.

Common JE, Bitner-Glindzicz M, O'Toole EA, Barnes MR, Jenkins L, Forge A, Kelsell DP. Specific loss of connexin 26 expression in ductal sweat gland epithelium associated with the deletion mutation del(GJB6-D13S1830). *Clin Exp Dermatol.* 2005 Nov;30(6):688-93.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Plataforma Lattes. [cited 2012 Jan 30]. Available from: [www.cnpq.br](http://www.cnpq.br).

Corpo Editorial da MedicinaNET. MedicinaNET. [cited 2012 Jan 30]. Available from: [www.medicinanet.com.br](http://www.medicinanet.com.br).

Cross NC, Stephens SD, Francis M, Hourihan MD, Reardon W. Computed tomography evaluation of the inner ear as a diagnostic, counselling and management strategy in patients with congenital sensorineural hearing impairment. *Clin Otolaryngol.* 1999; 24:235-8.

Dahl E, Manthey D, Chen Y, Schwarz HJ, Chang YS, Lalley PA, Nicholson BJ, Willecke K. Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *J Biol Chem.* 1996;271:17903-10. Note: Erratum: *J Biol Chem.* 271:26444 only, 1996.

Dai P, Stewart AK, Chebib F, Hsu A, Rozenfeld J, Huang D, Kang D, Lip V, Fang H, Shao H, Liu X, Yu F, Yuan H, Kenna M, Miller DT, Shen Y, Yang W, Zelikovic I, Platt OS, Han D, Alper SL, Wu BL. Distinct and novel SLC26A4/Pendrin mutations in Chinese and U.S. patients with nonsyndromic hearing loss. *Physiol Genomics.* 2009; 38(3):281-90.

Dai P, Yuan Y, Huang D, Zhu X, Yu F, Kang D, Yuan H, Wu B, Han D, Wong LJ. Molecular etiology of hearing impairment in Inner Mongolia: mutations in SLC26A4 gene and relevant phenotype analysis. *J Transl Med.* 2008 Nov 30;6:74.

Davis H, Silvermam SR. Auditory test hearing Aids. In: Davis H, Silvermam SR. *Hearing and deafness.* Holt: Rinehart and Winston, 1970.

de Moraes VC, Dos Santos NZ, Ramos PZ, Svidnicki MC, Castilho AM, Sartorato EL. Molecular analysis of SLC26A4 gene in patients with nonsyndromic hearing loss and EVA: Identification of two novel mutations in Brazilian patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2013 Mar;77(3):410-3.

de Wolf MJ, Honings J, Joosten FB, Hoefsloot L, Mylanus EA, Cremers CW. Two siblings with progressive, fluctuating hearing loss after head trauma, treated with cochlear implantation. *J Laryngol Otol.* 2010;124(1):86-9.

del Castillo FJ, Rodriguez-Ballesteros M, Alvarez A, Hutchin T, Leonardi E, De Oliveira CA, Azaiez H, Brownstein Z, Avenarius MR, Marlin S, Pandya A, Shahin H, Siemering KR, Weil D, Wuytz W, Aguirre LA, Martin Y, Moreno-Pelayo MA, Villamar M, Avraham KB, Dahl



HH, Kanaan M, Nance WE, Petit C, Smith RJ, Van Camp G, Sartorato EL, Murgia A, Moreno F, Del Castillo I. 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. *J Med Genet.* 2005;42:588-94.

del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, Menendez I, Moreno F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med.* 2002;346(4):243-49.

Dou H, Xu J, Wang Z, Smith AN, Soleimani M, Karet FE, Greinwald JH Jr, Choo D. Co-expression of pendrin, vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase alpha4-subunit and carbonic anhydrase II in epithelial cells of the murine endolymphatic sac. *J Histochem Cytochem.* 2004;52:1377-84.

Driver EC, Kelley MW. Specification of cell fate in the mammalian cochlea. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2009 Sep;87(3):212-21.

Dror AA, Avraham KB. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annu Rev Genet.* 2009;43:411-37.

Dror AA, Brownstein Z, Avraham KB. Integration of human and mouse genetics reveals pendrin function in hearing and deafness. *Cell Physiol Biochem.* 2011; 28(3):535-44.

Duman D, Sirmaci A, Cengiz FB, Ozdag H, Tekin M. Screening of 38 genes identifies mutations in 62% of families with nonsyndromic deafness in Turkey. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2011;15(1-2):29-33.

Eisen MD, Ryugo DK. Hearing molecules: contributions from genetic deafness. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007;64:566-80. Review.

Estivill X, Govea N, Barceló E, Badenas C, Romero E, Moral L, Scozzri R, D'Urbano L, Leviani M, Torroni A. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am J Hum Genet.* 1998;62(1):27-35.

Everett LA, Belyantseva IA, Noben-Trauth K, Cantos R, Chen A, Thakkar SI, Hoogstraten-Miller SL, Kachar B, Wu DK, Green ED. Targeted disruption of mouse Pds provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet.* 2001 Jan 15;10(2):153-61.

Everett LA, Glaser B, Beck JC, et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet.* 1997;17(4):411-22.

Everett LA, Morsli H, Wu DK, Green ED. Expression pattern of the mouse ortholog of the Pendred's syndrome gene (Pds) suggests a key role for pendrin in the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:9727-32.

Fugazzola L, Cirello V, Dossena S, Rodighiero S, Muzza M, Castorina P, Lalatta F, Ambrosetti U, Beck-Peccoz P, Bottà G, Paulmichl M. High phenotypic intrafamilial

variability in patients with Pendred syndrome and a novel duplication in the SLC26A4 gene: clinical characterization and functional studies of the mutated SLC26A4 protein. *Eur J Endocrinol.* 2007;157(3):331-8.

Grupo Virtuoso – Tecnologia educacional. Só Biologia. [cited 2012 Jan 30]. Available from: [www.sobiologia.com.br](http://www.sobiologia.com.br).

Guo YF, Liu XW, Guan J, Han MK, Wang DY, Zhao YL, Rao SQ, Wang QJ. GJB2, SLC26A4 and mitochondrial DNA A1555G mutations in prelingual deafness in Northern Chinese subjects. *Acta Otolaryngol.* 2008 Mar;128(3):297-303.

Guo YF, Wang YL, Xu BC, Liu XY, Zhu YM, Zhao FF, Ji YB, Zhou Y, Li JQ, Li Q, WangDY, Wang Qj. Identification of two novel mutations, c.232T>C and c.2006A>T, in SLC26A4 in a Chinese family associated with enlarged vestibular aqueduct. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2010;74(7):831-35.

Hadj-Kacem H, Kallel R, Belguith-Maalej S, Mnif M, Charfeddine I, Ghorbel A, Abid M, Ayadi H, Masmoudi S. SLC26A4 variations among Graves' hyper-functioning thyroid gland. *Dis Markers.* 2010;29(2):63-9.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999;41:95-8. [cited 2012 Nov 30].

Hochman JB, Stockley TL, Shipp D, Lin VY, Chen JM, Nedzelski JM. Prevalence of Connexin 26 (GJB2) and Pendred (SLC26A4) mutations in a population of adult cochlear implant candidates. *Otol Neurotol.* 2010 Aug;31(6):919-22.

Huang S, Han D, Yuan Y, Wang G, Kang D, Zhang X, Yan X, Meng X, Dong M, Dai P. Extremely discrepant mutation spectrum of SLC26A4 between Chinese patients with isolated Mondini deformity and enlarged vestibular aqueduct. *J Transl Med.* 2011 Sep 30;9:167.

Hultcrantz M, Bagger-Sjoberg D, Barbara M. Presence of glycosaminoglycans in the endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1997;117:518 -22.

Ikeda K, Morizono T. Calcium transport mechanism in the endolymph of the chinchilla. *Hear Res.* 1988;34:307-11.

Ito T, Noguchi Y, Yashima T, Ohno K, Kitamura K. Hereditary hearing loss and deafness genes in Japan. *J Med Dent Sci.* 2010 Mar;57(1):1-10. Review.

Jiang L, Feng Y, Chen H, He C, Mei L. An investigation of SLC26A4 gene mutation in nonsyndromic hearing impairment in Hunan province of China [abstract]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* 2010 Jul;24(13):587-91. Chinese.

Jonard L, Niasme-Grare M, Bonnet C, Feldmann D, Rouillon I, Loundon N, Calais C, Catros H, David A, Dollfus H, Drouin-Garraud V, Duriez F, Eliot MM, Fellmann F, Francannet C, Gilbert-Dussardier B, Gohler C, Goizet C, Journal H, Mom T, Thuillier-Obstoy MF, Couderc

R, Garabédian EN, Denoyelle F, Marlin S. Screening of SLC26A4, FOXI1 and KCNJ10 genes in unilateral hearing impairment with ipsilateral enlarged vestibular aqueduct. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2010;74(9):1049-53.

Kahrizi K, Mohseni M, Nishimura C, Bazazzadegan N, Fischer SM, Dehghani A, Sayfati M, Taghdiri M, Jamali P, Smith RJ, Azizi F, Najmabadi H. Identification of SLC26A4 gene mutations in Iranian families with hereditary hearing impairment. *Eur J Pediatr.* 2009; 168(6):651-53.

Kandel ER, Schwartz J, Jessell T. Principles of neural science. 4th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2000.

Karet FE, Finberg KE, Nelson RD, Nayir A, Mocan H, Sanjad SA, Rodriguez-Soriano J, Santos F, Cremers CW, Di Pietro A, Hoffbrand BI, Winiarski J, Bakkaloglu A, Ozen S, Dusunsel R, Goodyer P, Hulton SA, Wu DK, Skvorak AB, Morton CC, Cunningham MJ, Jha V, Lifton RP. Mutations in the gene encoding B1 subunit of H<sup>+</sup>-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat Genet.* 1999;21:84 -90.

Kim S, Song DG, Bae JW, Choi SY, Kim UK, Choi YJ, Lee KY, Lee SH, Lee JR. A Family of H723R Mutation for SLC26A4 Associated with Enlarged Vestibular Aqueduct Syndrome. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2009;2(2):100-2.

Kimberling WJ. Genetic linkage studies of hereditary hearing loss. In: LIM DJ. Cell and molecular biology of the ear. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2000. p. 123-32.

Kokotas H, Petersen MB, Willems PJ. Mitochondrial deafness. *Clin Genet.* 2007;71:379-91.

Lai CC, Chiu CY, Shiao AS, Tso YC, Wu YC, Tu TY, Jap TS. Analysis of the SLC26A4 gene in patients with Pendred syndrome in Taiwan. *Metabolism.* 2007;56(9):1279-84.

Lai R, Hu P, Zhu F, Zhu G, Vivero R, Peng A, Wu W, Xiao Z, Liu X, Xie D. Genetic diagnosis and cochlear implantation for patients with nonsyndromic hearing loss and enlarged vestibular aqueduct. *J Laryngol Otol.* 2012 Apr;126(4):349-55.

Lang F, Vallon V, Knipper M, Wangemann P. Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Oct;293(4):C1187-208. Review. Erratum in: *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Dec;293(6):C2001.

Lawrence Berkeley National Laboratory - Genome Informatics Group. NNSPLICE 0.9 version. [cited 2012 Jan 30]. Available from: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>.

Lee KY, Choi SY, Bae JW, Kim S, Chung KW, Drayna D, Kim UK, Lee SH. Molecular analysis of the GJB2, GJB6 and SLC26A4 genes in Korean deafness patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2008; 72(9):1301-9.

Li Q, Huang DL, Zhu QW, Yuan YY, Fang RP, Dai P. Sequencing analysis of whole SLC26A4 gene in severe to profound sensorineural hearing loss patients with IVS7-2A to G mutation of the gene [abstract]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2010 Dec;27(6):610-5. Chinese.

Li XC, Everett LA, Lalwani AK, Desmukh D, Friedman TB, Green ED, Wilcox ER. A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet*. 1998; 18(3):215-7.

Lim DJ, Karabinas C, Trune DR. Histochemical localization of carbonic anhydrase in the inner ear. *Am J Otolaryngol*. 1983; 4: 33– 42.

Lofrano-Porto A, Barra GB, Nascimento PP, Costa PG, Garcia EC, Vaz RF, Batista AR, Freitas AC, Cherulli BL, Bahmad F Jr, Figueiredo LG, Neves FA, Casulari LA. Pendred syndrome in a large consanguineous Brazilian family caused by a homozygous mutation in the SLC26A4 gene. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(8):1296-303.

Mahdieh N, Rabbani B, Wiley S, Akbari MT, Zeinali S. Genetic causes of nonsyndromic hearing loss in Iran in comparison with other populations. *J Hum Genet*. 2010; 55(10):639-48.

Marcus DC, Thalmann R, Marcus NY. Respiratory rate and ATP content of stria vascularis of guinea pig in vitro. *Laryngoscope*. 1978;88:1825–35.

Marcus DC, Wu T, Wangemann P, Kofuji P. KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282:C403–7.

Masmoudi S, Charfedine I, Hmani M, Grati M, Ghorbel AM, Elgaied-Boulila A, Drira M, Hardelin JP, Ayadi M. Pendred syndrome: phenotypic variability in two families carrying the same PDS missense mutation. *Am J Med Genet*. 2000;90:38-44.

Mercer S, Mutton P, Dahl HH. Identification of SLC26A4 mutations in patients with hearing loss and enlarged vestibular aqueduct using high-resolution melting curve analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011 May;15(5):365-8.

Nakaya K, Harbidge DG, Wangemann P, Schultz BD, Green E, Wall SM, Marcus DC. Lack of pendrin HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport elevates vestibular endolymphatic [Ca] by inhibition of acid-sensitive TRPV5 and TRPV6 channels. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292: F1314–21.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). dbSNP. [cited 2012 Jan 30]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). UniSTS. [cited 2010 April 30]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists>.

Okamura HO, Sugai N, Suzuki K, Ohtani I. Enzyme-histochemical localization of carbonic anhydrase in the inner ear of the guinea pig and several improvements of the technique. *Histochem Cell Biol*. 1996;106: 425– 30.

Palos F, García-Rendueles ME, Araujo-Vilar D, Obregon MJ, Calvo RM, Gameselle-Teijeiro J, Bravo SB, Perez-Guerra O, Loidi L, Czarnocka B, Alvarez P, Refetoff S, Dominguez-Gerpe L, Alvarez CV, Lado-Abeal J. Pendred syndrome in two Galician families: insights into clinical phenotypes through cellular, genetic, and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Jan;93(1):267-77.

Park HJ, Shaukat S, Liu XZ, Hahn SH, Naz S, Ghosh M, Kim HN, Moon SK, Abe S, Tukamoto K, Riazuddin S, Kabra M, Erdenetungalag R, Radnaabazar J, Khan S, Pandya A, Usami SI, Nance WE, Wilcox ER, Riazuddin S, Griffith AJ. Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. *J Med Genet.* 2003;40(4):242-48.

Pera A, Dossena S, Rodighiero S, Gandía M, Bottà G, Meyer G, Moreno F, Nofziger C, Hernández-Chico C, Paulmichl M. Functional assessment of allelic variants in the SLC26A4 gene involved in Pendred syndrome and nonsyndromic EVA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008a Nov 25;105(47):18608-13.

Pera A, Villamar M, Viñuela A, Gandía M, Medà C, Moreno F, Hernández-Chico C. A mutational analysis of the SLC26A4 gene in Spanish hearing-impaired families provides new insights into the genetic causes of Pendred syndrome and DFNB4 hearing loss. *Eur J Hum Genet.* 2008b;16(8):888-96.

Petersen MB, Willems PJ. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet.* 2006;69:371-92.

Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nat Genetics.* 1996;14:385-391.

Phelps PD, Coffey RA, Trembath RC, Luxon LM, Grossman AB, Britton KE, Kendall-Taylor P, Graham JM, Cadge BC, Stephens SG, Pembrey ME, Reardon W. Radiological malformations of the ear in Pendred syndrome. *Clin Radiol.* 1998;53(4):268-73.

Porubsky ES, Marovitz WF, Arenberg IK. Presence of acidic protein bound carbohydrates in the endolymphatic sac and duct of fetal, neonatal and adult rats, and adult humans. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1972;81: 76 - 81.

Pourová R, Janousek P, Jurovcík M, Dvůřáková M, Malíková M, Rasková D, Bendová O, Leonardi E, Murgia A, Kabelka Z, Astl J, Seeman P. Spectrum and frequency of SLC26A4 mutations among Czech patients with early hearing loss with and without Enlarged Vestibular Aqueduct (EVA). *Ann Hum Genet.* 2010 Jul;74(4):299-307.

Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, Shohat M, Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet.* 1993;4(3):289-94.

Pryor SP, Madeo AC, Reynolds JC, Sarlis NJ, Arnos KS, Nance WE, Yang Y, Zalewski CK, Brewer CC, Butman JA, Griffith AJ. 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. *J Med Genet.* 2005;42(2):159-65.

Reardon W, Coffey R, Chowdhury T, Grossman A, Jan H, Britton K, Kendall-Taylor P, Trembath R. Prevalence, age of onset, and natural history of thyroid disease in Pendred syndrome. *J Med Genet.* 1999;36(8):595-8.

Reardon W, O'Mahoney CF, Trembath R, Jan H, Phelps PD. Enlarged vestibular aqueduct: a radiological marker of Pendred syndrome, and mutation of the PDS gene. *Quart J Med.* 2000;93: 99-104.

Rebeh IB, Yoshimi N, Hadj-Kacem H, Yanohco S, Hammami B, Mnif M, Araki M, Ghorbel A, Ayadi H, Masmoudi S, Miyazaki H. Two missense mutations in SLC26A4 gene: a molecular and functional study. *Clin Genet.* 2010 Jul;78(1):74-80.

Reyes S, Wang G, Ouyang X, Han B, Du LL, Yuan HJ, Yan D, Dai P, Liu XZ. Mutation analysis of SLC26A4 in mainland Chinese patients with enlarged vestibular aqueduct. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009;141(4):502-8.

Rodriguez-Paris J, Pique L, Colen T, Roberson J, Gardner P, Schrijver I. Genotyping with a 198 mutation arrayed primer extension array for hereditary hearing loss: assessment of its diagnostic value for medical practice. *PLoS One.* 2010;5(7):e11804.

Romo LV, Casselman JW, Robson CD. Temporal bone: congenital anomalies. In: Som PM, Curtin HD. *Head and neck imaging.* St Louis: Mosby; 2003. p. 1109-71.

Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3. [cited 2010 Apr 16]. Available from: <http://frodo.wi.mit.edu/>.

Rozenfeld J, Efrati E, Adler L, Tal O, Carrithers SL, Alper SL, Zelikovic I. Transcriptional regulation of the pendrin gene. *Cell Physiol Biochem.* 2011;28(3):385-96. Review.

Salt AN. Regulation of endolymphatic fluid volume. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Oct;942:306-12. Review.

Scott DA, Wang R, Kreman TM, Andrews M, McDonald JM, Bishop JR, Smith RJH, Karniski LP, Sheffield VC. Functional differences of the PDS gene product are associated with phenotypic variation in patients with Pendred syndrome and non-syndromic hearing loss (DFNB4). *Hum Mol Genet.* 2000;9:1709-15.

Siem G, Fagerheim T, Jonsrud C, Laurent C, Teig E, Harris S, Leren TP, Früh A, Heimdal K. Causes of hearing impairment in the Norwegian paediatric cochlear implant program. *Int J Audiol.* 2010;49(8):596-605.

Simões-Teixeira H, Matos TD, Marques MC, Dias O, Andrea M, Barreiros E, Barreiros L, Moreno F, Fialho G, Caria H, Del Castillo I. Novel splice-site mutation c.1615-2A>G (IVS14-2A>G) in the SLC26A4 gene causing Pendred syndrome in a consanguineous Portuguese family. *Am J Med Genet A.* 2011;155A(4):924-7.

Smith RJH, Shearer AE, Hildebrand MS, Van Camp G. Deafness and hereditary hearing loss overview. 1999 Feb 14 [updated 2012 Jan 05]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993. [cited 2012 Oct 17]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1434/>.

Smith RJH, Van Camp G. Pendred Syndrome/DFNB4. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-1998 Sep 28 [updated 2009 Apr 02]. [cited 2012 Oct 17]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1467/>.

Snabboon T, Plengpanich W, Saengpanich S, Sirisalipoch S, Keelawat S, Sunthornyothin S, Khovidhunkit W, Suwanwalaikorn S, Sridama V, Shotelersuk V. Two common and three novel PDS mutations in Thai patients with Pendred syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2007 Dec;30(11):907-13.

SoftGenetics LLC. GeneMarker. [cited 2012 Nov 30]. Available from: <http://www.softgenetics.com/GeneMarker.html>.

Song MH, Lee KY, Choi JY, Bok J, Kim UK. Nonsyndromic X-linked hearing loss. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012;4:924-33.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jun 15;30(12):e57.

Spicer SS, Schulte BA. Differentiation of inner ear fibrocytes according to their ion transport related activity. *Hear Res*. 1991;56:53-64.

Stankovic KM, Brown D, Alper SL, Adams JC. Localization of pH regulating proteins H<sup>+</sup>ATPase and Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger in the guinea pig inner ear. *Hear Res*. 1997;114: 21-34. [Erratum. *Hear Res* 124(1-2): 191-192, 1998.]

Sundstrom RA, Van Laer L, Van Camp G, Smith RJH. Autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Am J Med Genet*. 1999;89:123-29.

Takeuchi S, Ando M, Kakigi A. Mechanism generating endocochlear potential: role played by intermediate cells in stria vascularis. *Biophys J*. 2000;79:2572-82.

Technelysium Pty Ltd. Chromas Lite 2.01. [cited 2012 Nov 30]. Available from: <http://technelysium.com.au/>.

Tsukamoto K, Suzuki H, Harada D, Namba A, Abe S, Usami S. 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. *Eur J Hum Genet*. 2003;11:916-22.

UCSC Genome Bioinformatics. UCSC Genome Browser. [cited 2010 Apr 30]. Available from: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>.

Usami S, Nishio SY, Nagano M, Abe S, Yamaguchi T; Deafness Gene Study Consortium. Simultaneous screening of multiple mutations by invader assay improves molecular diagnosis of hereditary hearing loss: a multicenter study. *PLoS One*. 2012;7(2):e31276.

Van Camp G, Smith R. Hereditary Hearing Loss Homepage. [cited 2012 Jan 30]. Available from: <http://hereditaryhearingloss.org/>.

Van Laer L, Cryns K, Smith RJ, Van Camp G. Nonsyndromic hearing loss. *Ear Hear*. 2003;24:275-88.

Van Laer L, McGuirt WT, Yang T, Smith RJH, Van Camp G. Autosomal dominant nonsyndromic hearing impairment. *Am J Med Genet*. 1999;89:167-74.

Veda's Staff. Vestibular Disorders Association. [cited 2012 Oct 26]. Available from: <http://vestibular.org/>.

Wang QJ, Zhao YL, Rao SQ, Guo YF, He Y, Lan L, Yang WY, Zheng QY, Ruben RJ, Han DY, Shen Y. Newborn hearing concurrent gene screening can improve care for hearing loss: a study on 14,913 Chinese newborns. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2011;75(4):535-42.

Wang QJ, Zhao YL, Rao SQ, Guo YF, Yuan H, Zong L, Guan J, Xu BC, Wang DY, Han MK, Lan L, Zhai SQ, Shen Y. A distinct spectrum of SLC26A4 mutations in patients with enlarged vestibular aqueduct in China. *Clin Genet*. 2007;72(3):245-54.

Wangemann P, Itza EM, Albrecht B, Wu T, Jabba SV, Maganti RJ, Lee JH, Everett LA, Wall SM, Royaux IE, Green ED, Marcus DC. Loss of KCNJ10 protein expression abolishes endocochlear potential and causes deafness in Pendred syndrome mouse model. *BMC Med*. 2004;2: 30.

Wangemann P, Nakaya K, Wu T, Maganti RJ, Itza EM, Sanneman JD, Harbidge DG, Billings S, Marcus DC. Loss of cochlear HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion causes deafness via endolymphatic acidification and inhibition of Ca<sup>2+</sup> reabsorption in a Pendred syndrome mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292: F1345-53.

Wilch E, Azaiez H, Fisher RA, Elfenbein J, Murgia A, Birkenhäger R, Bolz H, Da Silva-Costa SM, Del Castillo I, Haaf T, Hoefsloot L, Kremer H, Kubisch C, Le Marechal C, Pandya A, Sartorato EL, Schneider E, Van Camp G, Wuyts W, Smith RJ, Friderici KH. A novel DFNB1 deletion allele supports the existence of a distant cis-regulatory region that controls GJB2 and GJB6 expression. *Clin Genet*. 2010 Sep;78(3):267-74.

Wilch E, Zhu M, Burkhart KB, Regier M, Elfenbein JL, Fisher RA, Friderici KH. Expression of GJB2 and GJB6 is reduced in a novel DFNB1 allele. *Am J Hum Genet*. 2006 Jul;79(1):174-9.

World Health Organization – WHO. [cited 2012 Nov 16]. Available from: <http://www.who.int/en/>.



Wu CC, Lu YC, Chen PJ, Yeh PL, Su YN, Hwu WL, Hsu CJ. 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. *Audiol Neurootol.* 2010;15(1):57-66.

Wu CC, Chen PJ, Chiu YH, Lu YC, Wu MC, Hsu CJ. Prospective mutation screening of three common deafness genes in a large Taiwanese Cohort with idiopathic bilateral sensorineural hearing impairment reveals a difference in the results between families from hospitals and those from rehabilitation facilities. *Audiol Neurootol.* 2008;13(3):172-81.

Yang T, Gurrola JG 2nd, Wu H, Chiu SM, Wangemann P, Snyder PM, Smith RJ. Mutations of KCNJ10 together with mutations of SLC26A4 cause digenic nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct syndrome. *Am J Hum Genet.* 2009 May;84(5):651-7.

Yang T, Vidarsson H, Rodrigo-Blomqvist S, Rosengren SS, Enerbäck S, Smith RJ. Transcriptional control of SLC26A4 is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4). *Am J Hum Genet.* 2007;80(6):1055-63.

Yoshino T, Sato E, Nakashima T, Nagashima W, Teranishi MA, Nakayama A, Mori N, Murakami H, Funahashi H, Imai T. The immunohistochemical analysis of pendrin in the mouse inner ear. *Hear Res.* 2004;195:9-16.

Yoshino T, Sato E, Nakashima T, Teranishi M, Yamamoto H, Otake H, Mizuno T. Distribution of pendrin in the organ of Corti of mice observed by electron immunomicroscopy. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2006 Aug;263(8):699-704.

Yuan Y, You Y, Huang D, Cui J, Wang Y, Wang Q, Yu F, Kang D, Yuan H, Han D, Dai P. Comprehensive molecular etiology analysis of nonsyndromic hearing impairment from typical areas in China. *J Transl Med.* 2009;10(7):79.

Yuan Y, Zhang X, Huang S, Zuo L, Zhang G, Song Y, Wang G, Wang H, Huang D, Han D, Dai P. Common molecular etiologies are rare in nonsyndromic Tibetan Chinese patients with hearing impairment. *PLoS One.* 2012;7(2):e30720.

Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, Mila M, Monica MD, Lutfi J, Shohat M, Mansfield E, Delgrosso K, Rappaport E, Surrey S, Fortina P. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet.* 1997;6(9):1605-9.

Zhao J, Wu LQ, Feng Y, Pan Q, Zhao K, Li HY, Liang DS. Mutational screening of the SLC26A4 gene in patients with nonsyndromic hearing loss by denaturing high-performance liquid chromatography [abstract]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2009 Feb;26(1):21-5. Chinese.

Zhao J, Yuan Y, Chen J, Huang S, Wang G, Han D, Dai P. SLC26A4 gene copy number variations in Chinese patients with non-syndromic enlarged vestibular aqueduct. *J Transl Med.* 2012 May 2;10:82.