

Vanessa Cristine Sousa de Moraes

**“ANÁLISE MOLECULAR DE GENES RELACIONADOS À
SÍNDROME DE PENDRED EM INDIVÍDUOS COM SURDEZ
E ESTUDO FUNCIONAL DA PROTEÍNA PENDRINA”**

***“MOLECULAR ANALYSIS OF GENES RELATED TO
PENDRED SYNDROME IN INDIVIDUALS WITH DEAFNESS
AND FUNCTIONAL STUDY OF PENDRIN PROTEIN”***

**CAMPINAS
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Vanessa Cristine Sousa de Moraes

**“ANÁLISE MOLECULAR DE GENES RELACIONADOS À
SÍNDROME DE PENDRED EM INDIVÍDUOS COM SURDEZ
E ESTUDO FUNCIONAL DA PROTEÍNA PENDRINA”**

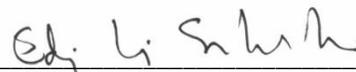
Orientadora: Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

***“MOLECULAR ANALYSIS OF GENES RELATED TO
PENDRED SYNDROME IN INDIVIDUALS WITH DEAFNESS
AND FUNCTIONAL STUDY OF PENDRIN PROTEIN”***

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutora em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Doctorate thesis presented to the Biology Institute to obtain the Ph.D. grade in Genetics and Molecular Biology in the area of Animal Genetics and Evolution.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
VANESSA CRISTINE SOUSA DE MORAES E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. EDI LÚCIA
SARTORATO.**



Assinatura da orientadora

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

D399a De Moraes, Vanessa Cristine Sousa, 1984-
Análise molecular de genes relacionados à síndrome de Pendred em indivíduos com surdez e estudo funcional da proteína pendrina / Vanessa Cristine Sousa de Moraes. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Edi Lúcia Sartorato.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Síndrome de Pendred. 2. Surdez. 3. Análise funcional. 4. Localização subcelular. 5. Mutação. I. Sartorato, Edi Lúcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Molecular analysis of genes related to Pendred syndrome in individuals with deafness and functional study of pendrin protein

Palavras-chave em inglês:

Pendred syndrome

Deafness

Functional analysis

Subcellular localization

Mutation

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Edi Lúcia Sartorato [Orientador]

José Andrés Yunes

José Faibes Lubianca Neto

Ana Beatriz Alvarez Perez

Monica Barbosa de Melo

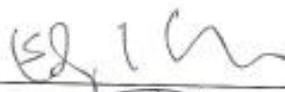
Data de defesa: 23-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

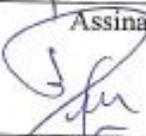
Campinas, 23 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

Dra. Edi Lúcia Sartorato (orientadora)


Assinatura

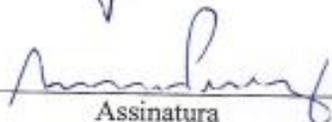
Prof. Dr. José Andrés Yunes


Assinatura

Prof. Dr. José Faibes Lubianca Neto


Assinatura

Dra. Ana Beatriz Alvarez Perez


Assinatura

Dra. Mônica Barbosa De Mello


Assinatura

Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes

Assinatura

Dr. Lúcio Fabio Caldas Ferraz

Assinatura

Profª. Dra. Andrea Trevas Maciel Guerra

Assinatura

*“Dedico este trabalho a
minha mãe Virgínia Torres pelo
constante incentivo”*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Edi Lúcia Sartorato pela orientação, apoio, incentivo e confiança. Muito obrigada pelo conhecimento adquirido e amizade ao longo desses 8 anos.

Ao Prof. Dr. Arthur Menino Castilho pelo envio das amostras.

I would like to thank everyone for having accepted me in the lab and for the support given to me by professors and students of the Institute of Pharmacology and Toxicology from Paracelsus Medical University (Salzburg – Austria): Dr. Markus Paulmichl, Dr. Silvia Dossena, Dr. Charity Nofziger, Dr. Wolfgang Patsch, Dr. Selma Patsch, Emanuele Bernardinelli, Simone Vanoni, Greta Zara, Giada Scantamburlo, Elisabeth Mooslechner. Thank you so much!

Aos colegas Jhonathan Fernandez e Nathalia Zocal que realizaram parte do rastreamento molecular deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho e também à Prof^a. Dr^a. Maricilda Palandi de Mello pelo exemplo de profissionalismo e caráter.

Aos pacientes que fizeram parte deste trabalho e a toda a equipe do Ambulatório de Otorrinolaringologia do HC da UNICAMP.

Às agências financiadoras FAPESP, CAPES e FAEPEX, pela bolsa e auxílios concedidos.

Ao meu irmão Ari de Moraes por sempre me incentivar e me apoiar.

Ao meu padastro Clodoaldo Torres por acreditar em mim.

A minha amiga Adriana Mara Malta que me apoiou bastante, no Brasil e também na Áustria. Muito obrigada pelo carinho e pelo incentivo, você me ajudou muito.

A minha amiga do lab Sueli Costa obrigada pelas risadas sinceras, amizade e companheirismo.

Aos meus amigos de fora do lab que sempre estiveram presente nesta longa batalha: Bruna Martins, Cibele Dias, Viviane Artioli, Rangel dos Santos, Fabiana Alexandrino, Vitor Monteiro e Alexandra Carneiro. Obrigada pelas longas conversas e inúmeros conselhos.

RESUMO

O alargamento do aqueduto vestibular (EVA) é uma malformação da orelha interna que pode ser identificado por tomografia computadorizada ou ressonância magnética. O EVA é um dos principais sinais clínicos da Síndrome de Pendred (PDS), uma doença genética com padrão de herança autossômico recessivo causada na maioria dos casos por mutações no gene *SLC26A4*. Além de EVA, o bócio e defeito na organificação do iodeto na tireóide são achados clínicos típicos da PDS. Por sua vez, mutações no gene *SLC26A4* têm também sido observadas em indivíduos com surdez não sindrômica associada ao EVA. Recentemente os genes *FOXI1* e *KCNJ10* também foram implicados na PDS. O gene *FOXI1* é um fator de transcrição do gene *SLC26A4*. Medições electrofisiológicas mostraram que a alteração da pendrina, proteína codificada pelo gene *SLC26A4*, em modelos animais levava indivíduos à surdez pela falta do potencial endococlear devido à perda de expressão de canais potássio. Sendo atribuído ao gene *KCNJ10* a função de manutenção do potencial endococlear. Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de mutações nos genes *SLC26A4*, *FOXI1* e *KCNJ10* em 60 indivíduos brasileiros portadores de perda auditiva sensorineural, associada ou não a alterações no aqueduto vestibular. Foram encontradas 14 diferentes alterações no gene *SLC26A4*, das quais 3 ainda não haviam sido descritas na literatura (P142L, G149R e C282Y) e 4 já haviam sido descritas, porém ainda não haviam sido caracterizadas funcionalmente (T193I, Q413R, L445W e R776C). Dessa forma, foi realizada a análise funcional e a co-localização celular da proteína Pendrina com estas 7 variações alélicas. Não foi encontrada nenhuma evidência de contribuição digênica relacionada ao gene *FOXI1* e/ou *KCNJ10*, uma vez que nenhum paciente desta casuística com alteração no gene *SLC26A4* apresentou mutações nesses genes. Além disso, no grupo composto por 30 indivíduos surdos que não apresentam EVA, ficou evidente que o rastreamento do gene *SLC26A4* não foi suficiente para explicar a perda auditiva nesses pacientes, uma vez que foram encontradas apenas alterações em um alelo do gene. Por outro lado, no grupo formado por 30 indivíduos surdos que apresentam EVA, o rastreamento do gene *SLC26A4* possibilitou o esclarecimento do diagnóstico etiológico da perda auditiva em 5 pacientes que apresentaram mutações nos dois alelos do gene *SLC26A4*.

ABSTRACT

Enlargement of the vestibular aqueduct (EVA) is a malformation of the inner ear that can be identified by computed tomography or magnetic resonance imaging. EVA is the main feature of Pendred syndrome (PDS), a genetic disease with autosomal recessive inheritance pattern, in most cases caused by mutations in the *SLC26A4* gene. Besides EVA, goiter and defective organification of iodide in the thyroid are other typical clinical signs of PDS. In turn, *SLC26A4* gene mutations have been also observed in patients with non-syndromic deafness associated with EVA. Recently the genes *FOXI1* and *KCNJ10* were also implicated in the PDS. The *FOXI1* gene is a transcription factor of *SLC26A4* gene. Electrophysiological measurements in animal models showed that the mutated pendrin, the protein encoded by the *SLC26A4* gene, led individuals to deafness by the lack of endocochlear potential due to loss of expression of potassium channels. Being assigned to the *KCNJ10* gene the maintenance of endocochlear potential. Thus, the present study aimed to evaluate the occurrence of mutations in *SLC26A4*, and *KCNJ10 FOXI1* genes in 60 Brazilian patients with sensorineural hearing loss, with or without changes in the vestibular aqueduct. We found 14 different mutations in *SLC26A4* gene, of which 3 had not yet been described in the literature (P142L, G149R and C282Y) and 4 had already been described, but had not been characterized functionally yet (T193I, Q413R, L445W and R776C). Thus, we performed the functional analysis and cellular co-localization of Pendrin protein with these 7 allelic variants. We found no evidence of digenic contribution related to *FOXI1* and/or *KCNJ10* genes, since no patient in with mutations in *SLC26A4* gene showed mutations in these genes. In addition, the screening of *SLC26A4* gene in 30 deaf individuals with no EVA was not sufficient to explain the hearing loss in these patients, since mutations were found only in one allele of the gene. On the other hand, the screening of *SLC26A4* gene in 30 deaf individuals with EVA allowed the elucidation of the etiology of hearing loss in 5 patients with mutations in both alleles of this gene.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA PERDA AUDITIVA	27
2. O SISTEMA AUDITIVO	32
3. ASPECTOS GENÉTICOS DA PERDA AUDITIVA	35
3.1. GENES DAS CONEXINAS – <i>GJB2</i> E <i>GJB6</i>	39
3.2. GENES MITOCONDRIAIS	46
4. ASPECTOS GERAIS DA SÍNDROME DE PENDRED	50
4.1. O GENE <i>SLC25A4</i> E A PROTEÍNA PENDRINA	52
4.2. GENE <i>FOXI1</i>	57
4.3. GENE <i>KCNJ10</i>	58
OBJETIVOS	61
▪ OBJETIVOS GERAIS/ESPECÍFICOS	63
METODOLOGIA	65
1. CASUÍSTICA	67
2. DIAGNÓSTICO CLÍNICO DA PERDA AUDITIVA	68
3. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE SANGUE PERIFÉRICO	70
4. DETECÇÃO DA MUTAÇÃO 35DELG NO GENE <i>GJB2</i>	71
4.1. RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE <i>GJB2</i>	72
4.1.1. RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE <i>GJB2</i> POR SEQUENCIAMENTO	74

5.	DETECÇÃO DAS DELEÇÕES Δ (<i>GJB6-D13S1830</i>) E Δ (<i>GJB6-D13S1854</i>) NO GENE <i>GJB6</i>	76
6.	MUTAÇÃO MITOCONDRIAL A1555G NO GENE <i>12S RRNA</i>	78
7.	RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE <i>SLC26A4</i>	79
8.	RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE <i>FOX11</i>	82
9.	RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE <i>KCNJ10</i>	83
10.	CULTURA DE CÉLULAS	85
10.1.	LINHAGENS CELULARES.....	85
10.1.1.	<i>CÉLULAS HEK293 PHOENIX</i>	85
10.1.2.	<i>CÉLULAS HELA</i>	86
10.2.	COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA MEM	87
10.3.	SUBCULTIVO DE CÉLULAS.....	87
11.	VETORES DE EXPRESSÃO.....	88
11.1.	CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL.....	88
11.1.1.	<i>PTARGET-PDS</i>	89
11.1.2.	<i>PTARGET VAZIO</i>	90
11.1.3.	<i>PEYFP-N1*V</i>	90
11.2.	Co-LOCALIZAÇÃO CELULAR.....	91
11.2.1.	<i>PEYFP-N1-PDS</i>	91

11.2.2.	<i>PEYFP-N1 VAZIO</i>	92
12.	MUTAGÊNESE SÍTIO – DIRIGIDA	92
12.1.	DESENHO DE <i>PRIMERS</i>	94
12.2.	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE, DIGESTÃO E PURIFICAÇÃO	96
12.2.1.	<i>PCR</i>	96
12.2.2.	<i>DIGESTÃO DO DNA PARENTAL</i>	97
12.2.3.	<i>PURIFICAÇÃO</i>	97
12.3.	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA I.....	100
12.3.1.	<i>CÉLULAS COMPETENTES XL1-BLUE</i>	100
12.3.2.	<i>CHOQUE TÉRMICO</i>	102
12.4.	MINIPREP E SEQUENCIAMENTO I.....	104
12.5.	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA II E MAXIPREP.....	107
12.6.	SEQUENCIAMENTO II	110
13.	TRANSFEÇÃO	112
13.1.	TRANSFEÇÃO PARA CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL: CO-PRECIPITAÇÃO POR FOSFATO DE CÁLCIO	112
13.2.	TRANSFEÇÃO PARA CO-LOCALIZAÇÃO CELULAR: METAFECTENE® - PRO.....	115
14.	TESTE FUNCIONAL	119
15.	CO-LOCALIZAÇÃO CELULAR	123

16.	RASTREAMENTO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>SLC26A4</i>	128
	RESULTADOS.....	131
1.	RASTREAMENTO INICIAL.....	133
2.	RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE <i>SLC26A4</i>	134
2.1.	RESULTADOS DO GRUPO I	135
2.2.	RESULTADOS DO GRUPO II	136
3.	RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NOS GENES <i>FOXI1</i> E <i>KCNJ10</i>	142
4.	TESTES FUNCIONAIS - PENDRINA.....	144
5.	CO-LOCALIZAÇÃO CELULAR – PENDRINA.....	148
6.	RASTREAMENTO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>SLC26A4</i>	165
7.	RESUMO DOS RESULTADOS	169
	DISCUSSÃO	171
	CONCLUSÕES	183
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	187
	ANEXOS	203

INTRODUÇÃO

1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA PERDA AUDITIVA

O mecanismo da audição é bastante complexo, e anormalidades no sistema auditivo e seu funcionamento são igualmente intrigantes. A perda auditiva é um dos distúrbios sensoriais humanos mais comuns, afetando o desenvolvimento infantil, integração social e a qualidade de vida dos indivíduos afetados com um substancial impacto na saúde pública. A surdez pode se manifestar em qualquer faixa etária. Na criança, se a perda ocorre já ao nascimento ou nos primeiros anos de vida, poderá causar distúrbios ou atrasos na aquisição da linguagem, além de problemas no desenvolvimento intelectual, emocional e de aprendizado. No adulto, pode gerar isolamento, levar à depressão, a problemas no trabalho e de relacionamento.

O diagnóstico realizado durante o primeiro ano de vida da criança possibilita a intervenção médica e fonoaudiológica, permitindo um prognóstico mais favorável em relação ao seu desenvolvimento. No Brasil, de modo geral, o diagnóstico das alterações auditivas ocorre muito tardiamente, por volta dos dois ou três anos de idade, o que prejudica o prognóstico. Quanto antes ocorrer a reabilitação, melhores são os resultados.

A perda auditiva afeta cerca de 10% da população mundial, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2003), variando segundo o grau de desenvolvimento socioeconômico e hábito local (estado nutricional, ocupação profissional, raça, cultura e grau de informação sobre prevenção). Ainda de acordo com estimativas da OMS, pelo menos 278 milhões de pessoas no mundo apresentam perda auditiva bilateral moderada, profunda ou grave. Em países desenvolvidos 1 em cada 1000 crianças nasce com perda auditiva e 60% da população acima de 60 anos de idade apresentam algum grau de perda (Dror & Avraham, 2009).

No Brasil, a frequência é estimada em 4 a cada 1000 nascimentos (Piatto & Maniglia, 2001), podendo variar, dependendo da região estudada, de 2 a 7 para cada 1000 recém-nascidos (Simões & Maciel-Guerra, 1992; Russo *et al.*, 2000). Em idosos, um estudo transversal de base hospitalar, com 101 indivíduos acima de 65 anos participantes do Centro de Estudos do Envelhecimento – Setor de Geriatria e Gerontologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – Escola Paulista de Medicina (EPM), mostrou prevalência de perda auditiva de 63,5% (Bilton *et al.*, 1997).

Dentre os casos de crianças com perda auditiva no Brasil, 80 a 90% não completam o ensino fundamental e apenas 5% dos alunos com surdez profunda atingem níveis educacionais semelhantes ao das pessoas sem qualquer deficiência (Santos *et al.*, 2011).

São diferentes as formas em que a perda auditiva pode ser classificada. Quanto à localização da anomalia, a perda auditiva pode ser condutiva, quando a anomalia afeta a orelha externa ou média, impedindo que as ondas sonoras sejam conduzidas para a orelha interna. É a menos frequente e entre as causas mais comuns estão as otites, otosclerose ou aderências (imobilização de um ou mais ossos da orelha média) e tumores na orelha média. Geralmente as alterações condutivas podem ser solucionadas por tratamento médico ou cirúrgico. A perda auditiva é sensorineural quando a anomalia afeta a orelha interna (cóclea), o nervo auditivo, ou regiões auditivas do cérebro. É o tipo de perda mais frequente, chegando a cerca de 90% entre as crianças com déficit permanente da audição (Parving *et al.*, 1994). Entre as causas mais comuns estão a exposição a ruído de alta intensidade ou sons altos; presbiacusia (surdez em indivíduos com idade avançada), meningite, viroses (citomegalovírus, rubéola, caxumba), fatores genéticos, tumores e uso de medicamentos ototóxicos. Devido a grande diversidade etiológica da perda auditiva sensorineural, em muitos casos, é difícil estabelecer a causa da perda. Por fim, a perda auditiva é classificada como mista

quando há uma alteração na condução do som associada à lesão do órgão sensorial ou do nervo auditivo (Ito *et al.*, 2010).

A perda auditiva pode ser classificada de acordo com o momento de sua manifestação, podendo ser congênita ou adquirida. Se estiver presente ao nascimento ou antes da aquisição da linguagem, a perda auditiva é considerada pré-lingual e, quando se manifesta após a aquisição da linguagem, pós-lingual (Ito *et al.*, 2010).

De acordo com o grau, a surdez pode ainda ser definida, como leve (de 26 a 40 dB), moderada (de 41 a 70 dB), grave (de 71 a 90 dB) ou profunda (acima de 90 dB) (Davis & Silvermann, 1970). A avaliação é feita através dos limiares tonais nas frequências que variam de 0,5 a 4 kHz, que são essenciais para o entendimento da fala.

Quanto à lateralidade, a perda auditiva pode ser bilateral quando as duas orelhas são afetadas e, unilateral quando apenas um dos lados da orelha é afetado (Finsterer & Fellingner, 2005).

Em relação aos sinais clínicos, a perda auditiva é considerada não-sindrômica quando se apresenta de forma isolada, ou seja, sem associação a outros sinais clínicos. Por outro lado, a surdez é considerada sindrômica quando é acompanhada por outros sinais clínicos como: malformações craniofaciais e cervicais, displasias esqueléticas (Osteogênese imperfeita), anomalias cutâneas (Síndrome de Waardenburg), anomalias oculares (Síndrome de Usher), entre outros. O último levantamento realizado mostrou 680 síndromes associadas à perda auditiva, com variadas frequências, tipos e graus de perda (OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man* – julho, 2006). Algumas das síndromes mais frequentes que envolvem perda auditiva são: a síndrome de Pendred (OMIM #274600), associada ao defeito na organificação do iodo na tireoide e alargamento

do aqueduto vestibular (estrutura da orelha interna); a síndrome de Usher (OMIM #276900), relacionada à retinose pigmentar; e a síndrome de Waardenburg (OMIM #193500), associada a defeitos de pigmentação (Shaukat *et al.*, 2003; Hilgert *et al.*, 2009b; Yang *et al.*, 2010).

Surpreendentemente, estudos têm mostrado que um mesmo gene pode estar relacionado tanto com a perda auditiva sindrômica quanto não-sindrômica, ou mesmo envolvido em diferentes padrões de herança, dominante ou recessivo (Ammar-Khodja *et al.*, 2009; Dror & Avraham, 2009).

Uma série de fatores ambientais e genéticos (Tabela 1) podem estar envolvidos como causa da perda auditiva. Os fatores ambientais incluem a exposição frequente à alta intensidade do som, trauma acústico, infecções, drogas ototóxicas, entre outros, enquanto os fatores genéticos são causados por mutações em diferentes genes ou em elementos regulatórios que estão envolvidos no desenvolvimento adequado, na estrutura e na função da orelha (Dror & Avraham, 2009).

Tabela 1 – Fatores ambientais e genéticos envolvidos nos casos de perda auditiva.

Causas de perda auditiva		
<u>Ambiental</u>	Pré-Natal	<ul style="list-style-type: none"> - Infecção materna (rubéola, citomegalovírus, sífilis, toxoplasmose, herpes) - Uso de medicamentos ototóxicos durante a gestação - Irradiação durante a gestação
	Peri-Natal	<ul style="list-style-type: none"> - Pré-maturidade, Icterícia grave - Trauma de parto - Anóxia
	Pós-Natal	<ul style="list-style-type: none"> - Terapia intensiva neonatal de mais de cinco dias - Meningites, Otites - Sarampo, Caxumba - Exposição contínua a ruídos ou sons muito altos - Ventilação mecânica - Traumatismos cranianos
<u>Genética</u>	Sindrômico	<ul style="list-style-type: none"> - Autossômico dominante - Autossômico recessivo - Ligada ao X - Mitocondrial
	Não-Sindrômico	<ul style="list-style-type: none"> - Autossômico dominante - Autossômico recessivo - Ligada ao X - Ligada ao Y - Mitocondrial

No Brasil, os fatores ambientais ainda superam os de origem genética e, além disso, um grande número de casos é tido como idiopático (Pupo *et al.*, 2008). Estudos mostram que a etiologia não é esclarecida em 32 a 40% dos indivíduos brasileiros com perda auditiva (Pupo *et al.*, 2008; Calháu *et al.*, 2011). A alta prevalência da etiologia desconhecida aponta para a necessidade de aprofundamento no diagnóstico, dispendo também de estudos genéticos, de imagem e laboratoriais. À medida que vêm sendo implantadas melhorias no setor de saúde, e com o avanço e o aprofundamento nos estudos genéticos relacionados à perda auditiva, a proporção de causas genéticas tende a aumentar.

2. O SISTEMA AUDITIVO

O sistema auditivo é responsável por captar e transformar a energia mecânica das ondas sonoras em impulsos elétricos, os quais são enviados ao cérebro, onde são decodificados e interpretados, permitindo a compreensão dos sons. O sistema auditivo (Figura 1) é um dos mais complexos e sofisticados mecanismos de transdução existentes na natureza.

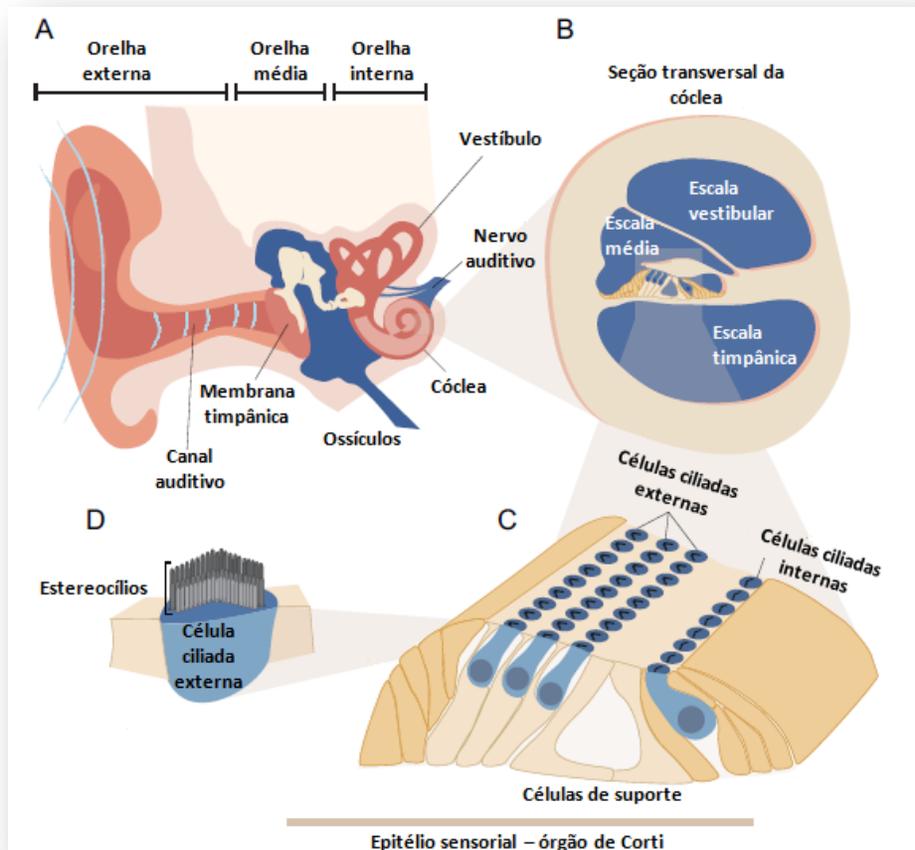


Figura 1 – Ilustração esquemática do sistema auditivo. Legenda: (A) divisão da orelha em três compartimentos anatômicos distintos, o externo, o médio e o interno; (B) seção transversal da cóclea e seus compartimentos; (C) órgão sensorial especializado (órgão de Corti); (D) célula ciliada com projeções apicais (estereocílios).

A orelha é dividida em três compartimentos anatômicos: orelha externa, média e interna (Figura 1A). O principal papel da orelha externa é conduzir as ondas sonoras do ambiente para a orelha interna. As ondas sonoras são captadas pelo pavilhão auricular da orelha externa e conduzidas através do canal auditivo até a membrana timpânica.

A orelha média contém três pequenos ossos (martelo, bigorna e estribo), os ossículos, que funcionam em conjunto como um elo entre o tímpano e a janela oval da orelha interna, a qual é preenchida por fluidos denominados perilinfa e endolinfa. Após o estímulo sonoro, a vibração do tímpano levará ao movimento dos ossículos da orelha média, e posteriormente, da endolinfa na orelha interna, a parte sensorial da orelha (Dror *et al.*, 2009).

A orelha interna é um órgão que contém os sistemas auditivo e vestibular responsáveis por duas funções importantes. Devido à proximidade anatômica, esses dois sistemas compartilham muitos elementos genéticos, fisiológicos e funcionais em comum. Como resultado, muitas alterações genéticas que afetam o sistema auditivo apresentam consequências sobre o sistema vestibular de forma direta ou indireta (Amiel *et al.*, 2011). Por meio da longa lista de mutações conhecidas que leva indivíduos à perda auditiva, fica evidente que a orelha interna é um órgão altamente complexo (Dror *et al.*, 2009). A orelha interna é composta pela cóclea, que é um canal ósseo-membranoso em forma de caracol, rodeado pelo osso temporal. É dividida em três compartimentos preenchidos por fluidos: as escalas média, vestibular e timpânica (Figura 1B). A escala média é uma cavidade preenchida por endolinfa, localizada entre a escala vestibular e timpânica, cavidades preenchidas por perilinfa. A escala média contém o órgão de Corti, que é a porção sensorial propriamente dita do sistema auditivo (Corti, 1851), a qual é fundamental para o funcionamento normal da audição. O órgão de Corti é constituído por células de suporte e células sensoriais, denominadas células ciliadas internas e externas, as quais são estimuladas pela energia mecânica

proveniente de estímulos acústicos (Figura 1C). Na superfície apical das células ciliadas contém projeções especializadas ricas em actina, denominadas estereocílios (Figura 1D). Uma membrana acelular, chamada membrana tectória, cobre o epitélio de células ciliadas. As células ciliadas externas são capazes de transformar a energia mecânica em impulsos elétricos, que é o princípio básico da audição. Após receber estímulos mecânicos, ocorre a deflexão dos estereocílios, na qual o influxo de íons despolarizam as células ciliadas e se propagam por meio de canais situados entre as pontas de estereocílios adjacentes (Kazmierczak *et al.*, 2007; Pickles *et al.*, 1984). A despolarização das células ciliadas provoca a liberação de vesículas contendo neurotransmissores nessas células, que desencadeiam o impulso nervoso. Os impulsos elétricos são então transmitidos ao nervo auditivo, que leva a informação ao cérebro, onde são interpretados.

A composição química da endolinfa, a qual apresenta concentração elevada de potássio (K⁺) e baixo teor de sódio (Na⁺) e de cálcio (Ca⁺²), é essencial para a despolarização das células ciliadas e para a função normal do sistema auditivo (Wangemann *et al.*, 1996). Dessa forma, a manutenção da homeostase da endolinfa é de grande importância. Porém, diversos fatores genéticos conhecidos levam indivíduos à perda auditiva por afetarem canais e/ou proteínas transportadoras que são responsáveis por manter a homeostase da endolinfa da orelha interna (Zdebik *et al.*, 2009). Entre esta lista de proteínas, destaca-se a pendrina, cuja função é manter o equilíbrio ácido-base da endolinfa, desempenhando um papel crucial no mecanismo auditivo normal.

3. ASPECTOS GENÉTICOS DA PERDA AUDITIVA

O grande avanço das pesquisas relacionadas à perda auditiva genética tem provocado um importante progresso na identificação das causas da surdez, assim como no entendimento dos mecanismos moleculares que governam o desenvolvimento, a função, a resposta ao trauma e o envelhecimento da orelha interna. Os recentes estudos nas áreas de biologia molecular e genômica têm contribuído para elucidar a complexa rede de genes envolvidos no mecanismo da audição, que constituem o primeiro passo para a implementação de uma terapia eficiente para a perda auditiva.

A extensa quantidade de genes expressos na cóclea reflete a complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos neste órgão de intrincada natureza (Heller *et al.*, 1998). Até o momento já foram descritos 150 *loci* e mais de 70 genes envolvidos nos casos de perda auditiva. Estima-se que este número possa atingir 300 genes (1% do genoma humano), já que muitos *loci* foram mapeados, porém, os genes correspondentes ainda não foram identificados (Van Camp & Smith, 2012; Nance *et al.*, 2003; Brownstein *et al.*, 2012).

O grande obstáculo na localização de genes envolvidos na perda auditiva é a dificuldade de acesso à cóclea e às demais estruturas da orelha interna. A construção de um banco de cDNA de material coclear fetal possibilitou indentificar genes candidatos (Robertson *et al.*, 1994; Wilcox & Fex, 1992).

Os genes relacionados à audição apresentam funções diversificadas e a lista inclui genes que codificam componentes de matriz extracelular, proteínas de *gap junctions* (junções comunicantes) e adesão, canais de íons e transportadores, proteínas de superfície das células e receptores, assim como proteínas de citoesqueleto, fatores de transcrição, RNAt, RNAr e outras proteínas (Finsterer & Fellingner, 2005; Friedman *et al.*, 2007).

Outro fator responsável por elevar a complexidade genética da perda auditiva é o fato de um mesmo gene poder apresentar mutações que resultam em diferentes padrões de herança, dominante ou recessivo, ou ainda estar envolvido tanto com surdez síndrômica quanto não-sindrômica (Friedman *et al.*, 2007).

Apesar de aproximadamente 680 síndromes incluírem a surdez como uma de suas manifestações clínicas, apenas 30% dos casos de perda auditiva hereditária são síndrômicos (Hilgert *et al.*, 2009b). Até o momento já foram identificados pelo menos 35 genes associados a esse padrão. A seguir estão destacadas as principais síndromes que apresentam a surdez como sinal clínico (Tabela 2).

Aproximadamente 70% dos casos de perda auditiva hereditária são não-sindrômicos (Hilgert *et al.*, 2009b). Os diferentes locus ou regiões candidatas a apresentarem genes associados à surdez não-sindrômica recebem o prefixo DFN (do inglês *deafness* – surdez), seguido por um número que indica a ordem em que foram descobertos. As mutações genéticas conhecidas que levam à surdez podem ser de herança autossômica recessiva (DFNB), autossômica dominante (DFNA), ligada ao X (DFNX) ou mitocondrial (Dror & Avraham, 2009). Estima-se que aproximadamente 75 a 80% dos casos de surdez genética não-sindrômica sejam de herança autossômica recessiva, 20 a 25% autossômica dominante e cerca de 1 a 2% ligada ao cromossomo X. Além disso, a frequência da herança mitocondrial é estimada em 1% (Kokotas *et al.*, 2007; Hilgert *et al.*, 2009b).

Tabela 2 – Principais síndromes que apresentam a perda auditiva como sinal clínico.

Síndromes	Genes	Localização	Referência Bibliográfica
Alport	COL4A5	Xq22	Barker <i>et al.</i> , 1990
	COL4A3/A4	2q36-q37	Mochizuki <i>et al.</i> , 1994
Branchio-Oto-Renal	EYA1	8q13.3	Abdelhak <i>et al.</i> , 1997
	SIX5	19q13.3	Hoskins <i>et al.</i> , 2007
	Desconheci	1q31	Kumar <i>et al.</i> , 2000
	SIX1	14q21.3-	Ruf <i>et al.</i> , 2004
Jervell & Lange-Nielsen	KCNQ1	11p15.5	Neyroud <i>et al.</i> , 1997
	KCNE1	21q22.1-	Schulze-Bahr <i>et al.</i> , 1997
CHARGE	SEMA3E	7q21.11	Lalani <i>et al.</i> , 2004
	CHD7	19q13.3	Vissers <i>et al.</i> , 2004
Norrie	NDP	Xp11.3	Chen <i>et al.</i> , Berger <i>et al.</i> , 1992
Pendred	SLC26A4	7q21-q34	Everett <i>et al.</i> , 1997
	FOXI1	5q35.1	Yang <i>et al.</i> , 2007
	KCNJ10	1q23.2	Yang <i>et al.</i> , 2009
Stickler	COL2A1	12q13.11-	Ahmad <i>et al.</i> , 1991
	COL11A1	1p21	Richards <i>et al.</i> , 1996
	COL11A2	6p21.3	Vikkula <i>et al.</i> , 1995
	COL9A1	6q13	Van Camp <i>et al.</i> , 2006
	COL9A2	1p34.2	Baker <i>et al.</i> , 2011
Treacher Collins	TCOF1	5q32-q33.1	Dixon <i>et al.</i> , 1996
	PAX3	2q35	Tassabehji <i>et al.</i> , 1992
Waardenburg	MITF	3p14.1-p13.3	Tassabehji <i>et al.</i> , 1994
	Desconheci	1p21-p13.3	Am J Hum Genet 55 1994
	Desconheci	8p23	Selicomi <i>et al.</i> , 2002
	SNAI2	8q11	Sanchez-Martin <i>et al.</i> , 2002
	PAX3	2q35	Hoth <i>et al.</i> , 1993
	EDNRB	13q22	Attie <i>et al.</i> , 1995
	EDN3	20q13.2-	Edey <i>et al.</i> , 1996
	SOX10	22q13	Pingsult <i>et al.</i> , 1998
	MYO7A	11q13.5	Weil <i>et al.</i> , 1995
Usher	USH1C	11p15.1	Verpy <i>et al.</i> , Bitner-Glindzicz <i>et al.</i> ,
	CDH23	10q22.1	Wayne <i>et al.</i> , 1996 Bork <i>et al.</i> , Bolz <i>et</i>
	Desconheci	21q21	Chaib <i>et al.</i> , 1997
	PCDH15	10q21-22	Ahmed <i>et al.</i> , Alagramam <i>et al.</i> , 2001
	SANS	17q24-25	Mustapha <i>et al.</i> , 2002; Weil <i>et al.</i> , 2003
	Desconheci	15q22-23	Ahmed <i>et al.</i> , 2009
	USH2A	1q41	Kimberling <i>et al.</i> , 1990; Eudy <i>et al.</i> ,
	Desconheci	3p23-24.2	Hmani <i>et al.</i> , 1999
	VLGR1	5q14.3-q21.3	Pieke-Dahl <i>et al.</i> , 2000; Weston <i>et al.</i> ,
	WHRN	9q32	Ebermann <i>et al.</i> , 2007
	USH3A	3q21-q25	Sankila <i>et al.</i> , 1995; Joensuu <i>et al.</i> ,
	PDZD7	10q24.31	Ebermann <i>et al.</i> , 2010

A heterogeneidade genética da perda auditiva não-sindrômica é extremamente elevada. A Tabela 3 lista 64 genes já descritos relacionados à surdez não-sindrômica e está dividida de acordo com o modo de herança: autossômico recessivo, autossômico dominante, ligado ao cromossomo X e mitocondrial.

Tabela 3 – Genes associados à perda auditiva não-sindrômica.

Herança autossômica recessiva ou dominante		
Gene	Locus	Função do produto na audição
GJB2	DFNB1/DFNA3A	Homeostase iônica
TMC1	DFNB7/11/DFNA36	Desconhecida
TECTA	DFNB21/DFNA8/12	Proteína da matriz extracelular
MYO7A	DFNB2/DFNA11	Proteína motora dos estereocílios
GJB6	DFNB7/DFNA3B	Homeostase iônica
MYO6	DFNB37/DFNA22	Proteína motora dos estereocílios
GJB3	-/DFNA2B	Homeostase iônica
COL11A2	DFNB53/DFNA13	Proteína da matriz extracelular
Herança autossômica recessiva		
Gene	Locus	Função do produto na audição
SLC26A4	DFNB4	Homeostase iônica
MYO15A	DFNB3	Proteína motora dos estereocílios
OTOF	DFNB9	Exocitose nas vesículas sinápticas
CDH23	DFNB12	Proteína de adesão dos estereocílios
TMPRSS3	DFNB8/10	Desconhecida
TRIOBP	DFNB28	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
TNNE	DFNB6	Desconhecida
PJVK	DFNB59	Sinalização de células ciliadas e neurônios
ESPN	DFNB36	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
PCDH15	DFNB23	Proteína de adesão dos estereocílios
ESRRB	DFNB35	Fator de transcrição
MARVELD2	DFNB49	Homeostase iônica
LHFPL3	DFNB66/67	Proteína de adesão dos estereocílios
STRC	DFNB16	Proteína da matriz extracelular
CLDN14	DFNB29	Homeostase iônica
RDX	DFNB24	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
MYO3A	DFNB30	Proteína motora dos estereocílios
SLC26A5	DFNB61	Motor molecular de células ciliadas externas
WHRN	DFNB31	Proteína do arcabouço proteico dos estereocílios
USH1C	DFNB18	Proteína do arcabouço proteico dos estereocílios
OTOA	DFNB22	Proteína da matriz extracelular
GRXCR1	DFNB25	Desconhecida
LOXHD1	DFNB77	Feixe de estereocílios
TPRN	DFNB79	Feixe de estereocílios
GPSM2	DFNB82	Proteína transmembrânica
PTPRQ	DFNB84	Sinalização celular
HGF	DFNB39	Sinalização celular
LRTOM1	DFNB63	Desconhecida
MSRB3	DFNB74	Oxido-redução mitocondrial
SERPINB6	DFNB91	Inibidor de protease intracelular
ILDR1	DFNB42	Desconhecida
GIPC3	DFNB15/72/95	Feixe de estereocílios
Herança autossômica dominante		
Gene	Locus	Função do produto na audição
WFS1	DFNA6/14/38	Homeostase iônica
KCNQ4	DFNA2A	Homeostase iônica
COCH	DFNA9	Proteína da matriz extracelular
MYO1A	DFNA48	Desconhecida
ACTG1	DFNA20/26	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
EYA4	DFNA10	Fator de transcrição
MYH14	DFNA4	Desconhecida
DFNA5	DFNA5	Desconhecida
POU4F3	DFNA15	Fator de transcrição
CRYM	-	Homeostase iônica
TFCP2L3	DFNA28	Fator de transcrição
MYH9	DFNA17	Proteína motora dos estereocílios
CCDC50	DFNA44	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
DIAPH1	DFNA1	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
MIR-96	DFNA50	Regulação da expressão gênica
TJP2	DFNA51	Manutenção de diferença de potencial elétrico
SMAC/DIABLO	DFNA64	Indução de apoptose
Herança ligada ao X		
Gene	Locus	Função do produto na audição
POU3F4	DFNX2	Fator de transcrição
PRPS1	DFNX1	Metabolismo de purina e biossíntese de nucleotídeos
SMPX	DFNX3	Desconhecida
Herança mitocondrial		
Gene	Locus	Função do produto na audição
12S rRNA	MT-RNR1	RNA ribossômico mitocondrial
16S rRNA	MT-RNR2	RNA ribossômico mitocondrial
IRNA ^{Ser} (UCN)	MT-TS1	RNA transportador mitocondrial
IRNA ^{His}	MT-TH	RNA transportador mitocondrial
IRNA ^{Glu}	MT-TE	RNA transportador mitocondrial

Aproximadamente 50% dos casos de perda auditiva não-sindrômica autossômica recessiva podem ser atribuídos a alterações no *locus* DFNB1, causada por mutações nos genes *GJB2* que codifica a proteína conexina 26 e *GJB6* que codifica a proteína conexina 30.

3.1. GENES DAS CONEXINAS – *GJB2* E *GJB6*

As conexinas (Cx) são proteínas transmembrânicas envolvidas nas *gap junctions* (junções comunicantes). Elas compartilham uma homologia comum, apresentando quatro domínios α -hélice transmembrânicos, domínios citoplasmáticos que incluem as extremidades aminoterminal e carboxiterminal, a alça entre o segundo e o terceiro domínio transmembrânico, e duas alças extracelulares (Beyer *et al.*, 1993). A Figura 2 mostra um esquema que representa a estrutura das conexinas.

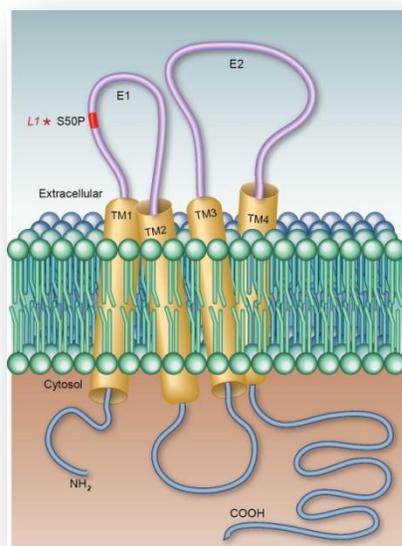


Figura 2 – Representação esquemática da estrutura das conexinas, demonstrando os domínios transmembrânicos (TM1-TM4), extremidades aminoterminal (NH₂) e carboxiterminal (COOH) e alças extracelulares (EC1 e EC2).

Em 1986, a primeira conexina foi clonada (Kumar & Gilula, 1986; Paul, 1986). Em termos evolucionários, as conexinas podem ser classificadas em pelo menos três subclasses – α , β ou γ – de acordo com o peso molecular ou homologia. Entretanto, a nomenclatura correntemente utilizada faz referência ao tamanho da proteína predita (em kDa) a partir da sequência do cDNA considerado, precedida pelo termo genérico Cx (Beyer *et al.*, 1993).

Seis moléculas de conexinas formam um hemicanal chamado conexon (Rabionet *et al.*, 2002). Em 2009, Maeda e colaboradores reportaram a análise cristalográfica do canal intercelular formado por Cx26 (Figura 3A e B). O estudo computacional estrutural pode contribuir para o conhecimento do efeito das mutações na estrutura e na função da proteína (Bicego *et al.*, 2006).

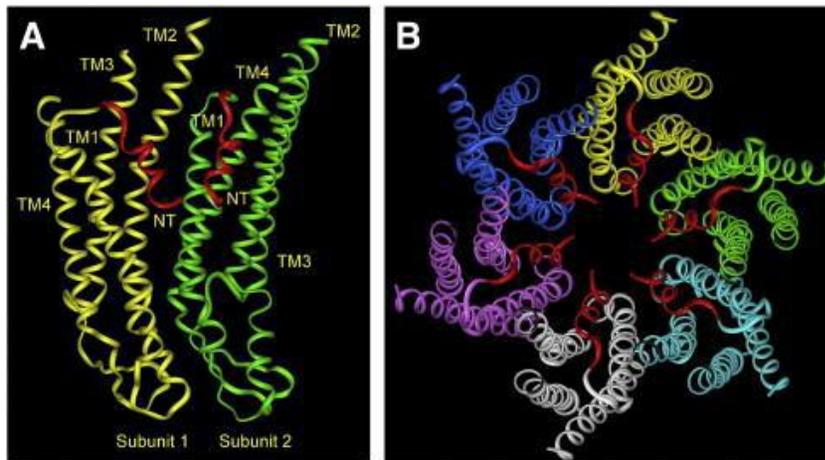


Figura 3 – Estrutura cristalográfica do conexon (PDB ID 2ZW3). A= Representação de duas subunidades de conexinas adjacentes, ilustradas em amarelo e verde, com os domínios amino terminais (NT) indicados em vermelho, e os quatro domínios transmembrânicos (TM1-TM4) identificados; B= Representação de seis subunidades de conexinas, ilustradas em diferentes cores, com seus domínios NT em vermelho, formando um hemicanal (Retirado de: Beyer *et al.*, 2011).

Para formar os canais intercelulares que constituem as *gap junctions*, os conexons de células adjacentes se unem covalentemente. Os conexons podem ser compostos por conexinas de somente um tipo, chamados homoméricos, ou de diferentes tipos, conhecidos como heteroméricos. Da mesma forma, os canais intercelulares podem ser homotípicos ou heterotípicos (Hilgert *et al.*, 2009b) (Figura 4).

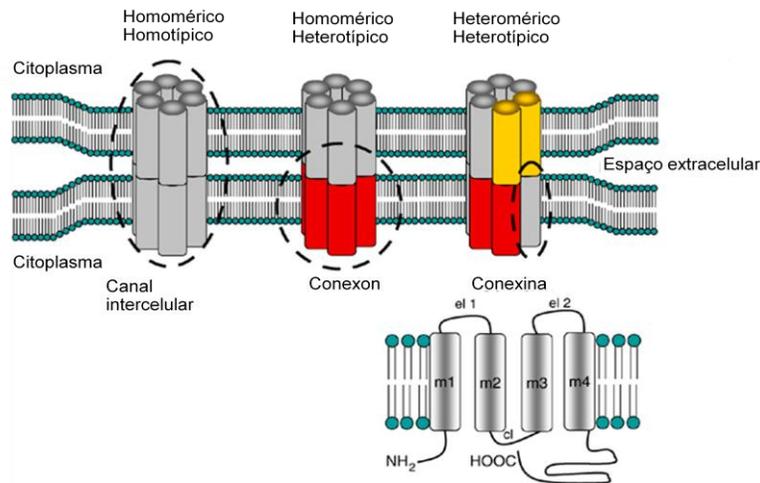


Figura 4 – Esquema mostrando diferentes tipos de canais intercelulares.

As comunicações intercelulares, mediadas pelas junções comunicantes, permitem a passagem direta de íons e pequenas moléculas entre o citoplasma das células e são fundamentais para homeostase dos tecidos, crescimento e diferenciação celulares (Willecke *et al.*, 2002).

O avanço dos estudos do genoma humano possibilitou a identificação de pelo menos 21 conexinas. Algumas apresentam maior expressão em determinadas células ou tecidos do que outras. Na epiderme e em seus anexos, nos epitélios da orelha interna e da córnea e em outros epitélios derivados do ectoderma, encontram-se cerca de dez conexinas diferentes, que são expressas

durante o mesmo período de desenvolvimento embrionário e diferenciação epitelial. Contudo, embora duas ou mais conexinas possam ser co-expressas na mesma célula nem sempre a perda da função de uma conexina alterada é compensada por outro membro da família.

Na cóclea, as conexinas são expressas entre as células de suporte das células sensoriais ciliadas, formando um caminho para reciclagem dos íons potássio (K^+) durante a transdução auditiva. Quando os íons potássio entram nas células ciliadas em resposta a estímulos acústicos, ocorre uma onda de despolarização que causa o influxo de íons cálcio e a liberação de neurotransmissores. O acoplamento elétrico facilita a homeostase, em parte, pelo transporte de íons potássio através das *gap junctions* e canais de potássio (Couloigner *et al.*, 2006). Os íons potássio se difundem, passivamente, pelas células de sustentação, pelos fibrócitos do ligamento espiral até a estria vascular e pelos fibrócitos do limbo espiral para as células interdentes, chegando à endolinfa através dos conexons. Além disso, essas junções também estão envolvidas no acoplamento metabólico (Beltramello *et al.*, 2005).

Alterações ocorridas no sistema *gap junction* podem interferir na reciclagem de potássio durante a transdução auditiva ou ainda, na troca de outros íons e pequenas moléculas. Essas alterações resultam em perda de função das células ciliadas e distúrbio do potencial elétrico endococlear ou na sobrevivência das células sensoriais do epitélio coclear levando a perda auditiva sensorioneural (Kikuchi *et al.*, 1995).

Conexinas alteradas representam a principal causa de perda auditiva de origem genética. Podem determinar a perda apresentando um padrão de herança autossômico recessivo (*GJB2* e *GJB3*) ou autossômico dominante (*GJB2*, *GJB3* e *GJB6*). Além disso, mutações nesses genes são responsáveis tanto por perda auditiva exibindo formas sindrômicas (*GJB2*, queratodermia palmoplantar; *GJB3*,

eritrodermia *variabilis*), quanto não-sindrômicas (*GJB2*, *GJB3* e *GJB6*) (Rabionet *et al.*, 2000).

Em relação ao grande avanço nos estudos de genes relacionados à surdez, sem dúvida alguma, a descoberta do gene *GJB2* no final do ano de 1997, que codifica a proteína conexina 26, representou o marco mais importante nessa área (Kelsell *et al.*, 1997). Este foi o primeiro gene nuclear relacionado à surdez não-sindrômica. Inicialmente não se imaginava seu grau de envolvimento na origem dos casos de surdez hereditária, principalmente aqueles com padrão de herança autossômico recessivo. Hoje, porém, sabe-se que esse gene está envolvido em 80% dos casos nos quais se observa esse padrão de herança, e que mutações no gene da conexina 26 também podem determinar surdez herdada de modo dominante (Denoyelle *et al.*, 1997). Além disso, uma mutação específica, a 35delG (deleção de uma guanina na posição 35 do gene) está envolvida em 70% dos casos de surdez com herança autossômica recessiva. Finalmente, acredita-se que mutações no gene da conexina 26 sejam responsáveis por 10 a 20% de todas as perdas auditivas neurosensoriais (Wilcox *et al.*, 2000).

A deleção 35delG no gene da conexina 26 não é rara; pelo contrário, sua presença em heterozigose pode ser encontrada em até 3% dos indivíduos em algumas populações. A pesquisa dessa mutação em 620 recém-nascidos de uma cidade do interior do Estado de São Paulo revelou a presença de 6 heterozigotos, o que permitiu estimar uma frequência de aproximadamente 1:100 (Sartorato *et al.*, 2000). Em um estudo recente, Oliveira e colaboradores (2004) determinaram a frequência da mutação 35delG em uma amostra bem caracterizada de afro-brasileiros (1:100), brasileiros caucasóides (1:50) e em brasileiros com ascendência asiática a mutação não foi detectada.

Pacientes homozigotos para 35delG geralmente apresentam uma perda auditiva pré-lingual, não progressiva, prevalentemente grave a profunda, contudo

o grau de perda pode variar entre os grupos estudados e até mesmo dentro de famílias afetadas (Denoyelle *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2005). Essa variabilidade sugere que outros fatores possam modificar os efeitos da mutação, possivelmente variações em outros genes de conexinas que compensariam a inatividade da conexina 26 na cóclea (Steel, 1999). Essas prováveis modificações dos efeitos da mutação poderiam também explicar o encontro de indivíduos surdos, que são monoalélicos para mutações no gene *GJB2*, com herança comprovadamente autossômica recessiva.

Uma das maiores dificuldades com relação ao diagnóstico molecular e aconselhamento genético de indivíduos portadores de mutações no gene da conexina 26, deve-se ao fato de que em aproximadamente 10 a 40% dos casos, mutações patogênicas nesse gene, com padrão de herança autossômico recessivo, são detectadas em apenas um dos alelos. Nesses casos, ao estudar o outro alelo do gene *GJB2*, nenhuma mutação é encontrada na região codificante.

Com o intuito de explicar a surdez associada a mutações em somente um dos alelos, várias hipóteses foram formuladas: (1) existência de mutações em regiões não codificantes do gene *GJB2*, afetando sua expressão; (2) mutações em outros genes (incluindo genes da família das conexinas) interagindo com o alelo normal do gene *GJB2* e, portanto, resultando no fenótipo deficiente. É possível, também, que haja interação entre genes nucleares e/ou mitocondriais, suprimindo a expressão do alelo normal (Wilcox *et al.*, 2000); (3) relação casual, e não causal, da mutação no gene *GJB2*, que não estaria, portanto, relacionado à surdez nesses casos. Em 2002, um grupo espanhol (Del Castillo *et al.*, 2002) explicou o fenótipo de surdez de parte desses casos, pois encontraram uma deleção próxima ao gene *GJB2*, envolvendo o gene vizinho, *GJB6*, segregando com a perda auditiva em diversas famílias.

O gene *GJB6* (GenBank 10804, OMIM #604418) codifica a proteína Cx30, e está localizado no loco DFNB1, a 35 kb do gene *GJB2* em direção ao telômero. Dentre os indivíduos portadores de mutações no gene *GJB2*, aproximadamente 10 a 40% apresentam-nas em apenas um dos alelos (Wilcox *et al.*, 2000). Desta forma, pesquisadores espanhóis buscaram justificativas em outro gene, da Cx30 (*GJB6*), encontrando duas deleções situadas no cromossomo 13, que se estendiam da região proximal do gene *GJB2* ao gene *GJB6*. Essas deleções foram denominadas del(*GJB6-D13S1830*) e del(*GJB6-D13S1854*), e referem-se à perda de 342 kb e 232 kb, respectivamente (Del Castillo *et al.*, 2002; Del Castillo *et al.*, 2005).

Em indivíduos espanhóis heterozigotos para mutações no gene da Cx26, 50% dos casos apresentam a del(*GJB6-D13S1830*) e 25% dos casos apresentam a del(*GJB6-D13S1854*). Ainda não está esclarecido se estes casos, que apresentam ambas as alterações, seriam um padrão complexo de herança digênica ou se haveria inativação do gene *GJB2* pela deleção de elementos regulatórios próximos a este gene (Del Castillo *et al.*, 2002; Del Castillo *et al.*, 2005).

Um estudo multicêntrico em colaboração com o grupo espanhol, revelou que a del(*GJB6-D13S1830*) foi encontrada em 25,5% dos pacientes brasileiros heterozigotos para mutações no gene da Cx26, e a del(*GJB6-D13S1854*) em 6,3% (Del Castillo *et al.*, 2003; Del Castillo *et al.*, 2005). Existe ainda um caso descrito de um paciente portador de uma grande deleção de pelo menos 920 kb que removeu os genes *GJB2* e *GJB6* (Feldmann *et al.*, 2009). Porém, uma porcentagem significativa de indivíduos heterozigotos para mutações no gene da Cx26 não possui nenhuma dessas grandes deleções, o que sugerem que devem existir outras mutações não identificadas presentes no loco DFNB1 (Hilgert *et al.*, 2009a).

Em 2010, foi descrita uma nova deleção, de 131,4 kb, no loco DFNB1, que evidencia a existência de uma região regulatória que controla a expressão dos genes *GJB2* e *GJB6*. A deleção cujo ponto de quebra dista mais de 100 kb dos genes *GJB2* e *GJB6*, foi encontrada em 4 indivíduos heterozigotos para a mutação c.35delG e que apresentavam expressão reduzida do RNAm de ambos os genes (Wilch *et al.*, 2010).

Outra deleção com tamanho em torno de 200 kb em DFNB1, que não envolve nem *GJB2* e nem *GJB6*, foi encontrada em pacientes heterozigotos para a mutação 35delG, sugerindo que essas deleções estejam eliminando um elemento regulatório essencial à expressão de *GJB2* na orelha interna (Del Castillo *et al.*, 2009).

Portanto, a pesquisa das deleções em *GJB6* está indicada principalmente em pacientes com perda auditiva que apresentam uma única mutação no gene *GJB2*.

Tendo em vista a importância e o envolvimento dos genes *GJB2* e *GJB6* na perda auditiva, o rastreamento de mutações no gene *GJB2* e de deleções no gene *GJB6* constituem o primeiro passo na triagem de mutações relacionadas à perda auditiva.

3.2. GENES MITOCONDRIAIS

Além de mutações em genes nucleares estarem envolvidas nos casos de surdez, alterações em genes mitocondriais também podem estar associadas à perda auditiva. As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas encontradas em todas as células dos mamíferos, e que têm a função de transformar a energia química dos metabólitos em energia facilmente acessível à célula. Essa energia é

acumulada, principalmente, em componentes como o trifosfato de adenosina (ATP), que será utilizado quando a célula necessitar de energia para trabalho osmótico, mecânico, elétrico ou químico (Alberts *et al.*, 2002).

Além de serem responsáveis pela síntese de ATP através da fosforilação oxidativa, as mitocôndrias também estão envolvidas em outras funções celulares como a apoptose e o controle do estresse oxidativo. Apresentam seu próprio DNA, o DNAm, responsável pela codificação de proteínas da cadeia respiratória mitocondrial e de componentes do complexo de síntese protéico (Xin Guan, 2004).

Em 1966, o DNAm foi descoberto (Nass, 1966; Sinclair & Stevens, 1966; Van Bruggen, 1966), sendo totalmente sequenciado em 1981 (Anderson *et al.*, 1981). Possui uma estrutura circular fechada, com 16.569 pb e 37 genes, sendo 13 genes de RNAm, 2 de RNAr e 22 de RNAt, específicos desta organela. O DNAm apresenta suas próprias características: é circular; semi-autônomo, isto é, possui sistema independente de replicação, transcrição e tradução do seu genoma, mas o mecanismo de reparo é dependente do DNA nuclear; e possui herança materna, porque as mitocôndrias presentes no espermatozóide estão localizadas na cauda deste, que não penetra no óvulo durante a fecundação (Howell *et al.*, 2000; Alberts *et al.*, 2002).

O DNAm não interage com histonas (ao contrário do DNA nuclear), apresentando assim maior instabilidade devido à falta de proteção, função desempenhada por estas proteínas. Além disso, está constantemente exposto a radicais livres devido à proximidade com a cadeia respiratória, e não possui um sistema de reparo próprio. Acredita-se que seja em decorrência desses fatores que a taxa de mutação do DNAm é maior do que no DNA nuclear (Brianti, 2003).

Pelo fato das mitocôndrias possuírem a função de disponibilizar energia para as células sob a forma de ATP, os órgãos que requerem grande quantidade

de energia são os mais comumente acometidos por mutações no DNAm, como as células nervosas, musculares, endócrinas, ópticas e auditivas. Essas mutações geralmente não ocasionam malformações, mas sim alterações funcionais nas células afetadas (Maillet, 2003).

Alterações em genes mitocondriais causam um amplo espectro de doenças genéticas, entretanto, um subconjunto de mutações só causa anormalidades na cóclea, podendo levar à perda auditiva não-sindrômica. Como a cóclea é um órgão com grande consumo de energia, mutações no DNAm das células ciliadas podem ocasionar deficiência auditiva do tipo neurossensorial progressiva bilateral, com variações no grau e na idade da manifestação (Wallace, 1992; Kokotas *et al.*, 2007).

Em 1993, foi descrita a primeira mutação mitocondrial associada à perda auditiva hereditária não-sindrômica (Fishel-Ghodsian *et al.*, 1993). Desde então várias alterações no DNAm foram identificadas, associadas tanto à surdez sindrômica quanto não-sindrômica (Finsterer & Fellingner, 2005).

O MITOMAP (<http://www.mitomap.org>) é uma base de dados do genoma mitocondrial humano, criada recentemente, que dá uma visão geral da maioria das mutações identificadas até o momento. Algumas mutações são associadas à perda auditiva não-sindrômica, estando envolvidas em pelo menos 1% das crianças com surdez pré-lingual e em pelo menos 5% dos casos pós-linguais em caucasianos (Kokotas *et al.*, 2007).

O gene *MTRNR1*, que codifica a subunidade 12S do RNA ribossômico (RNAr), e o *MTTS1*, que codifica RNAs transportadores de serina (RNAtSer(UCN)), são os principais genes associados à perda auditiva não-sindrômica de herança mitocondrial. Ambos são importantes para a síntese de proteínas mitocondriais (Kokotas *et al.*, 2007).

A primeira mutação mitocondrial a ser associada à surdez não-sindrômica foi a A1555G no gene *MTRNR1*, descrita em uma grande família árabe-israelense. Trata-se da substituição de uma adenina por uma guanina na posição 1555 do gene (Prezant *et al.*, 1993). Essa mutação também está associada à susceptibilidade à perda auditiva induzida por aminoglicosídeos, devido à semelhança entre a subunidade 12S do RNAr humano que apresenta a mutação e seu homólogo, a subunidade 16S do RNAr bacteriano, o alvo destes antibióticos (Prezant *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 2010). A frequência da mutação mitocondrial A1555G foi estimada em 2% na população brasileira (Abreu-Silva *et al.*, 2006).

Os fenótipos clínicos podem variar consideravelmente nos indivíduos que apresentam mutações em genes mitocondriais, o que pode ocorrer de acordo com o número de mitocôndrias contendo mutações, que pode ser diferente dependendo do tecido do corpo (heteroplasmia) (Kobayashi *et al.*, 2005; Zu-jian *et al.*, 2009).

Estudos morfológicos, bioquímicos e moleculares demonstram que a fosforilação oxidativa normalmente declina com a idade. Além disso, deleções no DNAm_t têm sido encontradas em uma variedade de tecidos humanos, com idade avançada, e em tecidos de pacientes com doenças degenerativas. É fato que a perda auditiva, com o avançar da idade, está associada a mutações mitocondriais (Fishel-Ghodsian *et al.*, 1997; Pickles, 2004).

Dessa maneira, para descartar as principais causas de perda auditiva, a mutação A1555G também fez parte do rastreamento inicial neste trabalho.

4. ASPECTOS GERAIS DA SÍNDROME DE PENDRED

A síndrome de Pendred consiste em uma doença hereditária com padrão de herança autossômico recessivo caracterizada por perda auditiva sensorineural, bócio e defeito na organificação do iodeto na tireóide. A associação de surdez e bócio foi primeiramente descrita em 1896 por Vaughan Pendred (Pendred, 1896). Mais tarde, Morgans e Trotter demonstraram que pacientes com Síndrome de Pendred possuíam um defeito parcial na organificação do iodo (Morgans e Trotter, 1958).

A surdez na síndrome de Pendred é grave a profunda, pré-lingual e, algumas vezes progressiva (Cremers *et al.*, 1998). Está associada a malformações da orelha interna, que variam desde um alargamento do aqueduto vestibular a displasia de Mondini e podem ser detectadas por meio de tomografia computadorizada ou ressonância magnética (Fugazzola *et al.*, 2000; Reardon *et al.*, 1997).

O aqueduto vestibular é um canal ósseo estreito. Através deste canal ósseo existe um tubo denominado ducto endolinfático que conecta a orelha interna a uma estrutura em forma de balão, denominada saco endolinfático. Sabe-se que tanto o ducto quanto o saco endolinfático são preenchidos por um fluido denominado endolinfa. Sua composição iônica é fundamental para a transdução mecanoelétrica que ocorre na orelha interna, sendo, portanto, fundamental para o funcionamento normal da audição. O aqueduto vestibular é considerado alargado se apresentar diâmetro maior que 1,5 milímetros, o que chamamos de EVA (*enlarged vestibular aqueduct* – aqueduto vestibular alargado). O aqueduto alargado resulta no aumento de tamanho do ducto e saco endolinfático (Figura 5). Nesses casos, é possível que a proteína Pendrina, codificada pelo gene *SLC26A4* (gene envolvido nos casos de Síndrome de Pendred – OMIM: 605646), esteja

alterada, mudando a composição iônica da endolinfa e interferindo no bom funcionamento da audição (Wangemann et al.2007). Vale ressaltar que o aqueduto vestibular alargado é a malformação mais comum da orelha interna associada à perda auditiva (Pinto *et al.*, 2005; Preciado *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008).

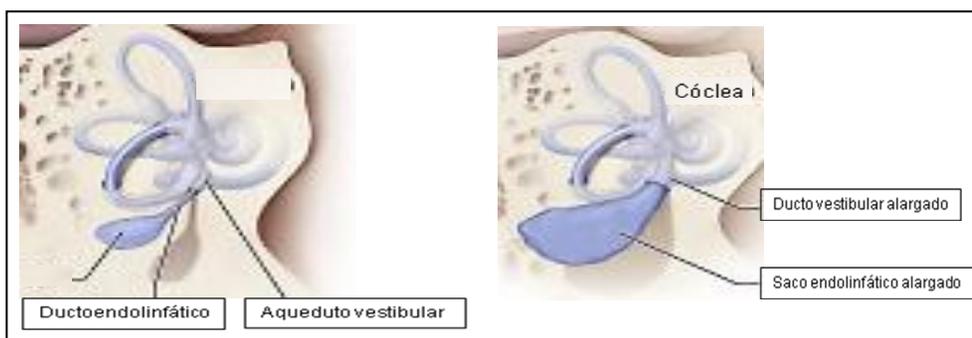


Figura 5 – Comparação entre orelha interna normal e orelha interna com aqueduto vestibular alargado.

Na síndrome de Pendred a apresentação de bócio é inconstante. Frequentemente o bócio se desenvolve na infância e pode variar de nenhum alargamento da tireóide até largos bócios (Fraser, 1965; Fraser, *et al.*, 1960). Quando avaliados com teste de perclorato, todos os pacientes com mutações bialélicas no gene *SLC26A4* apresentavam defeito na organificação do iodeto, independente da presença ou ausência de bócio (Pryor, 2005).

Com o aumento do número de genes relacionados à perda auditiva, verificou-se que um mesmo gene pode resultar em diferentes tipos de surdez, ou seja, sindrômica ou não sindrômica. Mutações no gene *SLC26A4* podem resultar em síndrome de Pendred ou em surdez sensorineural não-sindrômica associada ao alargamento do aqueduto vestibular (Everett *et al.*, 1997). Além disso, o gene

SLC26A4 é o segundo gene mais envolvido nos casos de surdez não-sindrômica, seguido pelo gene *GJB2* (Denoyelle *et al.*, 1997). Dados epidemiológicos mostram que alterações neste gene devem representar aproximadamente 10% da perda auditiva hereditária (Fraser, 1965).

4.1. O GENE *SLC26A4* E A PROTEÍNA PENDRINA

O gene responsável pela Síndrome de Pendred – *SLC26A4* – foi localizado no cromossomo 7q22.3-q31.1 por estudo de ligação em 1996 (Sheffield *et al.*, 1996; Coyle *et al.*, 1996). O gene foi identificado por clonagem posicional em 1997 e possui 21 exons, dos quais 20 codificam uma proteína denominada Pendrina (Everett *et al.*, 1997). A Pendrina é uma proteína de membrana altamente hidrofóbica que consiste em 780 aminoácidos (86kD) e pertence à família 26A de proteínas transportadoras de ânions como iodeto, formiato, nitrato e bicarbonato (Scott *et al.*, 1999), sendo abundantemente expressa na tireóide, orelha interna rins e vias aéreas (Everett *et al.*, 1999; Scott e Karniski, 2000; Royaux *et al.*, 2000; Nofziger *et al.*, 2011).

Informações estruturais a respeito da topologia da membrana da proteína pendrina ainda são limitadas na literatura. Enquanto Everett e colaboradores (1997) sugeriram um modelo de 11 segmentos transmembrânicos (TM) com a extremidade carboxiterminal (C) na região extracelular utilizando o programa PHDhtm (programa de predição da região de hélices transmembrânicas), Royaux *et al.* (2000) sugeriram um modelo de 12 segmentos TM com a extremidade carboxiterminal na região citoplasmática. Um modelo semelhante ao de Royaux de 12 TM é sugerido na página inicial de Pendred/BOR (<http://www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor/domains.htm>), utilizando o programa MEMSAT (programa de predição de topologia e estrutura de proteínas de membrana, Zhai & Saier 2001; Figura 6a). Este programa, no entanto, prevê um segmento adicional de 13 TM localizado no domínio transportador de sulfato e

antagonista de fatores anti-sigma (STAS) do *SLC26A4* (Aravind e Koonin, 2000), uma sequência altamente semelhante ao antagonista de fatores anti-sigma de bactérias. Acredita-se que esta sequência esteja envolvida na ligação e/ou hidrólise de NTP (nucleosídeo trifosfato). Aravind & Koonin (2000) postulam que o domínio STAS em membros da família SLC26 poderia possivelmente regular o transporte de ânions pelo fato de identificar concentrações intracelulares de GTP (guanosina trifosfato) e/ou ATP (adenosina trifosfato). Além disso, foi levantada a hipótese de que o domínio STAS estaria envolvido na interação de membros da família SLC26 com o regulador transmembrana da fibrose cística (CFTR) (Ko *et al.* 2002); Porém, a função exata deste domínio ainda é incerta. O domínio TM 13 poderia trazer a extremidade carboxiterminal para a região extracelular, havendo, portanto, contraste com os dados experimentais fornecidos por Gillam e colaboradores (2004), e, por conseguinte, provavelmente o modelo de 12 TM utilizando o programa MEMSAT seria ignorado. Dossena *et al.* (2009) mostraram outro modelo de *SLC26A4*, utilizando o programa de predição MEMSAT como ponto de partida e, em seguida, aperfeiçoaram o modelo de acordo com Sweet & Eisenberg (1983), e Shafrir & Guy (2004). Neste modelo, o *SLC26A4* seria formado por até 15 segmentos TM helicoidais (Figura 6b). Os segmentos TM anfipáticos marcadas são os mais ambíguos em termos de sua localização, podendo ser transmembranares, citosólicos ou extracelulares. No entanto, uma vez que a homologia da sequência dos segmentos entre espécies diferentes é muito elevada, pode-se presumir que estes segmentos possam efetivamente formar hélices TM ao contrário de hélices localizados em ambas as superfícies da membrana. No entanto, são necessários experimentos mais rigorosos para distinguir entre as diferentes possibilidades. Assumindo que a extremidade carboxiterminal esteja localizada dentro do citosol, a extremidade aminoterminal teria que estar localizada na região extracelular em ambos os modelos de 13 TM (menos as duas hélices anfipáticas) e de 15 TM. Esta suposição está em contraste direto com o modelo sugerido por Gillam, em que o grupo aminoterminal está

localizado dentro do citosol (Gillam e col. 2004). Mais uma vez, todos os modelos de *SLC26A4* propostos até agora, incluindo o modelo de Dossena (2009), são especulativos e não têm evidência experimental, sendo necessários experimentos mais precisos para determinar inequivocamente a estrutura secundária e terciária de *SLC26A4*.

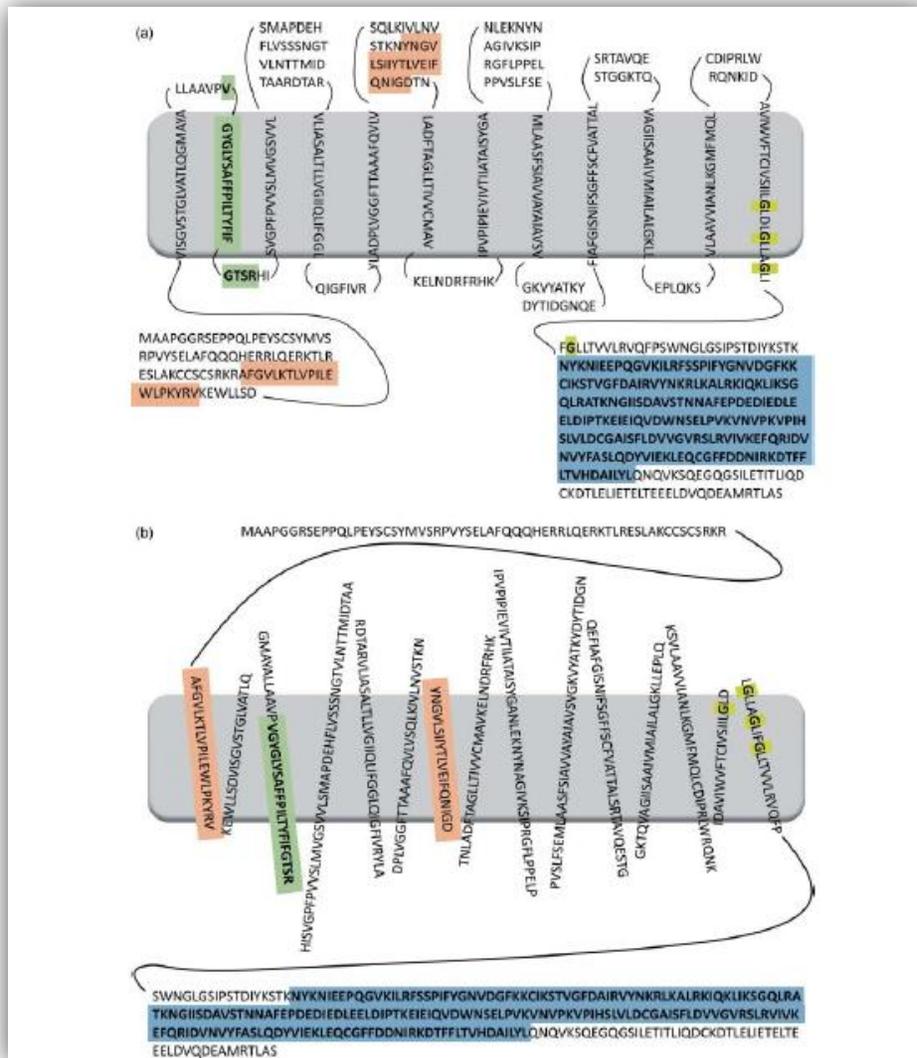


Figura 6 – Modelos da topologia da Pendrina humana. (a) Modelo de 12 domínios TM descrito na homepage Pendred/BOR (<http://www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor/domains.htm>) utilizando o programa MEMSAT. (b) Modelo de 15 domínios TM proposto por Dossena e colaboradores (2009). A extremidade aminoterminal neste modelo está localizada na região extracelular e a extremidade carboxiterminal na região citoplasmática. Os 15 segmentos TM são descritos como trechos de aminoácidos que atravessam a membrana, o que é mostrado em cinza.

Vários estudos exploraram a expressão e a função de Pendrina na orelha interna. No desenvolvimento da orelha interna do camundongo, o mRNA do gene *SLC26A4* é expresso em áreas discretas do ducto e do saco endolinfático, o utrículo e o sáculo (Everett *et al.*, 1999). Estas regiões da orelha interna são importantes na manutenção da composição iônica da endolinfa, a qual é um pré-requisito para a função normal da orelha interna. A criação de um camundongo *Pendrina-knockout* foi capaz de fornecer a ferramenta necessária para uma melhor compreensão do papel da Pendrina na orelha interna e dos mecanismos subjacentes à surdez na Síndrome de Pendred (Everett *et al.*, 2001). Os camundongos *SLC26A4*-deficientes se revelaram completamente surdos e mostraram um fenótipo vestibular com inclinação da cabeça, andar instável, circulando, atingindo, portanto, uma resposta anormal (Everett *et al.*, 2001). Anatomicamente, a orelha interna destes animais se desenvolve normalmente até o dia embrionário 15, após o qual um número de defeitos são observados, incluindo a dilatação do ducto e saco endolinfáticos, degeneração das células sensoriais, e malformação da otoconia e de membranas otoconiais (Everett *et al.*, 2001).

Ensaio funcionais da proteína Pendrina com diferentes variantes alélicas encontradas em pacientes com síndrome de Pendred ou surdez não-sindrômica associada à EVA revelaram que a patologia está associada à redução ou perda da função da atividade da Pendrina (Taylor *et al.*, 2002). Mais de 200 mutações no gene da Pendrina já foram identificadas até o momento (<http://www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor/slcMutations.htm>), porém a caracterização funcional está disponível para a minoria delas (Dossena *et al.*, 2011). Além da avaliação clínica e radiológica, o sequenciamento do gene *SLC26A4* é essencial para obter o diagnóstico definitivo da síndrome de Pendred e surdez não-sindrômica associada ao EVA (Fugazzola *et al.*, 2000). Além disso, nos casos em que mutações na região codificante do gene *SLC26A4* são detectadas, o diagnóstico

pode ser confirmado por meio do teste funcional da respectiva variante alélica. De fato, a condição clínica da síndrome pseudo-Pendred (Fugazzola *et al.*, 2002; Kara *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2006; Pfarr *et al.*, 2006) e a alta incidência de polimorfismos benignos na Pendrina em algumas populações (Pera *et al.*, 2008) poderia levar a uma definição incorreta da causa genética da doença. Polimorfismos na pendrina de um único nucleotídeo são continuamente detectados e reportados no banco de dados (dbSNPs) do *NCBI*.

Ensaio funcionais têm demonstrado que diferentes mutações no gene *SLC26A4* apresentam diferentes efeitos sobre a atividade transportadora da proteína Pendrina (Pera *et al.*, 2008). Além disso, ao passo que o número de domínios transmembrânicos da Pendrina ainda é incerto na literatura (Dossena *et al.*, 2009), está claro que algumas mutações afetam a localização sub-celular da Pendrina de modo que a Pendrina não consegue atingir a membrana citoplasmática (Brownstein *et al.*, 2008). Dessa forma, o efeito variável de cada mutação na função, expressão e localização celular da Pendrina pode explicar parte da heterogeneidade clínica observada entre os indivíduos afetados. Ao longo dos anos, uma longa lista de mutações descritas no gene *SLC26A4* relacionadas à surdez foi publicada na literatura (Park *et al.*, 2003). Porém, apesar de grandes esforços em prever o efeito clínico dessas alterações na sequência do gene *SLC26A4*, a correlação genótipo-fenótipo ainda não está completa. A estrutura complexa de pendrina como uma proteína transmembrânica limita a capacidade de prever fielmente o efeito completo de uma única mutação. No futuro, a Pendrina cristalizada poderá fornecer a possível ligação entre o genótipo encontrado e a gravidade do fenótipo.

Embora o rastreamento de mutações no gene *SLC26A4* forneça diretamente o diagnóstico molecular de pacientes com síndrome de Pendred ou surdez não-sindrômica associada ao EVA, ainda existem diversos problemas não

resolvidos que limitam as deduções clínicas. Primeiramente, como o padrão de herança observado é autossômico recessivo, nenhuma ou apenas uma alteração no gene *SLC26A4* pode ser identificada em inúmeras famílias, resultando em incertezas no esclarecimento da patologia e no aconselhamento genético dessas famílias. Além disso, fatores ambientais ou outros fatores genéticos podem estar envolvidos na expressão da doença de forma a confundir a correlação entre genótipo e fenótipo associado ao gene *SLC26A4*, impedindo, portanto, a predição do prognóstico por meio do diagnóstico genético (Azaiez *et al.*, 2007; Pryor *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2005).

4.2. GENE *FOXI1*

Em 2003, Hulander e colaboradores realizaram um trabalho que revelou que o fenótipo descrito na síndrome de Pendred e o observado em camundongos *FOXI1*^{-/-} apresentavam claras semelhanças. Dessa forma, estes pesquisadores buscaram explicação molecular para as conclusões morfológicas e fisiológicas observadas em camundongos *foxi1*^{-/-}. Usaram uma sonda PDS cRNA de camundongo para experimentos de hibridização em pontos específicos do tecido da orelha interna no tipo selvagem e em mutantes. Os padrões de expressão do tipo selvagem dos genes Pds e *foxi1* se mostraram muito semelhantes, sendo dispersos no epitélio do ducto e saco endolinfáticos. Nesta fase de desenvolvimento, a expressão do gene *foxi1* é restrita ao epitélio do ducto e saco endolinfáticos, enquanto o gene Pds é expresso também no sulco externo da cóclea, bem como junto ao máculas do sáculo e utrículo. Em mutantes *foxi1*^{-/-} houve uma completa ausência de expressão do gene Pds no epitélio do ducto e saco endolinfáticos e os camundongos *foxi1*^{-/-} apresentaram surdez e ducto e saco endolinfático dilatados. É interessante notar que apenas em locais onde a expressão dos genes *foxi1* e Pds se sobrepõem, é que se pode demonstrar a falta

de expressão gênica do Pds, ou seja, no epitélio do ducto e saco endolinfáticos. Apesar da morfologia alterada da cóclea e utrículo em camundongos *foxi1*^{-/-}, a expressão do Pds pode ser demonstrada nestes locais.

Estes achados sugerem que o gene *FOX11* é um regulador transcricional da Pendrina e ainda apoia o papel da Pendrina na manutenção da composição e do balanço da endolinfa na orelha interna. Com base nessa observação, existe a hipótese de que mutações no gene *FOX11* possam causar síndrome de Pendred em humanos. Evidentemente que a identificação de mutações nos genes *SLC26A4* e *FOX11* e suas associações a diferentes fenótipos, típicos ou não, comuns na síndrome de Pendred poderão facilitar e esclarecer as relações genótipo-fenótipo, assim como o diagnóstico da síndrome de Pendred e da surdez sensorineural não sindrômica associada ao EVA. Portanto, a região codificante do gene *FOX11* será rastreada a fim de verificar esta possível digenia.

4.3. GENE *KCNJ10*

Além de trabalhos envolvendo o gene *FOX11*, estudos adicionais revelaram que camundongos Pendrina-*knockout* não possuíam o potencial endococlear necessário para o funcionamento normal da audição como resultado de uma perda de expressão dos canais de potássio *KCNJ10* (Wangemann *et al.*, 2004). Além disso, foi visto que o prejuízo da troca de íons mediada pela Pendrina na orelha interna levava à acidificação da endolinfa, resultando na inativação de dois canais de cálcio apical (TRPV5 e TRPV6) (Nakaya *et al.*, 2007). A inativação desses canais que regulam a absorção de cálcio no sistema vestibular leva ao aumento da concentração de cálcio na endolinfa (Nakaya *et al.*, 2007). A escala média de camundongos *SLC26A4*^{-/-} é alargada e seu desenvolvimento coclear é atrasado (Wangemann *et al.*, 2009). Além disso, a expressão das desidases tipo

2 e 3 (Dio2, Dio3), que controlam os níveis do hormônio tireoideano 3,5,3'triiodotironina (T3) ativo, bem como de genes reguladores de T3 como Tectorin B (Tectb), ocorre mais tarde no desenvolvimento. Embora os níveis sistêmicos de hormônios da tireóide terem sido normais em camundongos *SLC26A4*^{-/-}, tem sido sugerido que estes resultados poderiam indicar hipotireoidismo local que poderia estar causalmente envolvido no desenvolvimento tardio da cóclea (Wangemann *et al.*, 2009). Para analisar se realmente há um padrão digênico, os pacientes serão rastreados quanto à presença de alterações na região codificante do gene *KCNJ10*.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo inicial avaliar a ocorrência de mutações nos genes *SLC26A4*, *FOX11* e *KCNJ10* em indivíduos brasileiros portadores de perda auditiva sensorioneural, associada ou não a alterações no aqueduto vestibular. E, desta maneira, esclarecer a prevalência de mutações nestes genes em amostras da população brasileira e a correlação genótipo-fenótipo nos indivíduos estudados e, assim, tentar obter novas informações a respeito dos genes envolvidos.

OBJETIVOS

- **Objetivos Gerais**

Avaliar a ocorrência de mutações nos genes relacionados à Síndrome de Pendred em indivíduos com surdez, associada ou não a alterações no aqueduto vestibular e estudo funcional da proteína Pendrina com alterações no gene *SLC26A4*.

- **Objetivos específicos**

1. Rastreamento de mutações em regiões codificantes dos genes *SLC26A4*, *FOXI1* e *KCNJ10*;
2. Rastreamento de mutações na região promotora do gene *SLC26A4*;
3. Realização da análise funcional e da co-localização celular da proteína Pendrina com variações alélicas não descritas na literatura ou até mesmo descritas, porém ainda não caracterizadas funcionalmente.

METODOLOGIA

1. CASUÍSTICA

A casuística deste trabalho consistiu de 60 indivíduos com surdez sensorineural atendidos no Ambulatório de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Primeiramente, os pacientes passaram por avaliação clínica detalhada no Departamento de Otorrinolaringologia do HC – UNICAMP, incluindo exames audiológicos e exames de imagem (tomografia computadorizada e ressonância magnética). Posteriormente, foram coletadas amostras de sangue de cada paciente e encaminhadas diretamente ao Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP, onde foram realizados os exames genéticos.

Considerando que os 60 indivíduos que fazem parte deste trabalho apresentam perda auditiva, os pacientes foram divididos em dois grupos (I e II) segundo a presença ou ausência da manifestação clínica de aqueduto vestibular alargado:

- Grupo I – 30 indivíduos que apresentam perda auditiva **sem** alargamento do aqueduto vestibular;
- Grupo II – 30 indivíduos que apresentam perda auditiva **com** alargamento do aqueduto vestibular.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, sob Nº 396/2006 (Anexo 2). Todos os pacientes incluídos nesta amostra tiveram a sua participação previamente autorizada, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3), após terem recebido esclarecimento sobre o estudo a ser realizado.

2. DIAGNÓSTICO CLÍNICO DA PERDA AUDITIVA

As etapas envolvidas no diagnóstico clínico da perda auditiva foram realizadas no Departamento de Otorrinolaringologia do HC – UNICAMP, por profissionais da área de Otorrinolaringologia e Fonoaudiologia.

Primeiramente foi realizada avaliação médica, que incluiu história clínica detalhada, histórico familiar, exame clínico, identificação de fatores de risco para a perda auditiva e observação de síndromes associadas.

O estudo compreendeu a investigação da etiologia da perda auditiva, a avaliação das condições físicas, e a recomendação de tratamento médico clínico ou cirúrgico, bem como a indicação para outros serviços, quando necessário.

Os pacientes foram então encaminhados para a avaliação audiológica, e os seguintes exames foram realizados:

Audiometria Tonal Limiar; -Logaudiometria: limiar de reconhecimento de fala (LRF) e índice de reconhecimento de fala (IRF); -Medidas de Imatância Acústica: timpanometria e pesquisa dos reflexos acústicos estapedianos; -Emissões Otoacústicas Evocadas: transientes e produto de distorção; -Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (PEATE).

Quanto ao grau, a perda auditiva foi avaliada pela média dos limiares tonais nas frequências de 500, 1000 e 2000 Hz, segundo a classificação proposta por Davis & Silvermann (1970). De 26 a 40 dB, a perda auditiva, foi considerada leve; de 41 a 70 dB, moderada; de 71 a 90 dB, grave; e acima de 90 dB, profunda. A avaliação foi baseada no exame audiológico mais recente.

Os indivíduos também foram submetidos a exames de imagem, sendo realizados tomografia computadorizada e ressonância magnética.

Exames laboratoriais foram solicitados em casos específicos, baseado na história clínica dos pacientes, sendo solicitados os seguintes exames:

- Hemograma completo; Dosagem de sódio e potássio; Uréia e creatinina; Função tireoidiana (TSH e T4 livre); Colesterol total e frações; Triglicerídeos; Sorologias para sífilis (FTABs); Citomegalovírus (IgG); Toxoplasmose (IgG); Rubéola (IgG); Caxumba (IgG).

Posteriormente, foram coletadas amostras de sangue dos pacientes e enviadas diretamente ao Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG-UNICAMP, onde foi realizada a análise genética (resumida na Figura 7).

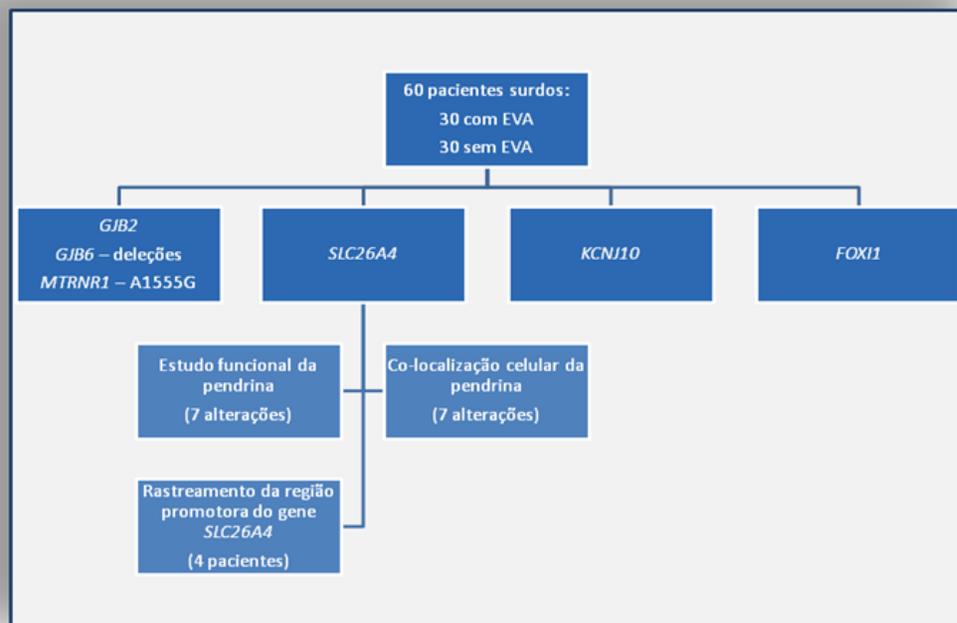


Figura 7 – Resumo da metodologia realizada neste trabalho. Os 60 pacientes foram rastreados quanto à presença de alterações no gene *GJB2*, deleções no gene *GJB6* e mutação mitocondrial A1555G. Além disso, as regiões codificantes dos genes *SLC26A4*, *FOX11* e *KCNJ10* também foram rastreadas e a região promotora do gene *SLC26A4*. Por fim, foram realizados o estudo funcional e de co-localização celular da proteína Pendrina.

3. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE SANGUE PERIFÉRICO

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de leucócitos obtidos em 10 a 15 ml de sangue periférico coletado em tubos Vacutainer contendo EDTA (etilenediaminotetracetato dissódico.2H₂O) 10%, de acordo com o protocolo adaptado no laboratório de Genética Molecular Humana – CBMEG.

Inicialmente, para lise das hemácias, foi adicionada solução A (Triton-X 100 a 1%; MgCl₂ 5 mM; Sacarose 0,32 M; Tris-HCl 10 mM pH 8,0) ao sangue coletado até o volume total de 50 mL. Após ser homogeneizado, o material foi mantido a temperatura de 4°C por 30 minutos. Passado esse tempo o material foi centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (pellet) foi ressuscitado em 35 mL de Solução A. Esse procedimento foi repetido por três vezes até a obtenção de pellet de cor clara, livre de hemácias lisadas. Tal pellet foi então ressuscitado em 1 mL de solução B 1X (Na₂EDTA 20 mM; NaCl 20 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0) e 250 µL de solução C (para 1 mL de solução C: 0,5 mL de solução B, 1 mg de Proteinase K [Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanha] e 0,5 mL de SDS 10%). Essa solução foi incubada em banho-maria a 56°C por aproximadamente 2 horas. Em alguns casos esse período de incubação foi de 18 horas a 37°C em banho-maria.

Após a incubação, foi iniciada a etapa de purificação do DNA genômico com fenol-clorofórmio para remoção de peptídeos e proteínas da solução aquosa. Foi então adicionado 1 mL de TE 1x (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e o dobro do volume da amostra de fenol saturado com Tris-HCl 1 mM pH 8,0. A amostra foi homogeneizada por inversão lenta do tubo durante 5 minutos. Para separação e recuperação da fase aquosa (sobrenadante) o tubo foi centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. O procedimento foi repetido por

duas vezes, primeiramente substituindo o fenol pela solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v:v:v) e por fim foi usada a solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v:v).

Para precipitação do DNA, foi acrescentado 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,5 e 2,5 volumes de etanol absoluto a 4°C à fase aquosa. O DNA precipitado foi recuperado com auxílio de uma haste plástica esterilizada. Em seguida, o DNA foi lavado com etanol 70% para retirada do excesso de sal e ressuspendido em 200 µL de TE 1x.

A partir do DNA extraído, inicialmente os pacientes dos dois grupos foram rastreados quanto à presença de mutações no gene *GJB2*, deleções envolvendo o gene *GJB6* e mutação mitocondrial A1555G no gene *MTRNR1*, as quais representam as principais causas de surdez de origem genética.

4. DETECÇÃO DA MUTAÇÃO 35DELG NO GENE *GJB2*

A mutação 35delG localizada no gene *GJB2* foi rastreada pela técnica de PCR alelo-específico (AS-PCR) utilizando ARMS *primers* (do inglês Amplification Refractory Mutations System) para a detecção de mutações de ponto. Esta técnica foi desenvolvida no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG, a qual se encontra patenteada (Patente Nº P10005340-6; Método de teste para surdez de origem genética – UNICAMP, 2002).

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e na análise dos resultados no gel, a presença de uma banda apenas na reação normal, indica que o indivíduo não apresenta a mutação 35delG em nenhum dos alelos. Por outro lado, a presença de uma banda apenas na reação mutante indica um indivíduo homocigoto mutante para a alteração em questão.

Por fim, a presença de uma banda na reação mutante e uma banda na reação normal aponta para um indivíduo heterozigoto para a mutação 35delG.

4.1. RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE *GJB2*

O gene *GJB2* apresenta apenas um exon codificante (exon 02) que é amplificado pela técnica de PCR e analisado por sequenciamento. Para a amplificação do fragmento do gene *GJB2* foram utilizados *primers* evidenciados na Tabela 4. O exon 02 deste gene (745pb) foi dividido em duas partes (332pb e 547pb, respectivamente).

Tabela 4 – Sequências de *primers* utilizadas para a amplificação da região codificante do gene *GJB2*.

<i>Primers 5' – 3'</i>	Tamanho (pb)
Cx261F – CTCCCTGTTCTGTCCTAGC	332
Cx261R – GACACGAAGATCAGCTGC	
Cx262F – GCTACGATCACTACTTCCC	547
Cx262R – GGTTGCCTCATCCCTC	

Legenda: F: *primer* direto (do inglês forward); R: *primer* reverso (do inglês reverse); pb: pares de bases.

A amplificação do gene *GJB2* consistiu de 30 ciclos usando 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e reverso), 2,5 U de enzima Taq DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8) e 1,5 mM de MgCl₂, completando com água deionizada para um volume final de reação de 50 µL.

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), sendo realizados 35 ciclos de aquecimento a 94°C para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 60°C para o anelamento dos *primers*, e então de 72°C para a extensão das novas fitas. As condições da PCR estão resumidas na Figura 8.

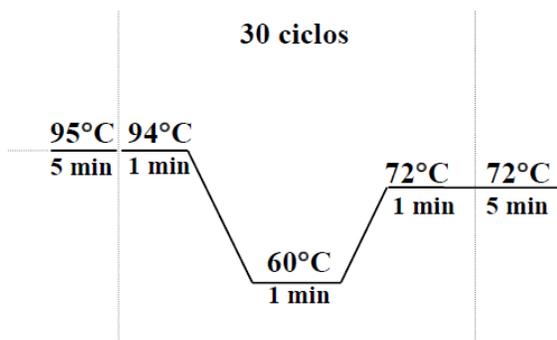


Figura 8 – Ciclos de amplificação para rastreamento de mutações na região codificante do gene *GJB2*.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O gel foi corado em solução diluída de Brometo de Etídio (0,5 g/mL) durante 20 minutos, sendo visualizado em transluminador de luz ultravioleta e fotografado com câmera digital EDAS-Kodak. Em seguida, foi realizada a reação de sequenciamento do produto de PCR.

4.1.1. RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE *GJB2* POR SEQUENCIAMENTO

4.1.1.1. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Primeiramente, os fragmentos amplificados pela técnica de PCR foram purificados utilizando-se o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega). Após a purificação, a quantidade e a pureza das amostras de DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop® ND-8000 (Thermo Scientific).

4.1.1.2. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO PARA PRODUTO DE PCR

As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador automático ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer utilizando-se o BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Para o preparo das reações foram utilizados: 40 a 80 ng de DNA, 1 µL do mix BigDye™, 1 µL do *primer* direto ou reverso (5 pmol/µL) e água deionizada para completar o volume de 10 µL. As condições de amplificação estão especificadas na Figura 9.

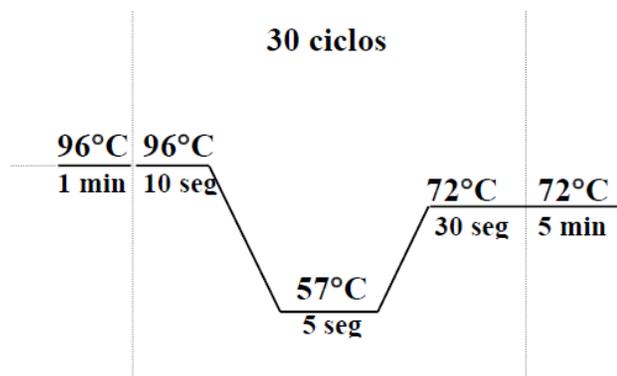


Figura 9 – Ciclos de amplificação para posterior sequenciamento do gene *GJB2*.

Após a amplificação, as reações de sequenciamento foram purificadas. Primeiramente foram adicionados 80 µL de etanol 80%, sendo a placa centrifugada por 45 min a 3.700 rpm. O etanol foi descartado e, posteriormente, foram adicionados 150 µL de etanol 70%. Foi realizada uma nova centrifugação, por 10 min a 3.700 rpm, sendo o etanol novamente descartado.

As reações foram mantidas à 20 °C até o momento da colocação da placa no aparelho ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer. Antes da colocação da placa no sequenciador, foram adicionados 10 µL de formamida e a placa foi homogeneizada e em seguida centrifugada rapidamente. A amostra foi desnaturada (5 min a 95 °C) e em seguida colocada à temperatura de 4°C por 10min.

4.1.1.3. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio dos softwares Chromas Lite 2.01 e CLC Sequence Viewer 6.1.

5. DETECÇÃO DAS DELEÇÕES $\Delta(GJB6-D13S1830)$ E $\Delta(GJB6-D13S1854)$ NO GENE *GJB6*

O rastreamento das deleções $del(GJB6-D13S1830)$ e $del(GJB6-D13S1854)$ foi realizado de acordo com os protocolos previamente descritos por Del Castillo *et al.*, 2005. A investigação das mutações foi realizada por meio de PCR Multiplex, no qual é possível investigar a presença de ambas as deleções em apenas uma reação. As sequências dos *primers* são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5 – Sequências dos *primers* utilizados na triagem das deleções $del(GJB6-D13S1830)$ e $del(GJB6-D13S1854)$.

Posição	Primer 5' – 3'
ponto de quebra da $del(GJB6-D13S1830)$	Del1F – TTTAGGGCATAGTTGGGGTGATTT Del 1R - CACCATGCGTAGCCTTAACCATTTT
ponto de quebra da $del(GJB6-D13S1854)$	Del2F – TCATAGTGAAGAACTCGATGCTGTTT Del2R - CAGCGGCTACCCTAGTTGTGGT
Controle interno da reação (exon 1 do gene <i>GJB6</i>)	ControleF – CGTCTTTGGGGGTGTTGCTT ControleR - CATGAAGAGGGCGTACAAGTTAGAA

Legenda: F = *primer* direto (do inglês forward); R = *primer* reverso (do inglês reverse).

Os fragmentos de DNA resultantes da amplificação contêm os pontos de quebra de ambas as deleções (Figura 10). Dessa forma, um fragmento interno de 333pb é utilizado como controle para checar a eficiência da reação e distinguir os alelos heterozigotos e homozigotos para qualquer uma das duas deleções.

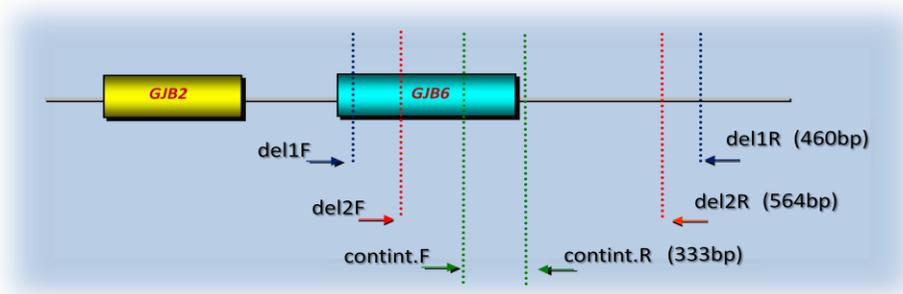


Figura 10 – Fragmentos a serem gerados na identificação de deleções $del(GJB6-D13S1830)$ e $del(GJB6-D13S1854)$. Legenda: F = *primer* direto (do inglês forward); R = *primer* reverso (do inglês reverse); bp = pares de bases (do inglês bases pairs).

Para a realização da PCR Multiplex foram utilizados 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e inverso), 2,5 U de Taq DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 25 mM de MgCl₂ e água deionizada até completar o volume final de 30 μ L. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Foram então realizados 35 ciclos de aquecimento a 95°C para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 62°C para o anelamento dos *primers*, e então de 72°C para a extensão das novas fitas. As condições da PCR estão resumidas na Figura 11.

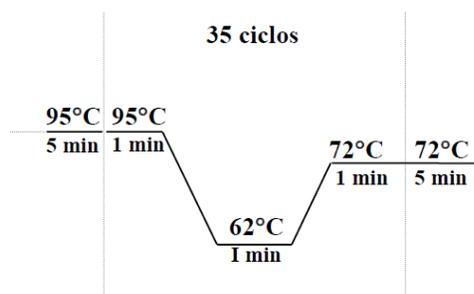


Figura 11 – Ciclos de amplificação para o estudo das deleções $del(GJB6-D13S1830)$ e $del(GJB6-D13S1854)$.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5%, após coloração com brometo de etídio. Ao analisar o resultado do gel, indivíduos que não são portadores das deleções exibem apenas a banda controle de 333pb referente ao éxon 1 do gene *GJB6*. Indivíduos com a del(*GJB6-D13S1830*) em heterozigose apresentam, além da banda controle, uma banda de 460 pb. Já a del(*GJB6-D13S1854*) em heterozigose gera um fragmento de 564 pb, além da banda controle. No gel, se alguma das deleções se apresenta em homozigose, há amplificação apenas da banda da deleção em questão e o fragmento controle não é amplificado, uma vez que é deletado.

6. MUTAÇÃO MITOCONDRIAL A1555G NO GENE *12S rRNA*

Para o rastreamento da mutação mitocondrial A1555G foram utilizadas condições previamente descritas por Friedman *et al.* (1999) e Iwasaki *et al.* (2000), utilizando *primers* MIT-F (5' – GTCGAAGGTGGATTAGCAGT – 3') e MIT-R (5' – CAGAAGGTATAGGGGTTAGTC – 3').

Para realização da reação de PCR foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e inverso), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8), 25 mM de MgCl₂, completando com água deionizada até o volume final de 50 µL.

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Foram então realizados 30 ciclos de aquecimento a 94°C para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 54°C para o anelamento dos *primers*, e então de 65°C para a extensão das novas fitas. As condições da PCR estão resumidas na Figura 12.

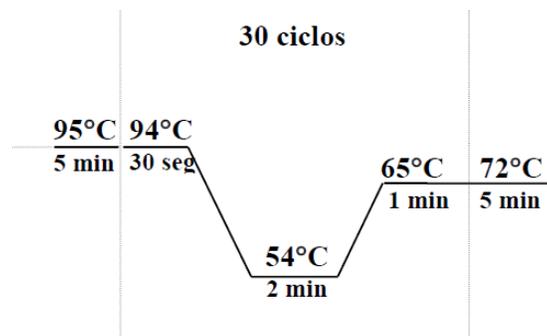


Figura 12 – Ciclos de amplificação do fragmento para rastreamento da mutação mitocondrial A1555G.

Após a amplificação pela técnica de PCR, foram gerados fragmentos de DNA mitocondrial de 2060 pb. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à análise de restrição utilizando a enzima *BsmAI* (Invitrogen) por 2 h a 55°C. Para o preparo da reação de digestão foram utilizados: 17,5 µL do produto de PCR, 2 µL do tampão da enzima e 0,5 µL da enzima *BsmAI* (5000 U/µL).

Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose 1,5%, após coloração com brometo de etídio. Em indivíduos não portadores da mutação mitocondrial A1555G são gerados 3 fragmentos: de 1100, 516 e 444 pb. E em indivíduos portadores da mutação, um dos sítios de restrição é abolido, sendo gerados apenas 2 fragmentos: de 1616 e 444 bp.

7. RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE *SLC26A4*

Foram amplificados pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reactions) os 20 exons codificantes do gene *SLC26A4* utilizando os *primers* descritos na Tabela 6 (Coyle *et al.*, 1998).

Tabela 6 – Sequência e tamanho de *primers* utilizados na amplificação dos 20 exons codificantes do gene *SLC26A4*.

EXONS	PRIMERS 5' - 3'	TAMANHO (pb)
2	F – CAGGACGCGGACCAGACT R – CGAGACTGATGGAGCCACCCTC	508
3	F – GCAAATTGGTTGTGACTGAG R – GAAGGGTAAGCAACCATCTGTCAC	294
4	F – TAATCACTTTGCATGTGCTTT R – GCCAAAACACTTTAAACATGA	189
5	F – CCTATGCAGACACATTGAACATTTG R – ACCTGTATAATTCCAACCAGCA	254
6	F – GGTTTCTATCTCAGGCAAACAT R – ATTGTTTCTGGAATGAACAGTGACC	270
7	F – CATGGTTTTTCATGTGGGAAGATTC R – AATGGCAGTAGCAATTATCG	388
8	F – ACACAAAATCCCAGTCCC R – CAAATGGCTTGACGTTTATCTACACAC	409
9	F – GTGGTCAAATCTTCACAGCA R – CCCTTCTTTAGCTGACACCA	283
10	F – AAATACTCAGCGAAGGTCTTGC R – CGAGCCTTCCTCTGTTGC	250
11/12	F – GGGGAGACAGGGAAGTATGAAGTG R – GCACAAGTGAGACTTAGGGG	436
13	F – TTGTTTGTGGATCATTGATCTT R – TCTGGGTTTTACGTTACTCAC	226
14	F – CAAAATACGGCTGTTCCAAA R – AATGGAGCTGCTGAACTTC	186
15	F – CCCAGACAATTTCTTTAATGC R – TTGGACCCCAGTAAATACTTGT	199
16	F – TTGAGAAATAGCCTTTCCAGAT R – GACCCTCTAACTGCTCTCATCA	250
17	F – CCAAGGAACAGTGTGTAGGTC R – CCCATGTATTTGCCCTGTTGC	423
18	F – TGAATGCTACTGAATTATGGGC R – GATAGGAGAAAGGGCTTACGG	182
19	F – GTTGCAGTGAGCAATGATGCC R – CTGATGAAAAAAGTGGGCTC	409
20	F – ACCCTGTGTTCTCTTTTTCAAG R – GCATTTGGGGGAATTATGTT	222
21	F – ACACTTTGTTTTCCCCTTGC R – GCTTACCCTGGACGCTGC	277

Legenda: F = *primer* direto (do inglês forward); R = *primer* reverso (do inglês reverse); pb = pares de bases.

A amplificação do gene consistiu em 35 ciclos utilizando-se 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e inverso), 2,5 U de enzima Taq DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8) e 1,5 mM de MgCl₂, completando com água deionizada até o volume final de reação de 50 μ L. Na amplificação dos fragmentos foram utilizados os ciclos de amplificação determinados de acordo com o T_m de cada *primer* a ser utilizado, como mostrado na Figura 13.

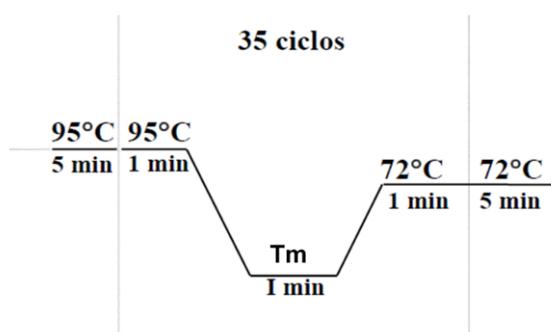


Figura 13 – Ciclo de amplificação para o rastreamento dos 20 exons codificantes do gene *SLC26A4*.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O gel foi corado em solução diluída de Brometo de Etídio (0,5 g/mL) durante 20 minutos, sendo visualizado em transluminador de luz ultravioleta e fotografado com câmera digital EDAS-Kodak.

Posteriormente à PCR, a detecção das mutações nas regiões codificantes do gene *SLC26A4* foi realizada por meio de sequenciamento (ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer), utilizando-se os mesmos *primers* da reação de PCR.

8. RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE *FOX11*

Foram amplificados por meio da técnica de PCR os 02 exons codificantes do gene *FOX11* utilizando os *primers* descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Temperatura de anelamento, sequências e tamanho de *primers* utilizados na amplificação dos 2 exons codificantes do gene *FOX11*.

PRIMERS	SEQUÊNCIAS 5' – 3'	TAMANHO (pb)	Tm
Exon01.1 F	GTATAAGTGGGAGGCCGG	422	59°C
Exon01.1 R	GCCAGCCCAGGTCG		
Exon01.2 F	CCAACGCCAGCCCC	457	56°C
Exon01.2 R	GTAGCATCCCCAGTCTTG		
Exon02F	GTCTTCCTGCATCTGTCACC	716	59°C
Exon2R	GCTTTTCTCTCTGGCATGTC		

Legenda: F = *primer* direto (do inglês forward); R = *primer* reverso (do inglês reverse); pb = pares de bases; Tm = Temperatura de melting.

A amplificação do gene consistiu em 35 ciclos utilizando-se 200 a 500ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e reverso), 2,5 U de enzima Taq DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8) e 1,5 mM de MgCl₂, completando com água deionizada até o volume final de reação de 50 µL. Na amplificação dos fragmentos foram utilizados os ciclos de amplificação determinados de acordo com o Tm de cada *primer* a ser utilizado, como mostrado na Figura 14.

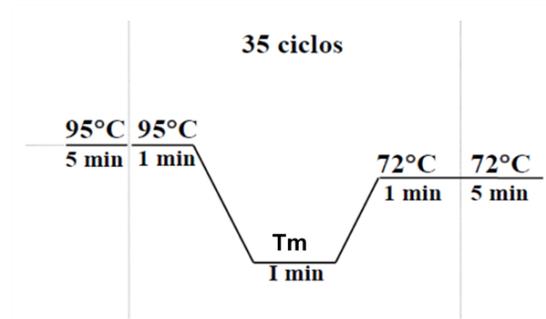


Figura 14 – Ciclo de amplificação para o rastreamento dos 02 exons codificantes do gene *FOXI1*.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O gel foi corado em solução diluída de Brometo de Etídio (0,5 g/mL) durante 20 minutos, sendo visualizado em transluminador de luz ultravioleta e fotografado com câmera digital EDAS-Kodak.

Posteriormente ao PCR, a detecção das mutações nas regiões codificantes do gene *FOXI1* foi realizada por meio de sequenciamento (ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer), utilizando-se os mesmos *primers* da reação de PCR.

9. RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE *KCNJ10*

Primeiramente foi realizada a amplificação do exon codificante (exon 02) do gene *KCNJ10* por meio da técnica de PCR. A temperatura de anelamento, as sequências e tamanho de *primers* estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Temperatura de anelamento, sequências e tamanho de *primers* utilizados na amplificação dos 2 exons codificantes do gene *KCNJ10*.

PRIMERS	SEQUÊNCIAS 5' – 3'	TAMANHO (pb)	Tm
Exon2.1F	GTTAATTCCTCCCTCCCATG	794	56°C
Exon2.1R	CACATTGACCTGGTTGAGCC		
Exon2.2F	GATCCGAGTTGCCAATATGC	663	64°C
Exon2.2R	GAGTGGAGGATGGGTGCTTC		

Legenda: F = *primer* direto (do inglês forward); R = *primer* reverso (do inglês reverse); pb = pares de bases; Tm = Temperatura de melting.

A amplificação do gene *KCNJ10* consistiu em 35 ciclos usando 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (direto e reverso), 2,5 U de enzima Taq DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8) e 1,5 mM de MgCl₂, completando com água deionizada até o volume final de reação de 50 µL. Na amplificação dos fragmentos foram utilizados os ciclos de amplificação determinados de acordo com a Tm de cada *primer* a ser utilizado, como mostrado na Figura 15.

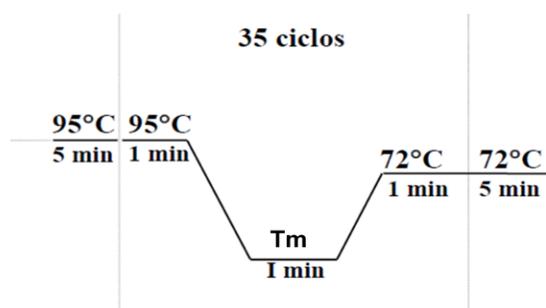


Figura 15 – Ciclo de amplificação para o rastreamento da região codificante do gene *KCNJ10*.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O gel foi corado em solução diluída de Brometo de Etídio (0,5 g/mL) durante 20 minutos, sendo visualizado em transluminador de luz ultravioleta e fotografado com câmera digital EDAS-Kodak.

Posteriormente ao PCR, a detecção das mutações na região codificante do gene *KCNJ10* foi realizada por meio de sequenciamento (ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer), utilizando-se os mesmos *primers* da reação de PCR.

10. CULTURA DE CÉLULAS

É importante ressaltar que os métodos descritos a seguir foram desenvolvidos no Instituto de Farmacologia e Toxicologia da Universidade Privada de Medicina Paracelsus (Salzburg – Áustria).

10.1. LINHAGENS CELULARES

Com o objetivo de realizar a caracterização funcional e a co-localização celular da Pendrina, foram utilizadas nesse estudo as linhagens celulares HEK293 Phoenix e HeLa, respectivamente.

10.1.1. CÉLULAS HEK293 PHOENIX

HEK293 (do inglês – *Human Embryonic Kidney*) é uma linhagem celular derivada de células de rim embrionário humano cultivadas em cultura de tecidos. As células HEK293 são cultivadas facilmente e vêm sendo utilizadas amplamente

em pesquisas de biologia celular e pela indústria de biotecnologia para produzir proteínas terapêuticas e vírus para terapia genética. As células HEK293 Phoenix são baseadas na linhagem celular HEK293T, a qual foi transformada com adenovirus E1a e carrega o antígeno T sensível à temperatura co-selecionado com neomicina (DiCiommo, 2004). A principal característica desta linhagem celular é ser altamente transfectável, seja por transfecção mediada por fosfato de cálcio ou à base de lípidios – mais de 50% das células podem ser transientemente transfectadas.

As células HEK293 Phoenix foram utilizadas na transfecção transiente pelo método de fosfato de cálcio para a realização do estudo funcional da Pendrina alterada.

10.1.2. CÉLULAS HELA

HeLa é a linhagem celular humana mais antiga e mais amplamente utilizada. Esta linhagem imortal foi derivada de células obtidas de câncer cervical coletadas em 8 de fevereiro de 1951 da paciente Henrietta Lacks (Scherer, 1953).

As células HeLa foram utilizadas na transfecção transiente utilizando reagente lipídico para a realização dos estudos de co-localização celular da Pendrina alterada.

10.2. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA MEM

O meio de cultura MEM (Meio Mínimo Essencial Eagle, do inglês – *Minimum Essential Eagle Medium* – Sigma, Áustria, código M5650) foi desenvolvido com o intuito de encontrar as necessidades nutricionais específicas de certos subtipos de células. Esse meio inclui uma grande concentração de aminoácidos de forma a se aproximar da composição proteica de células de mamíferos cultivadas.

As linhagens celulares HEK293 Phoenix e HeLa foram cultivadas em meio MEM suplementado com 10% de FBS (Soro Fetal Bovino, do inglês – *Fetal Bovine Serum* – Lonza, Brasil, código DE14-801F), 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 1 mM de ácido pirúvico (sal de sódio). As células foram mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 100% de umidade.

10.3. SUBCULTIVO DE CÉLULAS

Ao atingirem aproximadamente 80% de confluência na placa, as células foram subcultivadas, evitando a senescência das mesmas associada a alta densidade de células em período prolongado. Dessa forma, para permitir que as células se multipliquem, foi necessário separá-las em diferentes placas de Petri 100 mm a cada 02 ou 03 dias, dependendo da confluência observada em microscópio invertido (Motic AE31). Primeiramente, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 10 mL de PBS (Tampão Fosfato Salino, do inglês – *Phosphate Buffered Saline*). Então foi adicionado 1 mL de tripsina para desgrudar as células aderidas à placa, ou seja, para colocá-las em suspensão. Após aproximadamente 3 minutos, a placa foi observada em microscópio invertido para confirmar se as células estavam em suspensão. Em seguida, a fim de parar a ação da tripsina, 9 mL de meio de cultura foram adicionados. O volume total de 10

mL foi transferido para um tubo Falcon que foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 9 mL de meio de cultura novo. A nova placa foi preparada com um determinado volume de meio de cultura e de células, essa variável foi dependente do local para o qual as células foram transferidas (Figura 16).



Figura 16 – Volume de meio de cultura e de células adicionados a diferentes tipos de placas no subcultivo de células. Legenda: well=poço.

Após esse processo, as placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ e 100% de umidade para a fase de crescimento seguinte.

11. VETORES DE EXPRESSÃO

11.1. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL

Nos estudos de caracterização funcional da proteína Pendrina mutante foram utilizados três vetores: pTARGET-PDS, pEYFPN1 e pTARGET “vazio” (sem inserto).

11.1.1. pTARGET-PDS

O vetor de expressão pTARGET (Promega, código A1410) contendo a ORF (Fase de Leitura Aberta, do inglês *Open Reading Frame*) da proteína Pendrina humana clonada a partir de tecido de tireoide normal foi originalmente fornecido pelo Prof. Dr. P. Beck-Peccoz, Universidade de Milão, Itália. Esse vetor foi utilizado como molde para que as mutações fossem inseridas na sequência do cDNA do gene *SLC26A4* (Pendrina) presente no vetor. Foram estudadas 7 diferentes alterações na proteína Pendrina: P142L, G149R, C282Y (alterações ainda não descritas na literatura), L445W, Q413R, R776C, T193I (alterações já descritas, porém sem caracterização funcional definida). A Figura 17 ilustra a estrutura do vetor de expressão pTARGET.

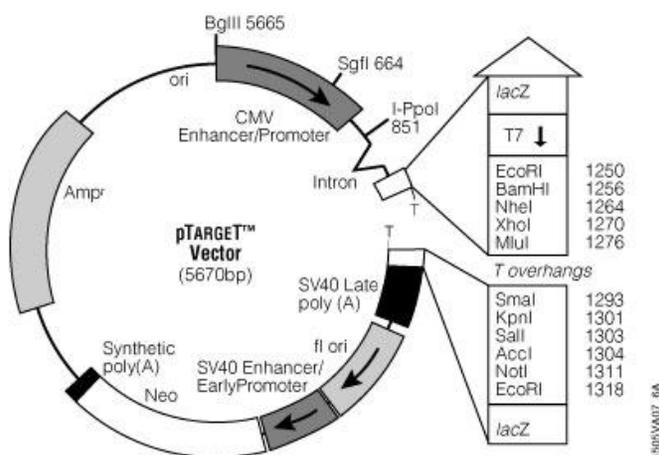


Figura 17 – Mapa de restrição e Sítio Múltiplo de Clonagem do vetor pTARGET.

11.1.2. pTARGET VAZIO

O vetor pTARGET “vazio” não apresenta cDNA inserido em seu MCS (Sítio Múltiplo de Clonagem, do inglês *Multiple Cloning Site*). Esse vetor foi utilizado apenas como controle negativo na transfecção transiente.

11.1.3. pEYFP-N1*V

O vetor pEYFP-N1 (Clontech, código 6006-1) codifica uma proteína fluorescente amarela (EYFP, do inglês *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*) obtida a partir da proteína GFP (Proteína Fluorescente Verde, do inglês *Green Fluorescent Protein*) por meio da inserção de quatro substituições de aminoácidos, S65G, V68L, S72A, T203Y (Ormö, 1996). Essas modificações resultam no aumento de fluorescência quando há expressão de EYFP. Em 2001, além dessas alterações, Galletta e colaboradores, por meio de Mutação Sítio-Dirigida do vetor pEYFP-N1, inseriram duas mutações na proteína YFP, H148Q e I152L (pEYFP-N1*V) para que fosse aumentada a sensibilidade aos íons iodeto, cloreto, nitrato e brometo e para que houvesse aumento de fluorescência na expressão de EYFP. Dessa forma, para realização do estudo funcional da proteína Pendrina foi utilizado o vetor não comercial pEYFP-N1*V cedido pelo Prof Alan Verkman, UCSF, São Francisco, CA. A estrutura do vetor pEYFP-N1 pode ser visualizada na Figura 18.

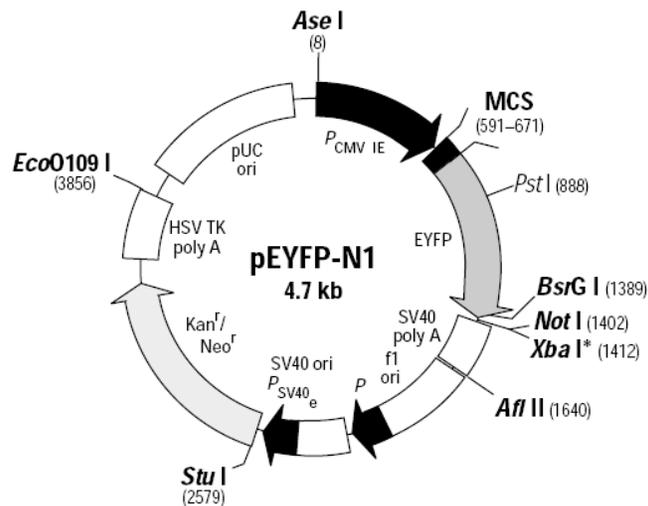


Figura 18 – Mapa de restrição e Sítio Múltiplo de Clonagem do vetor pEYFP-N1.

11.2. CO-LOCALIZAÇÃO CELULAR

Nos estudos de co-localização celular da proteína pendina mutante foram utilizados dois vetores: pEYFPN1-PDS e pEYFN1 vazio.

11.2.1. pEYFP-N1-PDS

A proteína Pendrina humana clonada a partir de tecido de tireoide normal (Prof. Dr. P. Beck-Peccoz) foi inserida no vetor de expressão pEYFP-N1 pela Profa. Dra. Silvia Dossena da Universidade Privada de Medicina Paracelsus, Salzburg – Áustria. O vetor pEYFP-N1-PDS foi utilizado como molde para que as mutações fossem inseridas na sequência do cDNA do gene *SLC26A4* (Pendrina) presente no vetor. Os estudos de co-localização celular foram realizados em 07 diferentes alterações na proteína Pendrina: P142L, G149R, C282Y (alterações

ainda não descritas na literatura), L445W, Q413R, R776C, T193I (alterações já descritas, porém sem caracterização funcional definida).

11.2.2. pEYFP-N1 VAZIO

O vetor pEYFP-N1 “vazio” não apresenta cDNA inserido em seu Sítio Múltiplo de Clonagem. Esse vetor foi utilizado apenas como controle negativo na transfecção transiente.

12. MUTAGÊNESE SÍTIO – DIRIGIDA

Mutagênese Sítio-Dirigida é uma técnica valiosa para estudar a relação estrutura-função de proteínas, expressão gênica e realizar modificações em vetores. O kit de Mutagênese Sítio-Dirigida QuikChange® (Stratagene) permite a inserção sítio-específica de determinada mutação em qualquer plasmídeo de cadeia dupla. Além disso, esse sistema não requer vetores especializados, sítios de restrição únicos, ou transformações múltiplas. O protocolo do kit é composto apenas de quatro passos rápidos e gera mutantes com mais do que 80% de eficiência.

O kit de Mutagênese Sítio-Dirigida QuikChange® é utilizado para inserir mutações de ponto, trocar os aminoácidos e deletar ou inserir um ou vários aminoácidos. O método de Mutagênese é realizado utilizando um Termociclador e a enzima PfuTurbo® DNA Polimerase, a qual replica ambas as cadeias do plasmídeo com alta fidelidade sem deslocar os *primers* mutantes. O procedimento básico do kit utiliza um vetor circular de dupla-fita de DNA (dsDNA, do inglês **Double-Stranded DNA**) com o inserto de interesse e dois *primers* sintéticos

contendo a alteração desejada (Figura 19). Primeiramente, há o anelamento dos *primers* e a extensão das fitas durante os ciclos de temperatura por meio da *PfuTurbo* DNA Polimerase. Em seguida, são gerados plasmídeos com a mutação de interesse inserida. Então, a endonuclease *Dpn* I é utilizada para digerir o DNA metilado da bactéria (DNA parental não mutado). Vale ressaltar que o DNA isolado a partir de quase todas as cepas de *E. coli* é metilado e, portanto, susceptível a digestão pela enzima *Dpn* I. Por fim, os plasmídeos são transformados em células competentes XL1-Blue.

Sabe-se que a pequena quantidade de DNA molde necessário para a realização deste método, a alta fidelidade da *PfuTurbo* DNA Polimerase e o baixo número de ciclos térmicos contribuem para a elevada eficiência de inserção da mutação e para o baixo potencial em gerar mutações aleatórias durante a reação.

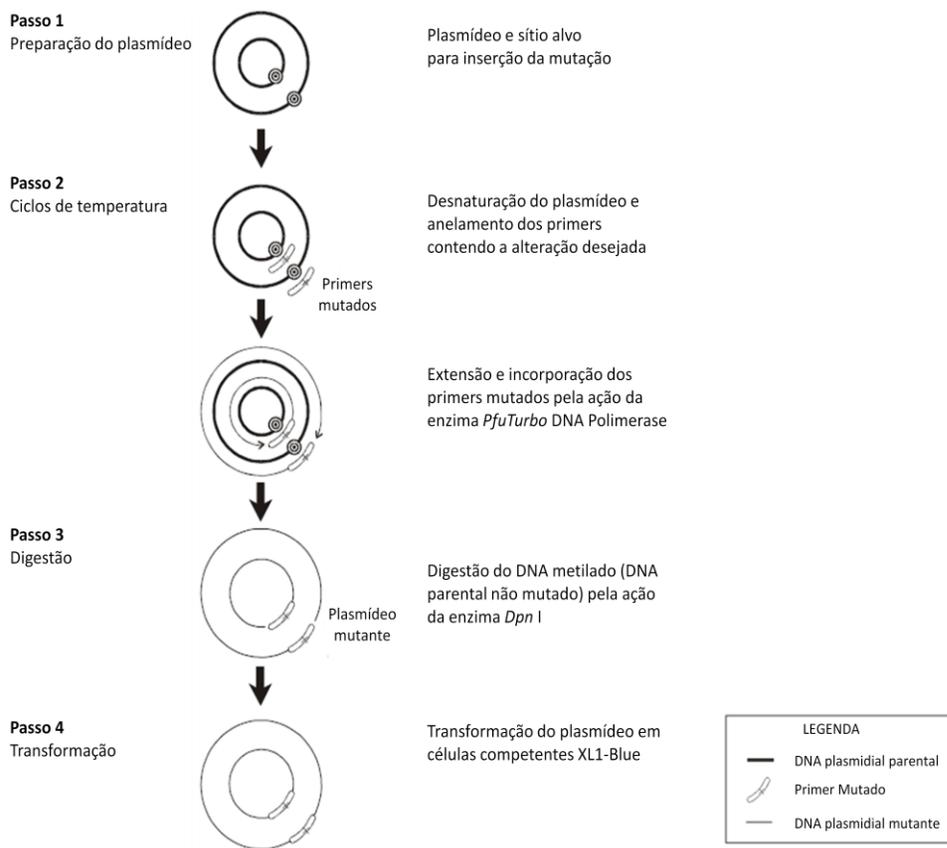


Figura 19 – Método de Mutagênese Sítio-Dirigida QuikChange®.

12.1. DESENHO DE *PRIMERS*

Os oligonucleótidos iniciadores mutagênicos devem ser desenhados individualmente de acordo com a mutação desejada. As seguintes considerações devem ser seguidas para sintetizar os *primers* mutagênicos:

- Ambos os *primers* devem conter a mutação desejada e anelar na mesma posição nas fitas complementares do plasmídeo.

- Os *primers* devem apresentar um tamanho entre 25 a 45 bases com temperatura de Melting (T_m) $\geq 78^\circ\text{C}$. Iniciadores com mais de 45 bases podem ser utilizados, porém aumenta a probabilidade de formação de estrutura secundária, podendo afetar a eficiência da reação de mutagênese.
- A alteração desejada deverá estar localizada na posição mediana do *primer*, com aproximadamente 10 a 15 bases da sequência correta em ambos os lados.
- Os *primers* devem possuir porcentagem mínima de CG de 40% e devem terminar com a base C ou G.

Seguindo as condições necessárias para o desenho de *primers* mutagênicos e utilizando o programa *Gene Runner*, foram sintetizados 07 pares de *primers* (Tabela 9) para a realização do estudo funcional e de co-localização celular das alterações: P142L, G149R, C282Y (alterações ainda não descritas na literatura), T193I, Q413R, L445W e R776C (alterações já descritas, porém sem caracterização funcional definida).

Tabela 9 – Sequência dos *primers* utilizados na Mutagênese Sítio-Dirigida.

PRIMERS	SEQUÊNCIAS 5' – 3'
P142L FWD	GTTGAACCTTTTCTAGTGGTGAGTTTAATGG
P142L REV	CCATTAAACTCACCCTAGAAAAGGTCCAAC
G149R FWD	GAGTTTAATGGTGAGATCTGTTGTTCTGAGC
G149R REV	GCTCAGAACAACAGATCTCACCATTAAACTC
C282Y FWD	CACCATTGTCGTCTATATGGCAGTTAAGG
C282Y REV	CCTTAACTGCCATATAGACGACAATGGTG
L445W FWD	GCTTCTGGAACCCTGGCAGAAGTCGGTCTTGGC
L445W REV	GCCAAGACCGACTTCTGCCAGGGTTCCAGAAGC
Q413R FWD	CCCGCACGGCCGTCCGGGAGAGCACTGGAGG
Q413R REV	CCTCCAGTGCTCTCCGGACGGCCGTGCGGG
R776C FWD	CCAGGATGAGGCTATGTGTACACTTGCATCC
R776C REV	GGATGCAAGTGTACACATAGCCTCATCCTGG
T193I FWD	GCCAGTGCCCTGATTCTGCTGGTTGG
T193I REV	CCAACCAGCAGATCAGGGCACTGGC

Legenda: bases em vermelho correspondem às alterações inseridas.

12.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE, DIGESTÃO E PURIFICAÇÃO

12.2.1. PCR

Para possibilitar a amplificação do plasmídeo com a alteração desejada, foi realizada a reação de PCR com os *primers* evidenciados na Tabela 7. Nesta reação, foram utilizados: 5 μ L de tampão 10x, 1,5 μ L de cada par de *primer* (direto e reverso) a 10 μ M, 1 μ L de dNTP a 10 μ M (desoxinucleotídeos trifosfato – dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 μ L da enzima *PfuTurbo* DNA Polimerase (2.5 U/ μ L), 1 μ L do plasmídeo pTARGET PDS 100 ng para realização do estudo funcional ou 1 μ L do plasmídeo pEYFP-N1-PDS 100 ng para os estudos de co-localização celular, completando com água deionizada para um volume final de reação de 50 μ L.

Além disso, 20 μ L de óleo mineral foram adicionados à superfície da reação para que não ocorresse evaporação do produto após variações elevadas de temperatura.

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador VWR Duocycler (*VWR International*). Foram então realizados 18 ciclos, iniciando pelo aquecimento a 95°C por 30 segundos para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 55°C por 1 minuto para o anelamento dos *primers*, e então de 68°C por 10 segundos para a extensão das novas fitas. As condições da PCR estão resumidas na Figura 20.

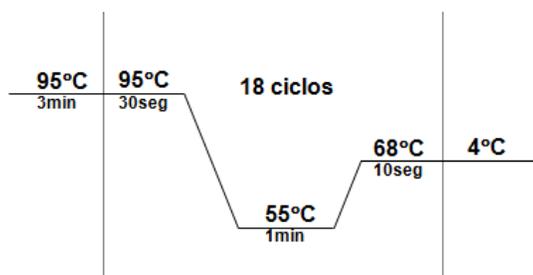


Figura 20 – Ciclo de amplificação utilizado na Mutagênese Sítio-Dirigida.

12.2.2. DIGESTÃO DO DNA PARENTAL

Após a amplificação pela técnica de PCR, cada produto gerado foi submetido à ação de 1 μ L da enzima de restrição *Dpn* I (10 U/ μ L). Posteriormente, as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora para que fosse digerido o DNA parental, ou seja, o plasmídeo não mutado.

12.2.3. PURIFICAÇÃO

O produto comercial da Qiagen – *MinElute PCR Purification kit* – permite a purificação de fragmentos de DNA de cadeia dupla (70 pb – 4 kb) de reações de PCR (*primers*, nucleotídeos, polimerases e sais) utilizando mini colunas e uma microcentrífuga.

O sistema *MinElute* combina uma coluna com as propriedades de ligação seletiva a uma membrana de sílica (Figura 21). As colunas *MinElute* são projetadas para fornecer altas concentrações finais de fragmentos de DNA purificados. Tampões especiais fornecidos neste kit são otimizados para a recuperação eficiente do DNA e remoção de contaminantes. Primeiramente o DNA

fica retido à membrana de sílica pela presença de concentrações elevadas de sal, enquanto os contaminantes passam através da coluna. Em seguida, as impurezas restantes são eficientemente lavadas e o DNA purificado é eluído da membrana com tampão Tris ou água. Este kit foi utilizado para purificar os plasmídeos do produto de PCR amplificado anteriormente.



Figura 21 – Coluna MinElute.

Primeiramente, foram adicionados 250 μL de tampão PB aos 50 μL do produto de PCR já digerido com a enzima de restrição *Dpn* I. O tampão de ligação PB apresenta a concentração correta de sal e pH necessários para a adsorção do DNA à membrana *MinElute*. Vale ressaltar que a adsorção de ácidos nucleicos em superfícies de sílica ocorre apenas na presença de uma elevada concentração de sais. Além disso, a retenção do DNA à sílica também depende do pH. A adsorção do DNA é geralmente de 80% se o pH for $\leq 7,5$, e é reduzida drasticamente a pH mais elevado. O tampão PB possui indicador de pH que permite fácil determinação do pH ótimo para a ligação do DNA à membrana, ou seja, pode-se observar a variação de pH por meio da coloração obtida após a adição do tampão PB ao produto de PCR (Figura 22). Quando o pH da amostra está $\leq 7,5$ (pH ótimo para a adsorção do DNA à membrana), o indicador de pH presente no tampão PB faz com que a amostra se apresente na tonalidade amarela. Em casos em que o pH da amostra se apresentou $> 7,5$ (coloração alaranjada ou violeta), o pH ótimo para ligação do DNA foi obtido pela adição de 10 μL de acetato de sódio 3 M, pH

5,0. Em seguida, a coluna foi colocada em um tubo coletor de 2mL e a amostra foi centrifugada à temperatura ambiente a 13.000 rpm por 1 minuto. O fluido que passou pela coluna e ficou retido no tubo coletor foi descartado e a coluna foi novamente inserida ao mesmo tubo.

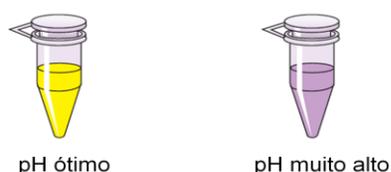


Figura 22 – Indicador de pH presente no tampão PB identifica o pH ideal para a ligação de DNA à coluna.

O próximo passo consistiu em remover os iniciadores e as impurezas indesejáveis, tais como sais, enzimas, nucleotídeos não incorporados, corantes, e óleos que não se ligam à membrana de sílica, mas passam através da coluna. Então foram adicionado 750 μ L de tampão PE para remoção das impurezas que foram lavadas pelo etanol contido no tampão e a amostra foi centrifugada à temperatura ambiente a 13.000 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação, o fluido contido no tubo coletor foi descartado e novamente a coluna foi inserida ao mesmo tubo para uma centrifugação adicional de 1 minuto. Qualquer tampão residual PE, que pudesse interferir nas reações enzimáticas subsequentes, foi removido nesta etapa de centrifugação adicional. Em seguida, o tubo coletor de 2 mL foi descartado definitivamente e um tubo de 1.5 mL foi colocado em seu lugar para eluição do DNA. Nesta etapa, foi adicionado ao centro da membrana 10 μ L de água deionizada. Então, a amostra foi deixada à temperatura ambiente por 1 minuto e posteriormente centrifugada nas mesmas condições anteriores por 1 minuto. A coluna foi descartada e o tubo com o DNA purificado foi nomeado e armazenado a -20°C .

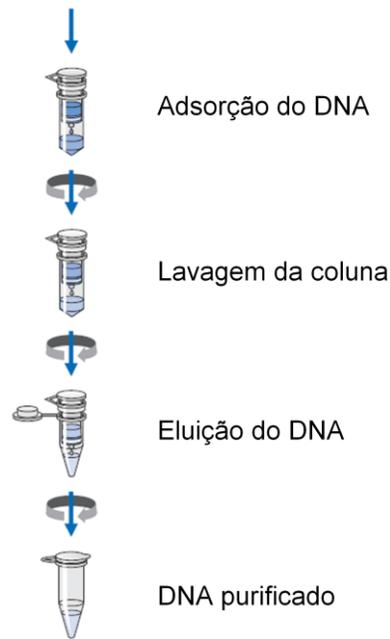


Figura 23 – Etapas do protocolo do kit de purificação de PCR *MinElute* (Qiagen).

12.3. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA I

Para possibilitar a expressão da proteína Pendrina pela bactéria, é necessário que ocorra a transformação bacteriana, a qual consiste em tornar competente determinada bactéria, ou seja, deixá-la apta a receber DNA exógeno, no caso, os plasmídeos obtidos na Mutagênese Sítio-Dirigida. Neste trabalho, foi utilizada a linhagem *XL1-Blue* de *E.coli*.

12.3.1. CÉLULAS COMPETENTES *XL1-BLUE*

As células quimicamente competentes são tratadas com cloreto de cálcio para facilitar a ligação do plasmídeo à membrana celular. A célula competente é então aquecida em banho de água, possibilitando a abertura dos poros da membrana celular e permitindo a entrada do plasmídeo (transformação).

Os reagentes utilizados neste processo foram: meio LB, solução RF1, solução RF2.

Meio LB (Luria-Bertani) líquido: para 1 L: triptona 10 g, extrato de levedura 5 g, NaCl 10 g. Foram adicionados 20g de meio LB (sem antibiótico) em 1 L de água deionizada. O meio foi esterilizado em autoclave e armazenado a 4°C.

Solução RF1: acetato de potássio 30 mM; cloreto de rubídio 100 mM; cloreto de manganês 50 mM; cloreto de cálcio 10 mM e glicerol 15%; pH 5,8 ajustado com ácido acético 0,2 M. A solução foi esterilizada por meio de filtração e armazenada a 4°C.

Solução RF2: MOPS-3-ácido [n-morfolino] propano-sulfônico 10 mM; cloreto de rubídio 10 mM; cloreto de cálcio 75 mM; glicerol 15%; pH 6,8 ajustado com NaOH 2 M. A solução foi esterilizada por meio de filtração e armazenada a 4°C.

A partir do estoque mantido a -80°C, a linhagem *XL1-Blue* de *E.coli* foi inoculada em 5 mL de meio LB e cultivada a 37°C durante a noite em incubadora com agitação. Uma alíquota de 3 mL desta cultura foi inoculada em 200 mL de meio LB e incubada a 37°C por 2h a 5h até que a absorbância (600nm) de 0.7 fosse atingida. A seguir a cultura foi mantida em banho de gelo por 30 minutos, as células foram recolhidas por centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. As células obtidas foram ressuspensas em 2 mL de solução RF1 gelada e incubadas em banho de gelo por 30 minutos. Novamente as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de solução RF2 gelada. Por fim, alíquotas de 50 µL foram armazenadas a -80°C.

12.3.2. CHOQUE TÉRMICO

As células competentes *XL1-Blue* foram transformadas com o plasmídeo de interesse para que pudessem expressar a proteína Pendrina. No total, foram 14 tipos diferentes de plasmídeos, sendo 07 plasmídeos pTARGET-PDS para análise funcional (pTARGET PDS P142L, pTARGET PDS G149R, pTARGET PDS C282Y, pTARGET PDS T193I, pTARGET PDS Q413R, pTARGET PDS L445W e pTARGET PDS R776C) e 07 plasmídeos pEYFP-N1-PDS para estudos de co-localização celular (pEYFP-N1 PDS P142L, pEYFP-N1 PDS G149R, pEYFP-N1 PDS C282Y, pEYFP-N1 PDS T193I, pEYFP-N1 PDS Q413R, pEYFP-N1 PDS L445W e pEYFP-N1 PDS R776C).

Os reagentes utilizados neste processo foram: LB+, LB Agar, antibióticos ampicilina 1x e kanamicina 1x, placas de LB agar.

LB+: 19,6 mL de meio LB e 400 µL de glucose 1 M. O reagente foi armazenado a -20°C.

LB agar: triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L e ágar 20 g/L. Foram adicionados 35 g de LB agar em 1000 mL de água deionizada. O meio foi esterilizado em autoclave e armazenado a 4°C.

Placas de LB agar: 500 mL de LB agar foram diluídos em microondas por 1 hora e foram deixados esfriar à temperatura ambiente. Então foram adicionados 500 µL do antibiótico desejado (ampicilina a 100 mg/mL ou kanamicina a 30 mg/mL) e a mistura foi distribuída em placas de Petri (25 mL). As placas contendo LB agar e antibiótico foram deixadas à temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora para solidificação do meio. Em seguida, foram armazenadas a 4°C.

Na transformação, foram adicionados 10 μL de plasmídeo purificado (100 ng) a cada alíquota de 50 μL de células competentes *XL1-Blue*. A amostra foi incubada em gelo por 10 minutos e em seguida a 42°C por 45 segundos. Após o choque térmico, a amostra foi incubada imediatamente em gelo por 2 minutos. Então foram adicionados 250 μL de LB+ à amostra, que foi posteriormente incubada em banho de água a 37°C por 30 minutos. Esta incubação em LB+ permite que as bactérias expressem a resistência ao antibiótico codificado pelo plasmídeo. Vale ressaltar que no plasmídeo pTARGET o antibiótico de resistência é a ampicilina e no plasmídeo pEYFP-N1 é a kanamicina. Após a incubação, as amostras foram plaqueadas em meio LB sólido contendo o antibiótico desejado, ou seja, as bactérias transformadas com plasmídeos pTARGET foram plaqueadas em meio contendo ampicilina, enquanto que as transformadas com pEYFP-N1 foram plaqueadas em meio contendo kanamicina. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite.

No dia seguinte, as placas foram mantidas a 4°C para que o crescimento das colônias fosse interrompido. Ao final do dia, foram isoladas 24 colônias de cada placa. Cada colônia foi inoculada em 3 mL de meio líquido LB e 3 μL do antibiótico desejado (ampicilina 1x para os vetores pTARGET-PDS e kanamicina 1x para os vetores pEYFP-N1-PDS). O inóculo foi cultivado a 37°C em incubadora com agitação durante a noite (Figura 24).



Figura 24 – Esquema evidenciando processo de inoculação de colônias selecionadas.

12.4. MINIPREP E SEQUENCIAMENTO I

Para a realização da extração e purificação plasmidial das células bacterianas (MiniPrep) foram utilizadas três diferentes soluções.

Solução I: para 500 mL – 4,5 g de glicose 50 mM; 1,86 g de EDTA 10 mM; 12,5 mL de TRIS 1M pH 8.0; 50 mg RNase 0,1 mg/mL.

Solução II: para 500 mL – 4 g NaOH 0,2 M; 0,5 g SDS 0,1%.

Solução III: para 500 mL – 147,23 g de Acetato de Potássio 3 M; 7,5 mL de Ácido Acético Glacial 1,5%.

Na manhã seguinte ao inóculo, 2 mL de cada cultura bacteriana foram transferidos para tubos 2 mL *Eppendorf* (Figura 25).

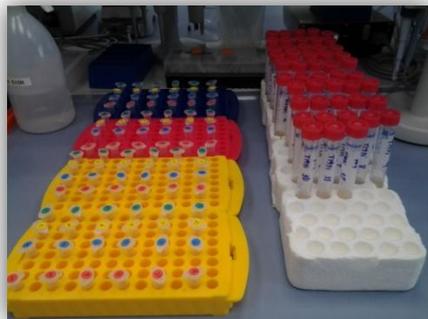


Figura 25 – Início do processo de purificação plasmidial – transferência da cultura bacteriana para tubos de 2 mL.

As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* bacteriano foi ressuspenso em 100 μ L de Solução I a 4°C e a amostra foi deixada à

temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de Solução II para possibilitar a lise bacteriana, a amostra foi invertida gentilmente 8 vezes e incubada em gelo por 5 minutos. Logo após a incubação, foram adicionados 150 μ L de Solução III a 4°C para que ocorresse a precipitação de DNA cromossômico, proteínas e outros componentes celulares. Foram realizadas 8 inversões e as amostras foram incubadas em gelo por 5 minutos. Então as amostras foram centrifugadas por 15 minutos à rotação máxima a 4°C. Posteriormente, 400 μ L do sobrenadante foram transferidos para tubos 1,5 mL *Eppendorf* e 1 mL de etanol 100% foi adicionado a cada tubo para precipitação do DNA. As amostras foram *vortexadas* vigorosamente e incubadas a -80°C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Então foram adicionados 750 μ L de etanol 70% a cada tubo e as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 12.000 rpm a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi descartado, os tubos foram deixados abertos invertidos para secagem por pelo menos 20 minutos e o *pellet* de DNA foi ressuscitado em 10 μ L de água deionizada. Foram obtidos 24 tipos de diferentes plasmídeos purificados de cada um dos 14 plasmídeos estudados neste trabalho.

A partir do plasmídeo purificado, foi realizada a reação de sequenciamento de parte da proteína Pendrina presente no vetor, dependendo do local de cada alteração. No total, foram sequenciados 14 tipos diferentes de plasmídeos, sendo 07 plasmídeos pTARGET-PDS para análise funcional (pTARGET PDS P142L, pTARGET PDS G149R, pTARGET PDS C282Y, pTARGET PDS T193I, pTARGET PDS Q413R, pTARGET PDS L445W e pTARGET PDS R776C) e 07 plasmídeos pEYFP-N1-PDS para estudos de co-localização celular (pEYFP-N1 PDS P142L, pEYFP-N1 PDS G149R, pEYFP-N1 PDS C282Y, pEYFP-N1 PDS T193I, pEYFP-N1 PDS Q413R, pEYFP-N1 PDS L445W e pEYFP-N1 PDS R776C). Os *primers* utilizados na reação de sequenciamento e suas respectivas concentrações estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 – Dados referentes aos *primers* utilizados na reação de sequenciamento da MiniPrep.

<i>Primers</i>	Concentração Estoque	Diluição para 50 µL (5 µM)	Sequência 5' – 3'	Região aproximada detectada (aminoácidos)
1R	42,7 µM	5,85 µL <i>primer</i> + 44,15 µL H ₂ O	TTCCATTGCTGCTGGATACG	1 – 151
2R	32,7 µM	7,65 µL <i>primer</i> + 42,35 µL H ₂ O	GGAAAATGATGCAGCCAGC	133 – 335
2F	35,4 µM	7,06 µL <i>primer</i> + 42,94 µL H ₂ O	TGGGATCTGTTGTTCTGAGC	185 – 453
3R	45,3 µM	5,5 µL <i>primer</i> + 44,5 µL H ₂ O	TTGCCATAGAAAATAGGACTGG	261 – 544
4F	41,5 µM	6 µL <i>primer</i> + 44 µL H ₂ O	GAAGCATCCCTAGCACCAGATA	540 – 780
981-98F	50 µM	5 µL <i>primer</i> + 45 µL H ₂ O	TGTTAAATCCATCCCAAG	350 – 587
2192R*	50 µM	5 µL <i>primer</i> + 45 µL H ₂ O	AACCACAACCTAGAATGCAG	1 – 240

Legenda: (F) Forward; (R) Reverse; (*) *primer* utilizado para rastrear a região codificante da proteína EYFP após a realização da MaxiPrep.

Na reação de sequenciamento, os *primers* utilizados foram escolhidos de acordo com o local da alteração: P142L – 2R, G149R – 2R, T193I – 2R, C282Y – 2F, Q413R – 3R, R776C – 4F, L445W – 3R. Para o preparo das reações foram utilizados: 8 µL água deionizada, 1 µL de DNA da MiniPrep e 6 µL do *primer* 5 µM. As amostras foram então enviadas para sequenciamento na Microsynth – Balgach, Suíça. As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador *Applied Biosystems PRISM® 3730 DNA Analyzer* utilizando o Kit *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing* de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Para confirmar inserção da alteração desejada, as sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa *BLAST* (do inglês **B**asic **L**ocal **A**lignment **T**ool) disponibilizado pelo *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*. Foram analisadas as sequências de proteínas – *blastx* (link: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&BLAST_PROGRAMS=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome).

12.5. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA II E MAXIPREP

A partir dos plasmídeos sequenciados, foi realizada a transformação bacteriana. O primeiro passo foi realizar a diluição do produto da MiniPrep em 1:100 (1 μ L da MiniPrep para 99 μ L de água deionizada). Então foi adicionado 1 μ L dessa diluição em 50 μ L de células competentes XL1-Blue e o protocolo da transformação bacteriana seguiu de acordo com a metodologia descrita no item 12.3.2. Na manhã seguinte, foi isolada apenas 1 colônia de cada placa. Cada colônia foi inoculada em 3 mL de meio líquido LB e 3 μ L do antibiótico desejado (ampicilina 1x para os vetores pTARGET-PDS e kanamicina 1x para os vetores pEYFP-N1-PDS). O inóculo foi cultivado a 37°C em incubadora com agitação por aproximadamente 7h30min. Após este período, a cultura bacteriana foi transferida para um erlenmeyer de 1000 mL contendo 400 mL de meio líquido LB e 400 μ L do antibiótico desejado. A cultura foi então cultivada a 37°C em incubadora com agitação durante a noite (Figura 26).



Figura 26 – Processo de inoculação em larga escala de colônias selecionadas.

Para a realização da extração e purificação plasmidial em larga escala das células bacterianas (MaxiPrep) foi utilizado o kit *NucleoBond® PC 500 Plasmid Purification* (Macherey-Nagel). Por meio deste kit foi possível separar as moléculas do plasmídeo de outras moléculas oriundas das colônias de *E. coli*,

como proteínas, RNAs, assim como o próprio DNA bacteriano. Nesta técnica foram utilizados 06 diferentes tipos de tampões:

S1 – Tampão de Ressuspensão: Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, RNase A 100 µg/mL, pH 8.0.

S2 – Tampão de Lise bacteriana: NaOH 200 mM, SDS 1%.

S3 – Tampão de Neutralização: KAc 2.8 M, pH 5.1.

N2 – Tampão de Equilíbrio: Tris 100 mM, Etanol 15%, KCl 900 mM, Triton X-100 0.15%, ajustado para pH 6.3 com H₃PO₄.

N3 – Tampão de Lavagem: Tris 100 mM, Etanol 15%, KCl 1.15 M, ajustado para pH 6.3 com H₃PO₄.

N5 – Tampão de Eluição: Tris 100 mM, Etanol 15%, KCl 1 M, ajustado para pH 6.3 com H₃PO₄.

No dia seguinte ao inóculo em larga escala, as culturas bacterianas foram transferidas do *erlenmeyer* para garrafas de plástico (Figura 27) e centrifugadas por 1 hora a 4.000 rpm a 4°C.



Figura 27 – Garrafa de plástico utilizada para centrifugar a cultura bacteriana.

Para realização de cada MaxiPrep foram utilizados os seguintes materiais (Figura 28): 1 funil de vidro, 1 filtro de papel, 1 coluna *NucleoBond*®, 1 *erlenmeyer*.



Figura 28 – Aparato utilizado na realização da técnica de purificação plasmidial em larga escala.

Durante o período de centrifugação das culturas bacterianas, foram adicionados 6 mL do tampão N2 ao aparato da Figura 28 para possibilitar o equilíbrio da coluna, e assim, deixá-la livre do fluxo gravitacional.

Após a centrifugação, o sobrenadante de cada cultura bacteriana foi descartado. Ao *pellet*, foram adicionados 12 mL de tampão de ressuspensão S1 para que a amostra fosse colocada em solução. Em seguida, foram adicionados 12 mL de tampão S2 para que ocorresse a lise bacteriana. A amostra foi incubada à temperatura ambiente por 3 minutos. Então 12 mL de tampão de neutralização S3 foram adicionados para que a lise bacteriana fosse interrompida. A amostra foi incubada em gelo por 5 minutos. Após a incubação, a cultura foi derramada no aparato mostrado na Figura 28.

Posteriormente à passagem completa da amostra pelo papel filtro e pela coluna, foram adicionados 32 mL de tampão de lavagem N3 à coluna e, após sua

total passagem, o conteúdo do *erlenmeyer* foi descartado e em seu lugar foi colocado um tubo Falcon de 50 mL para coleta dos plasmídeos purificados. Então foram adicionados à coluna 15 mL do tampão de eluição N5.

Aos plasmídeos purificados, foram adicionados 11 mL de Isopropanol a 4°C para precipitação do DNA após centrifugação por 30 minutos a 11.500 rpm a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 5 mL de Etanol 70% a 4°C foram adicionados para lavagem do *pellet* de DNA. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 11.500 rpm a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e então as amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 1 hora para secagem. Após este período, foram adicionados a cada amostra 300 µL de água estéril deionizada e cada amostra foi transferida para tubos *Eppendorf* 1,5 mL.

A concentração de DNA presente em cada tipo de plasmídeo foi medida por meio do espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare Life Sciences). Em seguida, para cada tipo de plasmídeo foi feita uma alíquota de 100 µL com concentração final de DNA de 0,5 µg/ µL a ser utilizada no sequenciamento a seguir.

12.6. SEQUENCIAMENTO II

A partir dos plasmídeo purificados e quantificados, foi realizada a reação de sequenciamento completa do cDNA do gene *SLC26A4* referente à proteína Pendrina presente no vetor. O motivo pelo qual é realizado o sequenciamento completo da proteína se deve à possibilidade da bactéria inserir mutações no momento de sua duplicação. No total, foram sequenciados 14 tipos diferentes de plasmídeos, sendo 07 plasmídeos pTARGET-PDS para análise funcional (pTARGET PDS P142L, pTARGET PDS G149R, pTARGET PDS C282Y,

pTARGET PDS T193I, pTARGET PDS Q413R, pTARGET PDS L445W e pTARGET PDS R776C) e 07 plasmídeos pEYFP-N1-PDS para estudos de co-localização celular (pEYFP-N1 PDS P142L, pEYFP-N1 PDS G149R, pEYFP-N1 PDS C282Y, pEYFP-N1 PDS T193I, pEYFP-N1 PDS Q413R, pEYFP-N1 PDS L445W e pEYFP-N1 PDS R776C). Os *primers* utilizados na reação de sequenciamento e suas respectivas concentrações estão descritos na Tabela 10. Os *primers* 1R, 2R, 2F, 3R, 4F e 981-98F foram utilizados para sequenciar a proteína Pendrina nos dois tipos de vetores, pTARGET e pEYFP-N1, ou seja, nos 14 tipos diferentes de plasmídeos presentes neste trabalho. Com objetivo de verificar se a proteína EYFP se apresenta normal, o *primer* 2192R foi utilizado para sequenciar a região codificante da proteína EYFP presente na estrutura do vetor pEYFP-N1. Portanto, foram sequenciados com este *primer* apenas os 7 vetores pEYFP-N1: pEYFP-N1 PDS P142L, pEYFP-N1 PDS G149R, pEYFP-N1 PDS C282Y, pEYFP-N1 PDS T193I, pEYFP-N1 PDS Q413R, pEYFP-N1 PDS L445W e pEYFP-N1 PDS R776C.

Para o preparo das reações foram utilizados: 6,6 µL de água deionizada, 2,4 µL de DNA da MaxiPrep 0,5 µg/µL e 6 µL do *primer* 5 µM. As amostras foram então enviadas para sequenciamento na Microsynth – Balgach, Suíça. As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador *Applied Biosystems PRISM® 3730 DNA Analyzer* utilizando o Kit *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing* de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Para confirmar inserção da alteração desejada, as sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa *BLAST* disponibilizado pelo *NCBI*. Foram analisadas as sequências de proteínas – *blastx* (link: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&BLAST_PROGRAMS=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome).

13. TRANSFECCÃO

Transfecção é o processo de introdução de material genético (como DNA plasmidial ou construções de siRNA) em células eucarióticas. A transfecção de células animais tipicamente envolve a abertura dos poros da membrana celular para possibilitar a absorção do material genético. A transfecção pode ser realizada por métodos físicos (eletroporação), químicos (co-precipitação por fosfato de cálcio, lipossomos, lipocomplexos) ou biológicos (infecção por vírus). Apenas os métodos químicos de transfecção transiente foram utilizados nesse trabalho: co-precipitação por fosfato de cálcio e lipocomplexos. Vale ressaltar que na transfecção transiente, o DNA plasmidial não é integrado ao DNA genômico da célula transfectada e é degradado 4 a 5 dias após a transfecção.

Para a realização da caracterização funcional e da co-localização celular da Pendrina apresentando diferentes alterações, foram utilizadas para a transfecção as linhagens celulares HEK293 Phoenix e HeLa, respectivamente.

13.1. TRANSFECCÃO PARA CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL: CO-PRECIPITAÇÃO POR FOSFATO DE CÁLCIO

A técnica de co-precipitação por fosfato de cálcio depende da precipitação do DNA plasmidial formado pela interação com íons cálcio. O DNA plasmidial é adicionado a uma solução de cloreto de cálcio e, em seguida combinado a uma solução tamponada com fosfato. Quando as duas soluções são combinadas, um precipitado é formado em aproximadamente 10 minutos, resultante do cálcio carregado positivamente e dos grupos fosfato de carga negativa do DNA. A suspensão do precipitado é então adicionada às células a serem transfectadas (geralmente células aderentes). Os precipitados de DNA são então capazes de entrar na célula por endocitose.

Para possibilitar a realização dos testes funcionais foram utilizadas as células HEK293 Phoenix na transfecção. O método de transfecção realizado foi a co-precipitação por fosfato de cálcio e os plasmídeos utilizados foram: pTARGET PDS P142L, pTARGET PDS G149R, pTARGET PDS C282Y, pTARGET PDS T193I, pTARGET PDS Q413R, pTARGET PDS L445W, pTARGET PDS R776C, pTARGET PDS WT, pTARGET vazio e pEYFP-N1*V.

Segue a lista dos reagentes utilizados na transfecção por fosfato de cálcio:

HBS em solução (Tampão Salino HEPES, do inglês – HEPES Buffered Saline): concentração em 100 mL de água estéril – HEPES 50 mM 1,1915 g; NaCl 140 mM 0,818 g; KCl 0,74 g/L; Na₂HPO₄.2H₂O 1,5 mM 0,0267 g. pH 7,05 ajustado com NaOH.

CaCl₂ 20x: concentração em 100 mL de água estéril – 2H₂O.CaCl₂ 2,5 M 36,8 g.

Água deionizada estéril.

DNA plasmidial: 0,5 µg/µL.

Para iniciar o processo de transfecção, 150 µL de meio HEK foram adicionados alternadamente em placas de 96 poços. Então, 20 µL de células HEK293 Phoenix em suspensão foram pipetados nos poços já contendo o meio. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C a 5% de CO₂.

No dia seguinte, as reações para a transfecção por co-precipitação por fosfato de cálcio foram inicializadas. As células HEK293 Phoenix foram duplamente transfectadas transientemente com um plasmídeo contendo o cDNA que codifica a proteína EYFP*V (pEYFP-N1*V) e um segundo plasmídeo

com o cDNA da proteína Pendrina sem alteração (pTARGET PDS WT) ou com o cDNA da proteína Pendrina alterada (pTARGET PDS P142L, pTARGET PDS G149R, pTARGET PDS C282Y, pTARGET PDS T193I, pTARGET PDS Q413R, pTARGET PDS L445W ou pTARGET PDS R776C) ou com o vetor vazio como controle negativo (pTARGET vazio). O Quadro 1 ilustra em detalhes os ensaios de transfecção dupla. Foram realizadas 10 reações diferentes, sendo que a reação composta pelos plasmídeos pTARGET PDS WT e pTARGET vazio trata-se de reação com ausência de fluoróforo, chamada *background*, a qual terá seus valores estatísticos obtidos nos resultados subtraídos das demais reações.

Quadro 1 – Reações da transfecção dupla realizada em células HEK293 Phoenix.

3 µL pTARGET PDS WT	+	3 µL pEYFP-N1*V	+	7,5 µL 20xCaCl ₂	+	61,5 µL H ₂ O	+	75 µL HBS
3 µL pTARGET vazio	+	3 µL pEYFP-N1*V	+	7,5 µL 20xCaCl ₂	+	61,5 µL H ₂ O	+	75 µL HBS
3 µL pTARGET PDS P142L	+	3 µL pEYFP-N1*V	+	7,5 µL 20xCaCl ₂	+	61,5 µL H ₂ O	+	75 µL HBS
3 µL pTARGET PDS G149R	+	3 µL pEYFP-N1*V	+	7,5 µL 20xCaCl ₂	+	61,5 µL H ₂ O	+	75 µL HBS
3 µL pTARGET PDS C282Y	+	3 µL pEYFP-N1*V	+	7,5 µL 20xCaCl ₂	+	61,5 µL H ₂ O	+	75 µL HBS
3 µL pTARGET PDS T193I	+	3 µL pEYFP-N1*V	+	7,5 µL 20xCaCl ₂	+	61,5 µL H ₂ O	+	75 µL HBS
3 µL pTARGET PDS Q413R	+	3 µL pEYFP-N1*V	+	7,5 µL 20xCaCl ₂	+	61,5 µL H ₂ O	+	75 µL HBS
3 µL pTARGET PDS L445W	+	3 µL pEYFP-N1*V	+	7,5 µL 20xCaCl ₂	+	61,5 µL H ₂ O	+	75 µL HBS
3 µL pTARGET PDS R776C	+	3 µL pEYFP-N1*V	+	7,5 µL 20xCaCl ₂	+	61,5 µL H ₂ O	+	75 µL HBS
3 µL pTARGET PDS WT	+	3 µL pTARGET vazio	+	7,5 µL 20xCaCl ₂	+	61,5 µL H ₂ O	+	75 µL HBS

Após o preparo das reações, as mesmas foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 12 µL de cada reação em uma fileira em poços alternados das placas, como mostra a Figura 29. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 48 horas, 5% de CO₂. O ensaio funcional foi realizado 48 horas após a transfecção.

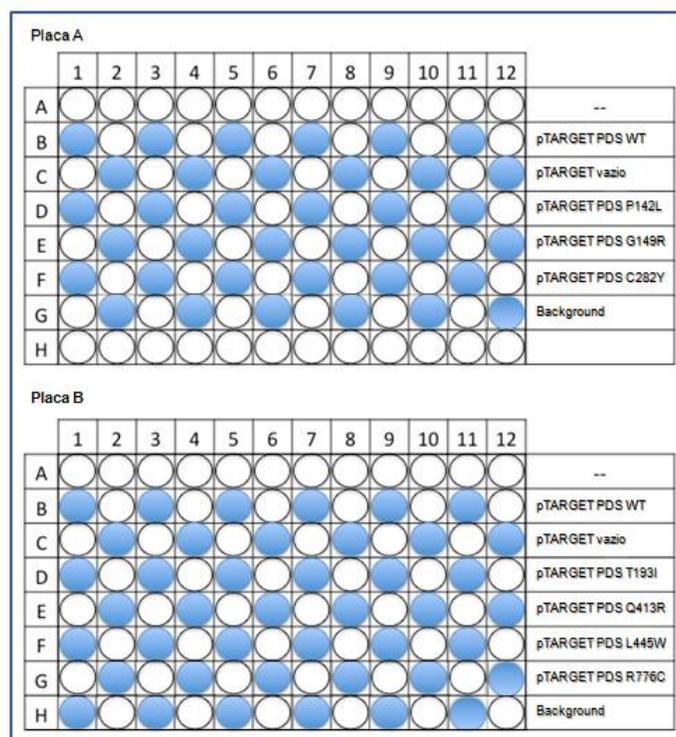


Figura 29 – Distribuição em placas das reações de transfecção por fosfato de cálcio.

A cada experimento, foram utilizadas quatro placas iguais, sendo A ou B, pois não eram realizados experimentos com ambas as placas no mesmo dia. Foram realizados 4 diferentes experimentos para cada placa, totalizando 16 placas A e 16 placas B.

13.2. TRANFECÇÃO PARA CO-LOCALIZAÇÃO CELULAR: METAFECTENE® - PRO

METAFECTENE® PRO (Biontex) é a última geração de reagentes de transfecção altamente avançada, que define novos padrões na transfecção de células eucarióticas. Na transfecção, o DNA e o reagente METAFECTENE® PRO formam um complexo, o qual será capaz de entrar na célula. A

minimização de toxicidade é um pré-requisito fundamental para um reagente de transfecção moderno, projetado para a máxima eficiência e adequação para uma ampla gama de aplicações. A composição de METAFECTENE® PRO (lipídios catiônicos e co-lipídios em água) é uma combinação da tecnologia RMA (maximiza a eficiência da transfecção, do inglês – *Repulsive Membrane Acidolysis*) aos princípios básicos da tecnologia TOP (Módulo de Otimização da Toxicidade, do inglês – *Toxicity Optimization Module*), que visam o melhoramento da biodegradabilidade imitando elementos estruturais naturais, garantindo aumento significativo na tolerância das células. Portanto, as alterações físico-químicas resultam em menor estabilidade do complexo lipídico dentro da célula e, assim, aumentam a eficiência de entrada do DNA no citoplasma. Além de melhorar a eficiência da transfecção da célula, a característica principal da METAFECTENE® PRO é o aumento substancial da taxa de expressão do transgene por célula (link: http://www.biontexas.com/con_4_6_4/cms/upload/pdf/Manual_METAFECTENE-PRO_en.pdf).

Para possibilitar a realização da co-localização celular foram utilizadas as células HeLa na transfecção. O método de transfecção realizado foi por meio de METAFECTENE® PRO e os plasmídeos utilizados foram: pEYFP-N1 PDS P142L, pEYFP-N1 PDS G149R, pEYFP-N1 PDS C282Y, pEYFP-N1 PDS T193I, pEYFP-N1 PDS Q413R, pEYFP-N1 PDS L445W, pEYFP-N1 PDS R776C, pEYFP-N1 PDS WT e pEYFP-N1 vazio.

Para iniciar o processo de transfecção, 2 mL de meio HEK foram adicionados em placas de 06 poços. Então, 600 µL de células HeLa em suspensão foram pipetados nos poços já contendo o meio. As placas foram incubadas *durante a noite* a 37°C a 5% de CO₂.

No dia seguinte, as reações para a transfecção por meio do reagente METAFECTENE® PRO foram inicializadas. Primeiramente, as placas contendo

células HeLa foram analisadas ao microscópio invertido para confirmação da confluência ideal necessária para o início da transfecção: 90 – 100%. Em seguida, foram preparados 2 tubos 0,5 mL *Eppendorf* para cada plasmídeo, sendo 1 tubo para preparação da Solução A e o outro para a Solução B. Todos os reagentes foram deixados à temperatura ambiente. A Solução A foi realizada a partir de 100 µL de meio MEM 0/0 (meio livre de soro e de antibiótico) e 3 µL de DNA plasmidial a 0,5 µg/µL. A Solução B foi realizada a partir de 100 µL de meio MEM 0/0 e 3 µL de METAFECTENE® PRO. Então, cada Solução A preparada foi adicionada cuidadosamente ao tubo de Solução B correspondente. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos para que os complexos DNA e lipídeos pudessem ser formados. Após o período de incubação, cada uma das 09 soluções completas de transfecção (Solução A+B) foi adicionada em um poço das placas contendo a cultura de células HeLa (Figura 30). As placas foram então incubadas por 8 horas a 37°C a 5% de CO₂. Neste período, o DNA e o reagente METAFECTENE® PRO formam um complexo que possibilitará a entrada do DNA plasmidial nas células HeLa.

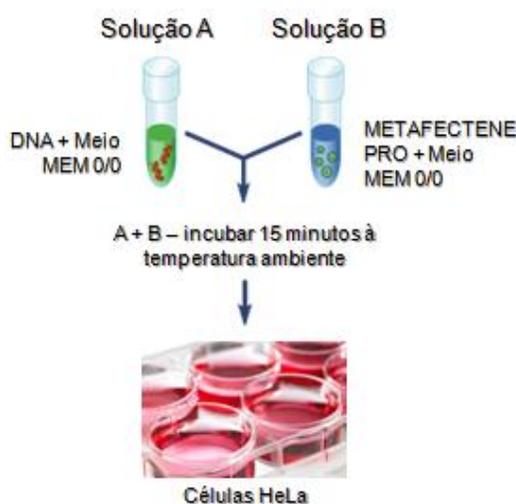


Figura 30 – Método de transfecção por meio de METAFECTENE® PRO.

Em seguida às 8 horas de incubação, o meio da cultura celular foi trocado. O meio presente em cada poço da placa foi aspirado e 2 mL de novo meio de cultura Hek foram adicionados. Este processo foi realizado para que ocorresse a remoção do excesso de reagentes da transfecção, evitando qualquer tipo de toxicidade celular. As placas foram novamente incubadas a 37°C a 5% de CO₂, porém pelo período de 48 horas.

Após 56 horas do período de transfecção, as células transfectadas foram transferidas para outras placas contendo 1 lamínula circular de 30 mm em cada poço (Figura 31). Primeiramente, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 2 mL de PBS. Então foram adicionadas 4 gotas de tripsina para desgrudar as células aderidas à placa, ou seja, para colocá-las em suspensão. Após aproximadamente 3 minutos, a placa foi observada em microscópio invertido para confirmar se as células estavam em suspensão. Em seguida, a fim de parar a ação da tripsina, 1 mL de meio de cultura Hek foi adicionado. O volume total de 700 µL foi transferido para um poço da placa nova contendo a lamínula circular e 2 mL de meio de cultura Hek. As novas placas foram então incubadas a 37°C a 5% de CO₂ durante a noite. A co-localização celular foi realizada no dia seguinte, ou seja, 72 horas após a transfecção. A transferência das células transfectadas foi realizada para que as células ficassem aderidas à lamínula, uma vez que os ensaios de co-localização celular são realizados no microscópio confocal e apenas a lamínula é agregada ao mesmo para possibilitar a análise.

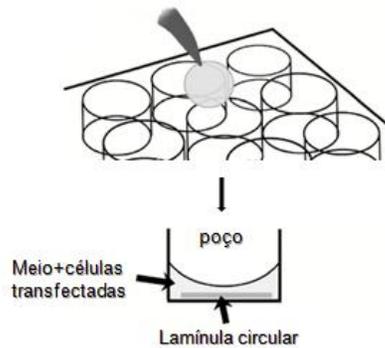


Figura 31 – Transferência de células transfectadas para lamínula circular.

Para cada plasmídeo estudado, foram realizadas 3 diferentes transfecções e, portanto, 3 diferentes ensaios de co-localização celular.

14. TESTE FUNCIONAL

Os efeitos dos compostos selecionados na atividade transportadora da Pendrina foram investigados por meio de um método de alto desempenho desenvolvido pela Profa. Dra. Silvia Dossena e colaboradores em 2006. Este método foi utilizado para a análise da atividade de transporte da proteína Pendrina de cloreto/iodeto. Primeiramente, o ensaio foi instituído para medições em células individuais com o uso de um microscópio confocal (Dossena et al, 2006) e, mais tarde, modificado para uma abordagem de alto rendimento em uma placa de 96 poços, com a ajuda de um leitor de placa (Dossena, Bizhanova, Nofziger, et al, 2011; Dossena, Nofziger, Tamma, et al, 2011; Dossena, Nofziger, Brownstein, Avraham, e Paulmichl, 2011).

O ensaio permite a medição da atividade do transporte da proteína Pendrina determinando as alterações na concentração intracelular de iodeto, devido à exposição das células à elevada concentração de iodeto no meio extracelular. As alterações na concentração intracelular do ânion são detectadas graças à sensibilidade peculiar de uma proteína amarelo fluorescente modificada EYFP*V (YFP). Esta proteína é uma isoforma de EYFP que confere maior sensibilidade aos halogênios intracelulares, em particular, o iodeto, que diminui a fluorescência emitida pelo fluoróforo excitado (Galiotta, Haggie, & Verkman, 2001). Tal característica peculiar pode ser explorada no ensaio para a determinação da variação da concentração intracelular de iodeto devido à presença de um transportador ativo, a proteína Pendrina.

Os reagentes utilizados nos ensaios funcionais da proteína Pendrina foram:

Solução isotônica de alta concentração de cloreto (do inglês – *Isotonic High Chloride Solution*): NaCl 135 mM, KCl 2 mM, HEPES 20 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, Glicose 10 mM.

Solução isotônica de alta concentração de iodeto (do inglês – *Isotonic High Iodide Solution*): NaI 135 mM, KCl 2 mM, HEPES 20 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, Glicose 10 mM.

Durante os ensaios funcionais da Pendrina, primeiro as células são banhadas em solução *High Chloride* para medir a fluorescência basal de EYFP*V, em seguida, a solução *High Iodide* é injetada, aumentando a concentração extracelular de iodeto a 90 mM. Na presença da proteína Pendrina WT, ocorre o transporte do iodeto extracelular para dentro da célula, levando ao aumento da concentração intracelular de iodeto e à diminuição de fluorescência emitida pelo EYFP*V. O nível de atividade do transportador, ou seja, da Pendrina, é

proporcional à diminuição da fluorescência registrada após a injeção de iodeto na solução extracelular (Figura 32). Se a Pendrina for funcional, a fluorescência irá diminuir após a injeção de iodeto. Por outro lado, se alguma alteração interferir na função normal da Pendrina, não haverá transporte do iodeto para o interior da célula e, conseqüentemente, a fluorescência não será diminuída.

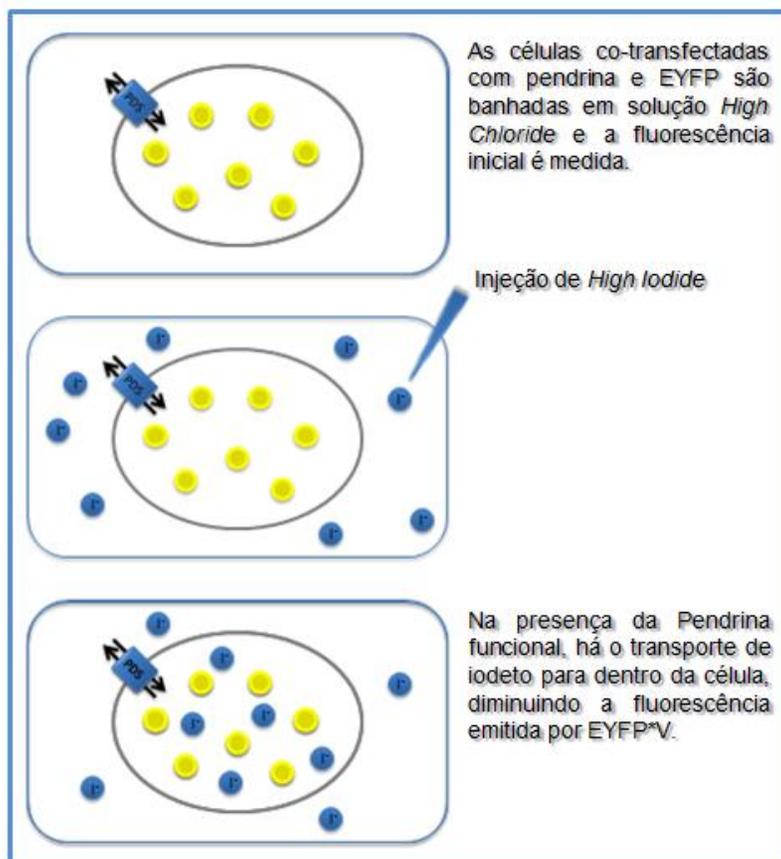


Figura 32 – Representação esquemática dos ensaios funcionais envolvendo a proteína Pendrina.

Os ensaios funcionais da proteína Pendrina foram realizados após 48 horas da transfecção. Nestes ensaios foi analisada uma placa por vez. Primeiramente, o meio de cultura Hek foi removido de cada poço da placa por sucção. Então, foram adicionados a cada poço 150 μ L de solução isotônica *High*

Chloride, que foram removidos em seguida. Este processo foi repetido 3 vezes para que o meio fosse completamente removido das células. Após as 3 lavagens, 70 µL de *High Chloride* foram pipetados nos poços e a placa foi inserida ao leitor de placas VICTOR X3 (do inglês – *Multilabel Plate Reader*, Perkin Elmer). Este aparelho trata-se de um fluorímetro que realiza a leitura de fluorescência celular, o mesmo foi equipado com um dispensador de líquidos e com os seguintes filtros: excitação – F485 (centro de comprimento de onda de excitação (CWL, do inglês – **Center Wavelength**): 485 nm, largura de banda de: 14 nm) e emissão – F535 (emissão CWL: 535 nm, largura de banda de 25 nm). Foram realizadas 3 medições de fluorescência antes da injeção de *High Iodide* para quantificar a fluorescência basal de EYFP*V. Em seguida, foram injetados em cada poço da placa 140 µL de *High Iodide* por meio do dispensador automático de líquidos e 14 medições de fluorescência foram realizadas. Vale ressaltar que cada medição equivale a 1 segundo, ou seja, para realizar a medição de fluorescência de um poço da placa, passam-se 17 segundos.

Após completar as medições de fluorescência da placa, os dados foram apresentados de forma numérica no computador integrado ao equipamento VICTOR X3. Então, as análises estatísticas foram empregadas utilizando planilhas Microsoft Excel e um programa denominado *GraphPad Prism Software* (versão 4.00 para Windows, San Diego California USA) que combina análise estatística, organização de dados e geração de gráficos. Primeiramente, foi calculada a média dos valores do *background* (pTARGET PDS WT + pTARGET vazio), que foi subtraída da medida fluorimétrica de cada amostra (de cada poço). Após subtração dos valores do *background*, a média das 3 primeiras medições (antes da injeção de *High Iodide*) foi calculada, assim como a média das 3 últimas medições. A partir destes valores, foi obtido o resultado em porcentagem da diminuição da fluorescência de cada amostra (de cada poço). Por fim, a diferença estatisticamente significativa entre os diferentes plasmídeos analisados foi

calculada por meio da análise de variância (*One-way ANOVA*, do inglês – ***Analysis of Variance***) seguido do método de comparação múltipla de Bonferroni. A análise de variância *One-way ANOVA* permitiu avaliar se há ou não diferença estatística entre os diferentes plasmídeos estudados. Já o teste de Bonferroni possibilitou analisar as diferenças entre cada tratamento estudado, ou seja, viabilizou a comparação entre um determinado plasmídeo e outro.

15. Co-LOCALIZAÇÃO CELULAR

Os ensaios de co-localização celular foram analisados por imagens obtidas por meio do microscópio confocal TCS-SP5 II (Leica Microsystems) e de um software de co-localização (Leica LAS AF, do inglês – ***Leica Application Suite Advanced Fluorescence***).

O microscópio confocal Leica TCS SP5 II (Figura 33) abrange uma ampla variedade de requisitos de imagem confocal com toda a gama de velocidades de digitalização de alta resolução. Com elevada eficiência de detecção, o sistema proporciona imagens brilhantes sem ruído com o mínimo de danos fotográficos em alta velocidade. O microscópio confocal Leica é capaz de produzir imagens fluorescentes de uma variedade de materiais de amostras biológicas, como células e tecidos. O Leica TCS SP5 II fornece imagens de alta resolução por microscopia de fluorescência, tanto para células fixadas e marcadas com sondas fluorescentes, quanto para células vivas contendo indicadores funcionais e/ou moléculas conjugadas com GFP e derivados.

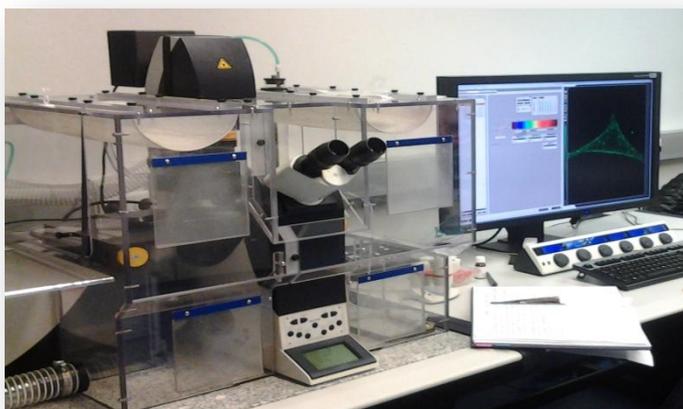


Figura 33 – Microscópio confocal Leica TCS SP5 II evidenciando a imagem de localização celular da proteína Pendrina.

A lente objetiva utilizada nos ensaios de co-localização celular foi a HCX PL APO 63x/1.20 CORR W CS – BL de imersão em água. A co-localização celular foi realizada após 72h da transfecção. Os reagentes utilizados neste processo foram:

Solução HBSS (Solução Salina Balanceada de Hank's, do inglês – **Hank's Balanced Salt Solution**): utilizada como tampão, H1387 Sigma – Aldrich.

Solução Krebs – Henseleit: utilizada como tampão, K3753 Sigma – Aldrich.

CellMask™ Deep Red Plasma Membrane Stain com 5 mg/μL de DMSO (Dimetil Sulfoxido, do inglês – **Dimethyl Sulfoxide**): corantes de natureza lipofílica utilizados para corar a membrana plasmática da célula, C10046 Invitrogen.

ER-Tracker Red Dye For Live-cell Endoplasmic Reticulum Labeling: permite corar o retículo endoplasmático da célula, E34250 Invitrogen.

Antes da visualização das imagens evidenciando a expressão da proteína Pendrina por meio do microscópio confocal, cada tipo de plasmídeo teve sua membrana plasmática corada. Os experimentos foram realizados com um tipo de plasmídeo por vez. Primeiramente, foi preparada a solução capaz de corar a membrana plasmática das células: 1 mL de HBSS a 4°C e 0,25 µL de CellMask™ Deep Red Plasma Membrane Stain, a solução foi deixada em gelo. Em seguida, a lamínula circular contendo as células transfectadas aderidas foi transferida para uma nova placa. Então, foram adicionados 2 mL de HBSS a 4°C, que foram removidos em seguida. Este processo foi repetido 3 vezes para que o meio fosse completamente removido das células. Após as 3 lavagens, foi adicionado 1 mL da solução corante e a placa foi incubada em gelo por 5 minutos. Em seguida, a solução corante foi removida e novamente foram realizadas 3 lavagens com 2 mL de HBSS a 4°C para que a solução corante fosse completamente removida do meio. Por fim, a lamínula circular foi inserida juntamente com 1 mL de HBSS à temperatura ambiente em um suporte POC-Mini-2 (Figura 34) pertencente ao microscópio confocal.



Figura 34 – Suporte POC-Mini-2 do microscópio confocal para lamínula circular.

Para a detecção das imagens foram seguidos alguns critérios. O *laser* Argon 514 nm (525 – 600 nm) foi utilizado para detectar as imagens de YFP, ou seja, da Pendrina. O *laser* utilizado para visualizar a membrana plasmática foi o HeNe 633 nm (655 – 750 nm). O pico de emissão da membrana foi detectado de

649 a 666 nm. Portanto, duas imagens foram criadas, uma mostrando o local de expressão da proteína Pendrina e outra evidenciando a membrana plasmática corada. Sabendo que a Pendrina é uma proteína de membrana, no momento em que foi solicitado ao programa realizar a co-localização das duas imagens, se a Pendrina se mostrava em seu local de expressão normal, ou seja, na membrana, as duas imagens ficavam sobrepostas. Porém, em casos em que foi visto que a Pendrina não se expressava na membrana, ficando retida nos compartimentos subcelulares da célula, as duas imagens obtidas não se sobrepueram. Nestes casos, a transfecção foi realizada novamente e ao invés de corar a membrana plasmática das células, o retículo endoplasmático foi corado com *ER-Tracker Red Dye For Live-cell Endoplasmic Reticulum Labeling*.

Primeiramente, foi preparada a solução capaz de corar o retículo endoplasmático das células: 1 mL de Krebs – Henseleit a 37°C e 1 µL de *ER-Tracker Red Dye For Live-cell Endoplasmic Reticulum Labeling*. Em seguida, a lamínula circular contendo as células transfectadas aderidas foi transferida para uma nova placa. Então, foram adicionados 2 mL de HBSS à temperatura ambiente, que foram removidos em seguida. Este processo foi repetido 3 vezes para que o meio fosse completamente removido das células. Após as 3 lavagens, foi adicionado 1 mL da solução corante e a placa foi incubada a 37°C por 20 minutos. Em seguida, a solução corante foi removida e novamente foram realizadas 3 lavagens com 2 mL de HBSS à temperatura ambiente para que a solução corante fosse completamente removida do meio. Por fim, a lamínula circular foi inserida juntamente com 1 mL de HBSS à temperatura ambiente ao suporte POC-Mini-2 e as duas imagens foram obtidas, sendo uma da proteína Pendrina expressa no retículo e outra do retículo corado, possibilitando a co-localização celular. O *laser* utilizado para visualizar o retículo endoplasmático foi o DPSS 561 nm (571 – 650 nm). O pico de emissão da membrana foi detectado a 630 nm.

Na co-localização celular, as imagens de cada fluorocromo são chamadas de canais, YFP - Pendrina é o canal verde e a membrana plasmática corada ou o retículo endoplasmático corado é o canal vermelho. A intensidade de sinal dos canais vermelho e verde em cada pixel de uma imagem é representada como um citofluorograma, o qual indica o grau de co-localização celular de duas variáveis. Na ausência de co-localização, a dispersão dos pixels se mostrará de acordo com a Figura 35-A. No caso de perfeita co-localização, a dispersão será uma linha reta, como indica a Figura 35-B.

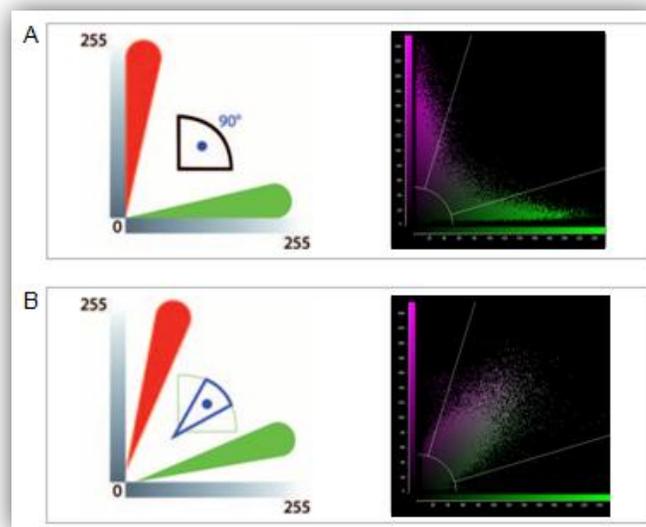


Figura 35 – Citofluorogramas obtidos por meio do microscópio confocal pelo programa LAS AF. (A) variáveis não co-localizadas, pixels divergentes. (B) variáveis co-localizadas, pixels centralizados em uma reta.

No momento em que o programa realizou a co-localização da proteína Pendrina com a membrana plasmática corada ou com o retículo endoplasmático corado, um valor estatístico foi gerado pelo programa LAS AF por meio da Correlação de Pearson (sigla PC, do inglês – *Pearson's Correlation*). A fração de

sobreposição dos pixels é muitas vezes referida como porcentagem de co-localização, mas não faz distinção entre sobreposição aleatória ou verdadeira. Uma medida aplicada para identificar a veracidade dos pixels co-localizados é a Correlação de Pearson. Esta é uma medida de correlação estatística amplamente utilizada na análise de imagens que foi introduzida à microscopia de fluorescência por Manders e colaboradores em 1993. A correlação de Pearson testa se realmente existe uma correlação linear entre a intensidade do sinal vermelho e a intensidade do sinal verde em cada pixel. A PC pode ser calculada sobre todos os pixels na imagem ou em regiões de interesse (sigla ROI, do inglês – *Region of Interest*) especificadas pelo usuário. Ele varia de -1 a 1: uma PC > 0 indica co-localização e a PC igual a 1 mostra a perfeita co-localização.

16. RASTREAMENTO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *SLC26A4*

A região promotora do gene *SLC26A4*, compreendida em 2.556 pb, foi rastreada em 4 pacientes que não apresentaram diagnóstico esclarecido: 15AA, 16AA, 18AA e L1AA. Primeiramente foi realizada a reação em cadeia da polimerase utilizando os *primers* 4F e 9R (2.631 pb) descritos na Tabela 11. Em seguida, esta região foi sequenciada utilizando *primers* internos.

Tabela 11 – Sequências de *primers* utilizados para rastrear a região promotora do gene *SLC26A4*.

PRIMERS	SEQUÊNCIAS (5' – 3')
4FWD	AAAGGAGACACAGTGCTTGCCCT
6FWD	TTGAAGATCTGTTGAAAGC
7FWD	ATAGAAACCTGGCCATTG
9FWD	TTTCTGAGACGCCGAGAGC
11FWD	GTCCCCTTCCAGCCTTGCAAGCGCCTTTGG
5REV	ACTGGACTACATGGAAATC
9REV	CGGCCGCGACACCATGTAGC

Legenda: (FWD) *primer* direto, do inglês – *forward*; (REV) *primer* reverso, do inglês – *reverse*.

A amplificação da região promotora do gene *SLC26A4* consistiu em 30 ciclos usando 200 a 500ng de DNA genômico, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20pmol de cada *primer* (direto e reverso), 2,5U de enzima Taq DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 1,5mM de MgCl₂ e 2,5% do volume total de reação de DMSO, completando com água deionizada até o volume final de reação de 60µL. Na amplificação dos fragmentos foram utilizados os ciclos de amplificação determinados de acordo com a T_m de cada *primer* a ser utilizado, como mostrado na Figura 36.

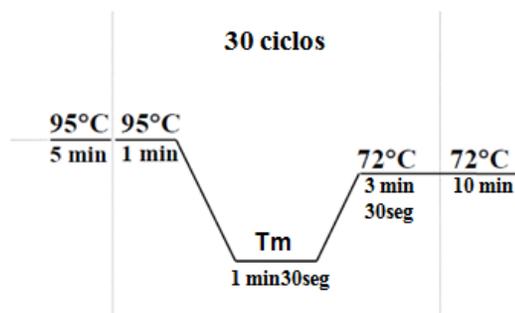


Figura 36 – Ciclo de amplificação para o rastreamento da região promotora do gene *SLC26A4*.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O gel foi corado em solução diluída de Brometo de Etídio (0,5g/mL) durante 20 minutos, sendo visualizado em transluminador de luz ultravioleta e fotografado com câmera digital EDAS-Kodak.

Posteriormente ao PCR, a detecção das mutações na região promotora do gene *SLC26A4* foi realizada por meio de sequenciamento (ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer).

RESULTADOS

Foram analisados 60 indivíduos. Todos apresentaram perda auditiva sensorioneural profunda bilateral. O aqueduto vestibular alargado foi identificado somente nos 30 pacientes do Grupo II por meio de exames de imagem. Destes, 29 indivíduos apresentaram aqueduto vestibular alargado bilateral e apenas o paciente 16AA apresentou esta anormalidade de forma unilateral.

1. RASTREAMENTO INICIAL

Inicialmente todos os pacientes foram rastreados quanto à presença de mutações no gene *GJB2*, deleções envolvendo o gene *GJB6* e mutação mitocondrial A1555G no gene *MTRNR1*, as quais representam as principais causas de surdez de origem genética. A tabela 12 apresenta os resultados positivos obtidos no rastreamento molecular inicial dos Grupos I e II.

Tabela 12 – Resultados positivos obtidos no rastreamento inicial dos Grupos I e II.

Grupos	Paciente	<i>GJB2</i>	Mit. A1555G	del1/del2
Grupo I	C5	M34T /N	N	N/N
	C10	M34T /N	N	N/N
	C26	35delG /N	N	N/N
Grupo II	1AA	V37I /N	N	N/N
	L8AA	35delG /N	N	N/N

2. RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE *SLC26A4*

Apesar de terem sido encontradas mutações no gene *GJB2* em pacientes do Grupo I e do Grupo II, nenhum desses pacientes foi descartado do rastreamento do gene *SLC26A4*, uma vez que, as mutações encontradas apresentaram-se em heterozigose, e, portanto, podem não justificar a surdez nesses pacientes. A tabela 13 a seguir apresenta os resultados positivos obtidos no rastreamento de mutações da região codificante do gene *SLC26A4* nos pacientes dos Grupos I e II.

Tabela 13 – Resultados do rastreamento da região codificante do gene *SLC26A4* dos pacientes dos Grupos I e II.

Pacientes	EVA	Alelo 1	Alelo 2	Mutação em outros genes estudados
C01	-	V609G	N	Não
C04	-	V609G	N	Não
C09	-	V609G	N	Não
C15	-	V138F	N	Não
C25	-	C282Y	N	35delG/N(<i>GJB2</i>)
02AA	B	T410M	IVS15+5G>A	Não
06AA	B	V138F	Q413R	Não
15AA	B	R776C	N	Não
16AA	U	G149R	N	Não
18AA	B	T193I	N	Não
21AA	B	P142L	279delT	Não
22AA	B	R409H	R409H	Não
24AA	B	L445W	IVS8+1G>A	Não
L1AA	B	V609G	N	Não

Legenda: (EVA) aqueduto vestibular alargado; (B) bilateral; (U) unilateral; (N) normal.

2.1. RESULTADOS DO GRUPO I – INDIVÍDUOS COM PERDA AUDITIVA SEM AQUEDUTO VESTIBULAR ALARGADO

Dentre os indivíduos que não apresentam aqueduto vestibular alargado, apenas três diferentes alterações em heterozigose foram encontradas em cinco indivíduos. A primeira foi a mutação V609G localizada no exon 17 do gene *SLC26A4* (Figura 37). Esta alteração foi detectada nos indivíduos C01, C04 e C09 e trata-se da troca da base timina para guanina, resultando na troca do aminoácido Valina para Glicina.

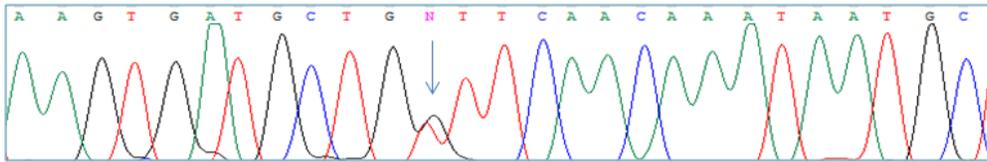


Figura 37 – Eletroferograma mostrando a alteração V609G em heterozigose no exon 17 do gene *SLC26A4*.

A segunda alteração foi encontrada no exon 04 do paciente C15. Trata-se da alteração V138F (Figura 38), a qual refere-se à troca de uma base guanina por uma base timina na posição 412 do gene *SLC26A4*. Esta mutação resulta na troca do aminoácido Valina por Fenilalanina no códon 138.

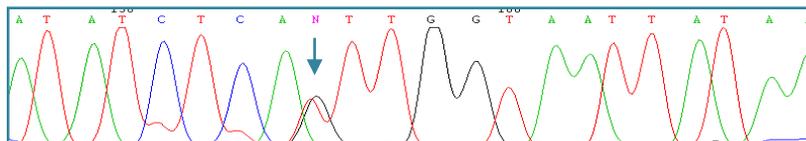


Figura 38 – Eletroferograma mostrando a mutação V138F no exon 04 do gene *SLC26A4* do paciente C15.

A terceira alteração encontrada no Grupo I foi a mutação C282Y localizada no exon 07 do gene *SLC26A4* (Figura 39). Esta alteração foi

primeiramente detectada neste trabalho, uma vez que ainda não foi descrita na literatura. A mutação C282Y foi detectada no indivíduo C26 e trata-se da troca da base guanina para adenina, resultando na troca do aminoácido Cisteína para Tirosina. Vale ressaltar que, além desta alteração, o paciente C26 também apresenta a mutação 35delG em heterozigose no gene *GJB2*.

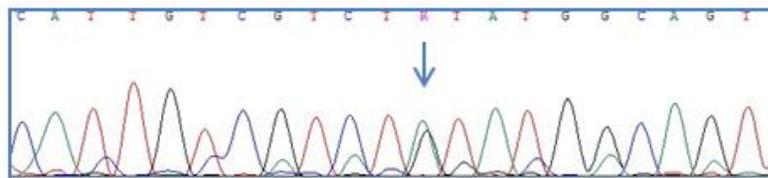


Figura 39 – Eletroferograma mostrando a mutação C282Y no exon 07 do gene *SLC26A4* do paciente C26.

2.2. RESULTADOS DO GRUPO II – INDIVÍDUOS COM PERDA AUDITIVA COM AQUEDUTO VESTIBULAR ALARGADO

Foram encontradas 13 diferentes alterações em 09 pacientes do Grupo II. No total, 04 indivíduos apresentaram alterações em apenas um alelo (heterozigotos) e 05 pacientes apresentaram alterações nos dois alelos, sendo 04 indivíduos heterozigotos compostos e 01 indivíduo homozigoto mutante.

O indivíduo 02AA apresentou 2 alterações em heterozigose no gene *SLC26A4*, uma no intron 15 e outra no exon 10. A alteração encontrada no intron 15 (Figura 40) trata-se da mutação IVS15 + 5G>A, a qual refere-se à troca de uma guanina por uma adenina na região de *splicing* do gene.

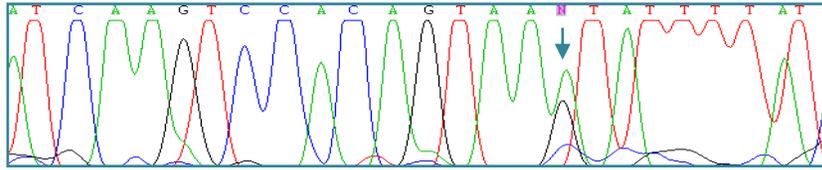


Figura 40 – Eletroferograma mostrando a mutação IVS15 + 5G>A em heterozigose no intron 15 do gene *SLC26A4* do paciente 02AA.

No exon 10 do indivíduo 02AA foi encontrada a mutação T410M (Figura 41) em heterozigose que resulta na troca de uma base citosina por uma base timina na posição 1229 do gene *SLC26A4*. Esta mutação resulta na troca do aminoácido Tirosina por Metionina.

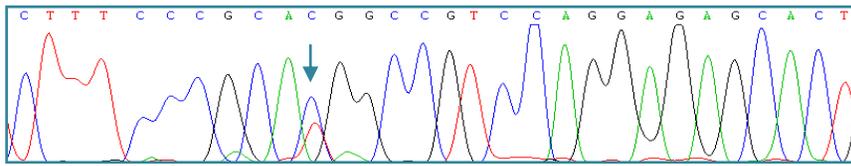


Figura 41 – Eletroferograma evidenciando a mutação T410M em heterozigose no exon 10 do gene *SLC26A4* do paciente 02AA.

O indivíduo 06AA apresentou duas alterações em heterozigose no gene *SLC26A4*, uma no exon 4 e outra no exon 10. A alteração encontrada no exon 4 trata-se da mutação V138F, a qual também foi detectada no paciente C15 do Grupo I (Figura 32).

A outra mutação identificada no indivíduo 06AA, Q413R, foi observada em heterozigose no exon 10 (Figura 42) do gene *SLC26A4*. Essa mutação está localizada na posição 1238 do gene, no códon 413 e resulta na troca do aminoácido Glutamina por Arginina, em consequência da mudança da base adenina para guanina.

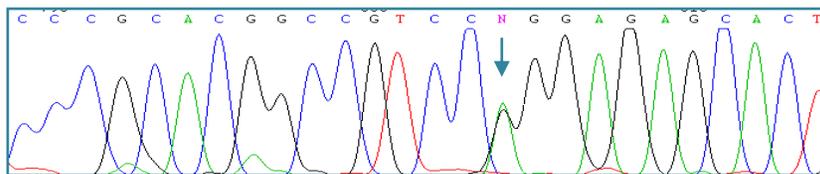


Figura 42 – Eletroferograma mostrando a mutação Q413R em heterozigose no exon 10 do gene *SLC26A4* do paciente 06AA.

No indivíduo 15AA foi encontrada a mutação R776C em heterozigose no exon 21. Essa alteração (Figura 43) trata-se da troca de uma base citosina por timina, resultando na troca do aminoácido Arginina por Cisteína.

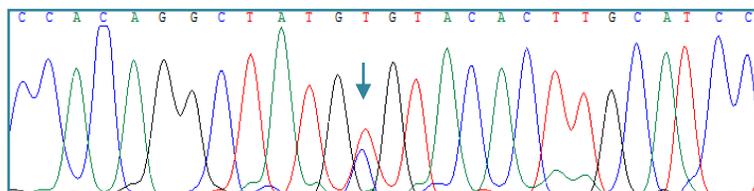


Figura 43 – Eletroferograma evidenciando a mutação R776C em heterozigose no exon 21 do gene *SLC26A4* do paciente 15AA.

No indivíduo 16AA foi encontrada uma alteração ainda não descrita na literatura, a mutação G149R (Figura 44). Esta mutação foi detectada em heterozigose e trata-se da troca de uma base guanina pela base adenina no códon 149 do gene *SLC26A4*. Esta alteração resulta na mudança do aminoácido Glicina por Arginina.

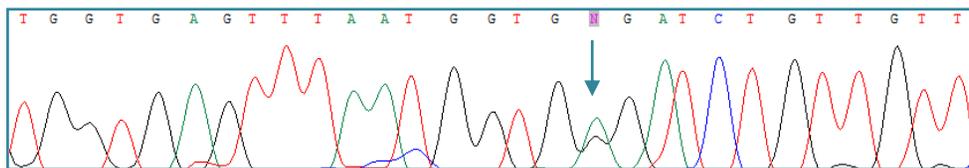


Figura 44 – Eletroferograma mostrando a mutação G149R em heterozigose no exon 05 do gene *SLC26A4* do paciente 16AA.

O indivíduo 18AA apresentou a mutação T193I em heterozigose no exon 05. Essa alteração (Figura 45) trata-se da troca de uma base citosina por timina, resultando na troca do aminoácido Treonina por Isoleucina.

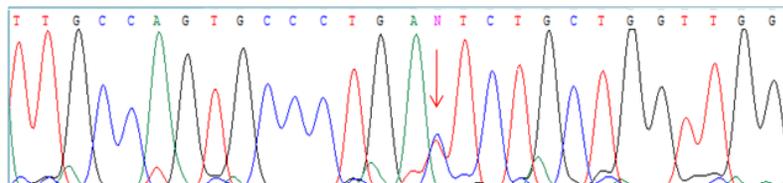


Figura 45 – Eletroferograma mostrando a mutação T193I em heterozigose no exon 05 do gene *SLC26A4* do paciente 18AA.

Duas alterações em heterozigose foram encontradas no indivíduo 21AA, uma no exon 03 e outra no exon 05. A alteração detectada no exon 03, 279delT (Figura 46), trata-se da deleção de uma base timina na posição 279 do gene *SLC26A4*. Esta deleção altera o quadro de leitura do mRNA (*frameshift*) gerando um *stop codon* três aminoácidos depois.

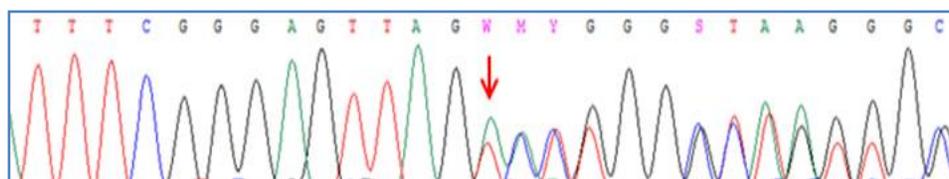


Figura 46 – Eletroferograma mostrando a deleção 279delT em heterozigose no exon 03 do gene *SLC26A4* do paciente 21AA.

A outra alteração encontrada no indivíduo 21AA, P142L (Figura 47), está localizada no exon 05 do gene *SLC26A4* e trata-se da troca da base citosina pela base timina, resultando na troca do aminoácido Prolina por Leucina. Esta mutação ainda não foi descrita na literatura.

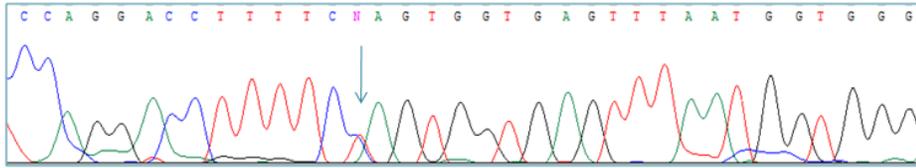


Figura 47 – Eletroferograma mostrando a alteração P142L em heterozigose no exon 05 do gene *SLC26A4* do paciente 21AA.

O indivíduo 22AA apresentou uma mutação em homozigose no exon 10. A alteração R409H (Figura 48) trata-se da troca da base guanina pela base adenina, resultando na troca do aminoácido Arginina por Histidina.

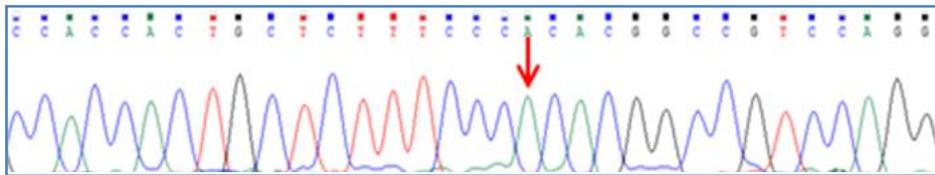


Figura 48 – Eletroferograma mostrando a alteração R409H em homozigose no exon 10 do gene *SLC26A4* do paciente 22AA.

O indivíduo 24AA apresentou duas alterações em heterozigose, IVS8+1G>A no intron 08 e L445W no exon 11. A primeira alteração, IVS8+1G>A (Figura 49), refere-se à troca de uma base guanina por uma base adenina no intron 08 na região de *splicing* do gene *SLC26A4*.

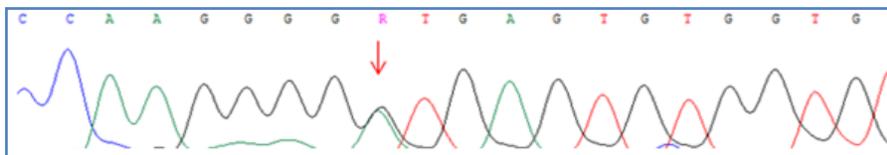


Figura 49 – Eletroferograma mostrando a mutação IVS8 + 1G>A em heterozigose no intron 08 do gene *SLC26A4* do paciente 24AA.

A segunda alteração detectada no indivíduo 24AA, a L445W (Figura 50), refere-se à troca de uma base timina por uma base guanina no exon 11 do gene *SLC26A4* e foi encontrada em heterozigose.

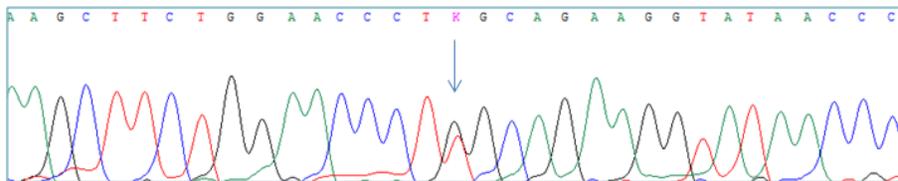


Figura 50 – Eletroferograma mostrando a alteração L445W em heterozigose no exon 11 do gene *SLC26A4* do paciente 24AA.

Por fim, no paciente L1AA foi encontrada a mutação V609G em heterozigose localizada no exon 17 do gene *SLC26A4* (Figura 37), a qual também foi detectada nos pacientes C01, C04 e C09 do Grupo I.

2.3. MODELO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA PENDRINA

O modelo da proteína Pendrina proposto por Dossena e colaboradores (2009) e as alterações encontradas no gene *SLC26A4* neste trabalho estão ilustrados na Figura 51.

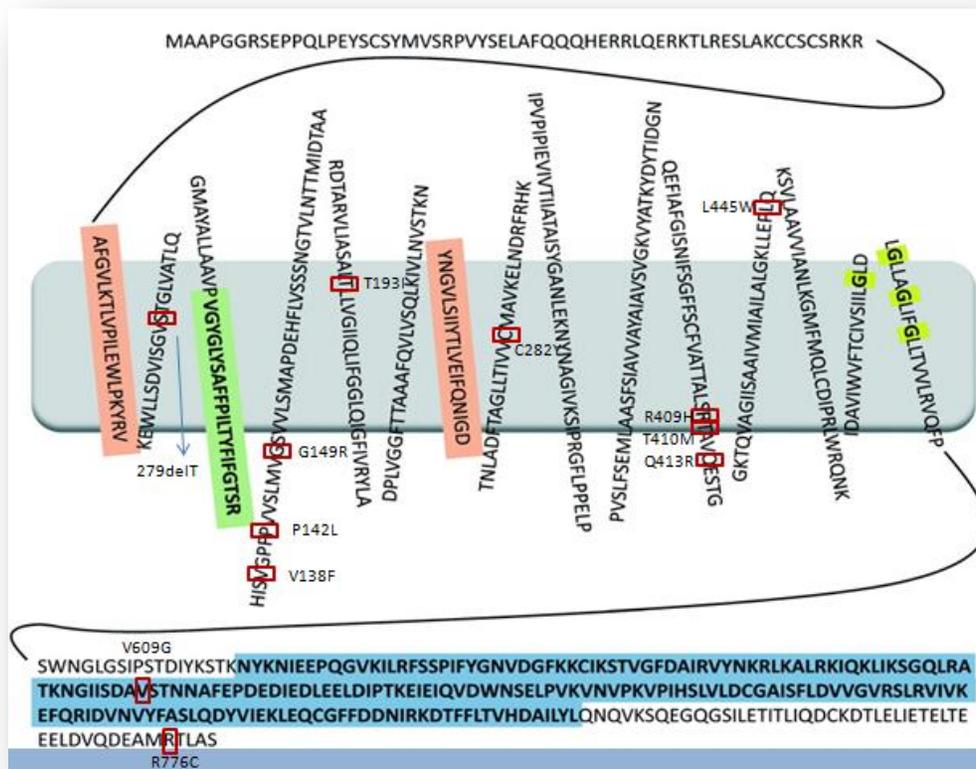


Figura 51 – Topologia da proteína Pendrina e alterações encontradas na região codificante do gene *SLC26A4*.

3. RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NOS GENES *FOXI1* E *KCNJ10*

Os resultados positivos obtidos no rastreamento dos genes *FOXI1* e *KCNJ10* nos pacientes dos Grupos I e II estão evidenciados na Tabela 14. Nenhum paciente com mutação no gene *SLC26A4* apresentou alteração nos genes *FOXI1* ou *KCNJ10*.

Tabela 14 – Resultados positivos adquiridos no rastreamento dos genes *FOXI1* e *KCNJ10*.

Grupos	Pacientes	<i>FOXI1</i>	<i>KCNJ10</i>	<i>SLC26A4</i>
Grupo I	C2	D106E/N (c.318C>G)	N	N
	C17	T226I/N (c.677C>T)	N	N
Grupo II	13AA	N	D245E/N (c.735C>G)	N
	29AA	D106E/N (c.318C>G)	N	N

No gene *FOXI1* foram encontradas duas diferentes alterações em três pacientes. A alteração D106E foi detectada no rastreamento do exón 01 do gene *FOXI1* no paciente C2 do Grupo I e no paciente 29AA do Grupo II (Figura 52). Esta mutação foi encontrada em heterozigose em ambos os pacientes e trata-se da troca da base citosina para guanina na posição 318 do gene *FOXI1*, resultando na modificação do aminoácido Ácido Aspártico para Ácido Glutâmico.

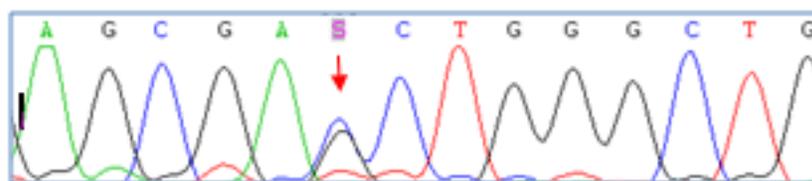


Figura 52 – Electroferograma mostrando a alteração D106E (*FOXI1*) detectada nos pacientes C2 e 29AA do Grupo II.

A mutação T226I foi detectada em heterozigose no exón 02 do gene *FOXI1* do paciente C17 do Grupo I (Figura 53). Esta alteração resulta na troca do aminoácido Treonina por Isoleucina na posição 677 do gene.

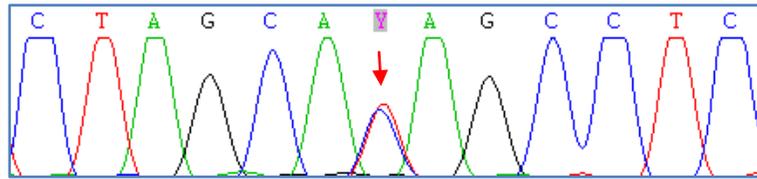


Figura 53 – Electroferograma mostrando a alteração T226I (*FOXI1*) detectada no paciente C17 do Grupo I.

No gene *KCNJ10* foi encontrada apenas uma alteração. A alteração D245E foi detectada em heterozigose no paciente 13AA do Grupo II (Figura 54). Esta mutação trata-se da troca da base citosina para guanina na posição 735 do gene *KCNJ10*, resultando na modificação do aminoácido Ácido Aspártico para Ácido Glutâmico.

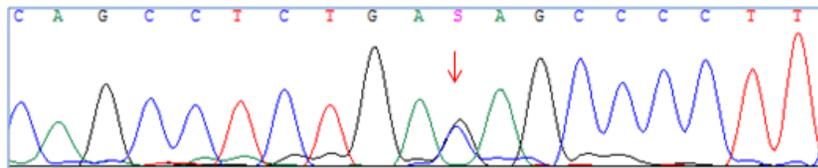


Figura 54 – Electroferograma mostrando a alteração D245E (*KCNJ10*) detectada no paciente 13AA do Grupo II.

4. TESTES FUNCIONAIS - PENDRINA

Após serem obtidos os resultados numéricos dos testes funcionais da proteína Pendrina, foram realizadas as análises estatísticas e a geração de gráficos de comparação. No total, o estudo funcional foi realizado a partir de 7 diferentes alterações na proteína Pendrina. Destas 7 mutações encontradas neste trabalho, 3 não haviam sido descritas na literatura (P142L, G149R e C282Y) e 4 já

havia sido descritas, porém o estudo funcional da Pendrina nunca havia sido realizado em 3 delas (L445W, Q413R e T193I). No caso da Pendrina mutada com R776C, o estudo funcional já havia sido realizado, porém havia controvérsia na literatura a respeito de sua função. A Tabela 15 facilita a visualização referente ao que já havia sido realizado ou não na literatura até o momento de início dos ensaios funcionais da proteína Pendrina.

Tabela 15 – Alterações encontradas no gene *SLC26A4*.

Pacientes	EVA	Alelo 1	Alelo 2	Alteração	Caracterização	Mutação em outros
				descrita	Funcional	genes estudados
C01	-	V609G	N	Sim	Sim	Não
C04	-	V609G	N	Sim	Sim	Não
C09	-	V609G	N	Sim	Sim	Não
C15	-	V138F	N	Sim	Sim	Não
C26	-	C282Y	N	Não	Não	35delG/N (<i>GJB2</i>)
02	B	T410M	IVS15+5G>A	Sim/Sim	Sim/splice	Não
06	B	V138F	Q413R	Sim/Sim	Sim/Não	Não
15	B	R776C	N	Sim	~Sim	Não
16	U	G149R	N	Não	Não	Não
18	B	T193I	N	Sim	Não	Não
21	B	P142L	279delT	Não/Sim	Não/Sim	Não
22	B	R409H	R409H	Sim	Sim	Não
24	B	L445W	IVS8+1G>A	Sim/Sim	Não/splice	Não
L1	B	V609G	N	Sim	Sim	Não

Legenda: (EVA) aqueduto vestibular alargado; (B) bilateral; (U) unilateral; (N) normal; (~) em controvérsia na literatura; (alterações sublinhadas) realizado o estudo funcional e a co-localização celular.

Primeiramente, foram realizados os experimentos funcionais da Pendrina apenas com as alterações ainda não descritas na literatura: P142L, G149R e C282Y. Os resultados obtidos podem ser visualizados no Gráfico 1.

Evidentemente, como método de comparação, também foram realizados experimentos com a Pendrina sem alteração (pTARGET PDS WT + pEYFP-N1) e com o controle negativo (pTARGET vazio + pEYFP-N1).

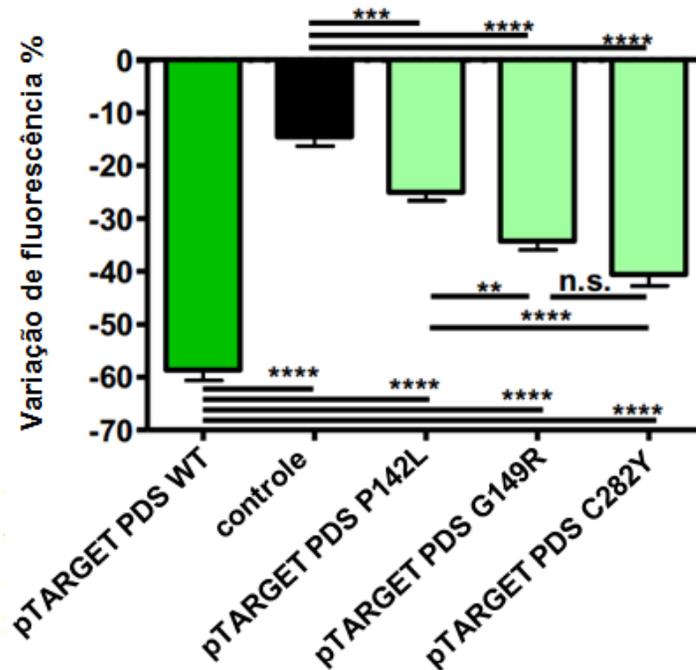


Gráfico 1 – Resultados dos testes funcionais da proteína Pendrina com alterações ainda não descritas na literatura: P142L, G149R e C282Y. Legenda: (controle) pTARGET vazio + pEYFP-N1; (n.s.) diferença não significativa; (**) diferença razoável; (***) diferença significativa; (****) muita diferença.

De acordo com os resultados evidenciados no Gráfico 1, pode-se notar que nas 03 diferentes alterações há redução da função da proteína Pendrina, uma vez que todas possuem uma variação de fluorescência menor que o padrão observado na Pendrina WT. Por outro lado, não houve perda total de função em nenhum dos casos em questão, já que a diminuição da variação de fluorescência foi maior que o padrão visto no *background*. Na Pendrina P142L há maior redução de função que na C282Y. Já a Pendrina G149R apresenta função reduzida intermediária entre essas duas.

Em seguida, foram realizados os testes funcionais da Pendrina com as alterações encontradas neste trabalho já descritas na literatura, porém que não possuíam caracterização funcional descrita: L445W, Q413R e T193I. Além dessas, também foi realizado o estudo funcional da Pendrina com uma alteração já descrita na literatura, que possui caracterização funcional descrita, porém em controvérsia na literatura, a R776C. O Gráfico 2 mostra os resultados obtidos na análise funcional dessas 04 alterações. Da mesma forma que o estudo anterior, também foram realizados experimentos com a Pendrina sem alteração (pTARGET PDS WT + pEYFP-N1) e com controle negativo (pTARGET vazio + pEYFP-N1) como método de comparação.

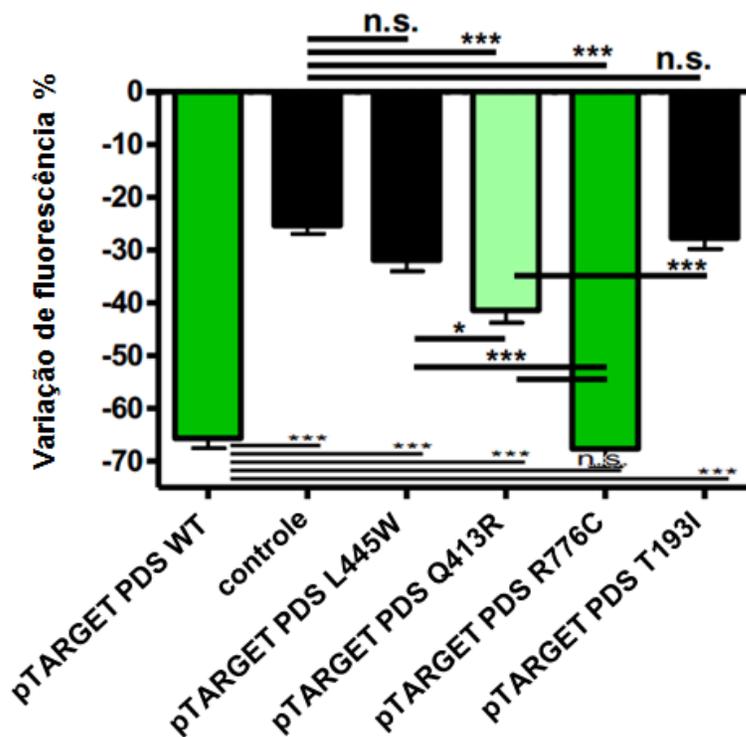


Gráfico 2 – Resultados dos testes funcionais da proteína Pendrina com alterações L445W, Q413R, R776C e T193I. Legenda: (controle) pTARGET vazio + pEYFP-N1; (n.s.) diferença não significativa; (*) pouca diferença; (***) diferença significativa.

De acordo com os resultados analisados no Gráfico 2, pode-se afirmar que há perda de função na Pendrina alterada com duas diferentes mutações, L445W e T193I, uma vez que não há diferença significativa em relação ao controle negativo. No caso da Pendrina alterada com Q413R pode-se notar que há redução da função da proteína, já que possui uma variação de fluorescência menor que o padrão observado na Pendrina WT e maior que o padrão visto no controle negativo. Por fim, a Pendrina com a mutação R776C tem sua função completamente normal, pois o padrão observado é idêntico ao da Pendrina WT, sendo, portanto, considerada um simples polimorfismo.

5. CO-LOCALIZAÇÃO CELULAR – PENDRINA

Foi realizada a co-localização celular da proteína Pendrina com as mesmas 7 alterações estudadas funcionalmente. Vale ressaltar que o microscópio confocal é capaz de trabalhar com apenas 2 variáveis ao mesmo tempo. Neste trabalho, uma variável utilizada foi a coloração da membrana plasmática ou do retículo endoplasmático e a outra variável foi a expressão da proteína Pendrina. Os experimentos foram realizados com um tipo de Pendrina por vez. Primeiramente, foi realizada a co-localização celular da Pendrina WT com a membrana plasmática (Figura 55). É possível observar a perfeita co-localização entre a membrana plasmática e a expressão da Pendrina na membrana.

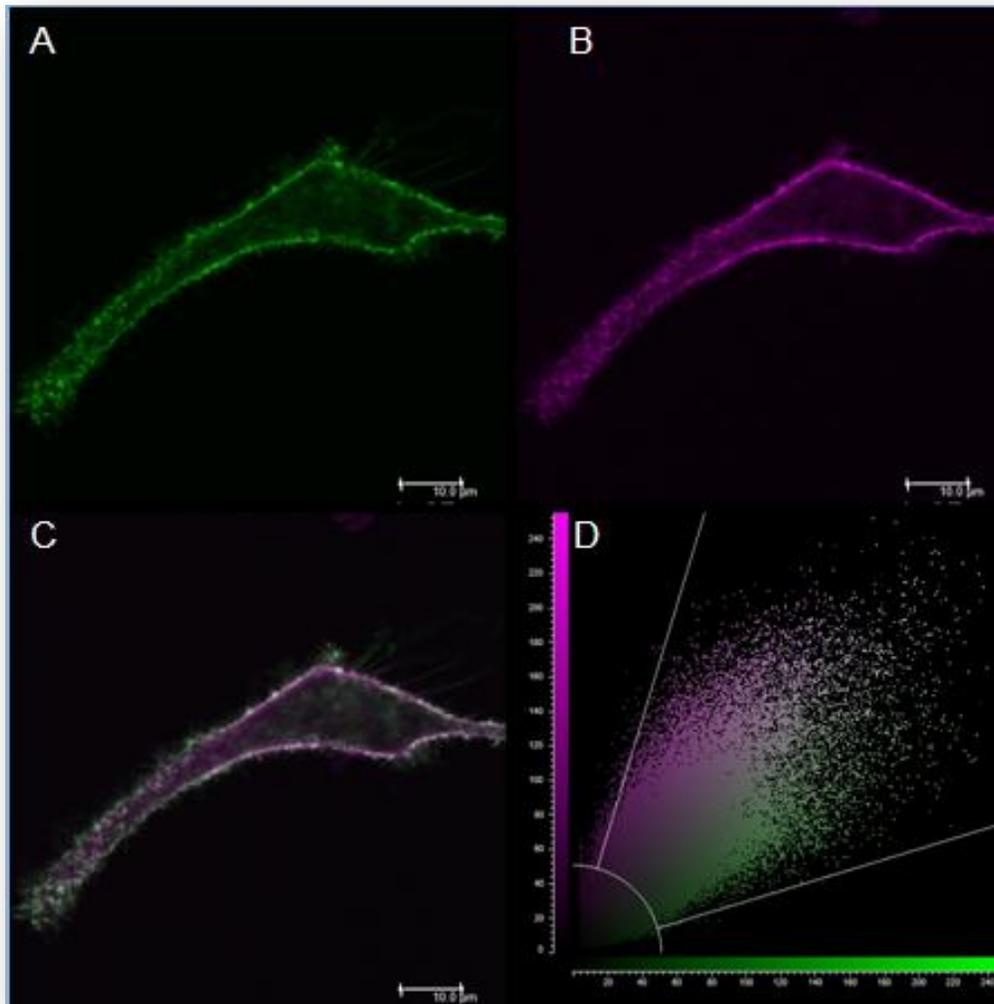


Figura 55 – Co-localização celular da proteína Pendrina WT-YFP. Legenda: (A) Expressão da Pendrina WT; (B) Membrana plasmática corada; (C) Co-localização das variáveis A e B; (D) Citofluorograma evidenciando variáveis co-localizadas.

Além do controle positivo da Pendrina, também foi utilizado o controle negativo na co-localização. A Figura 56 mostra a co-localização realizada do pEYFP-N1 vazio. Neste caso, não há co-localização, uma vez que uma variável é a proteína YFP que se expressa em toda a célula e a outra é a membrana plasmática corada.

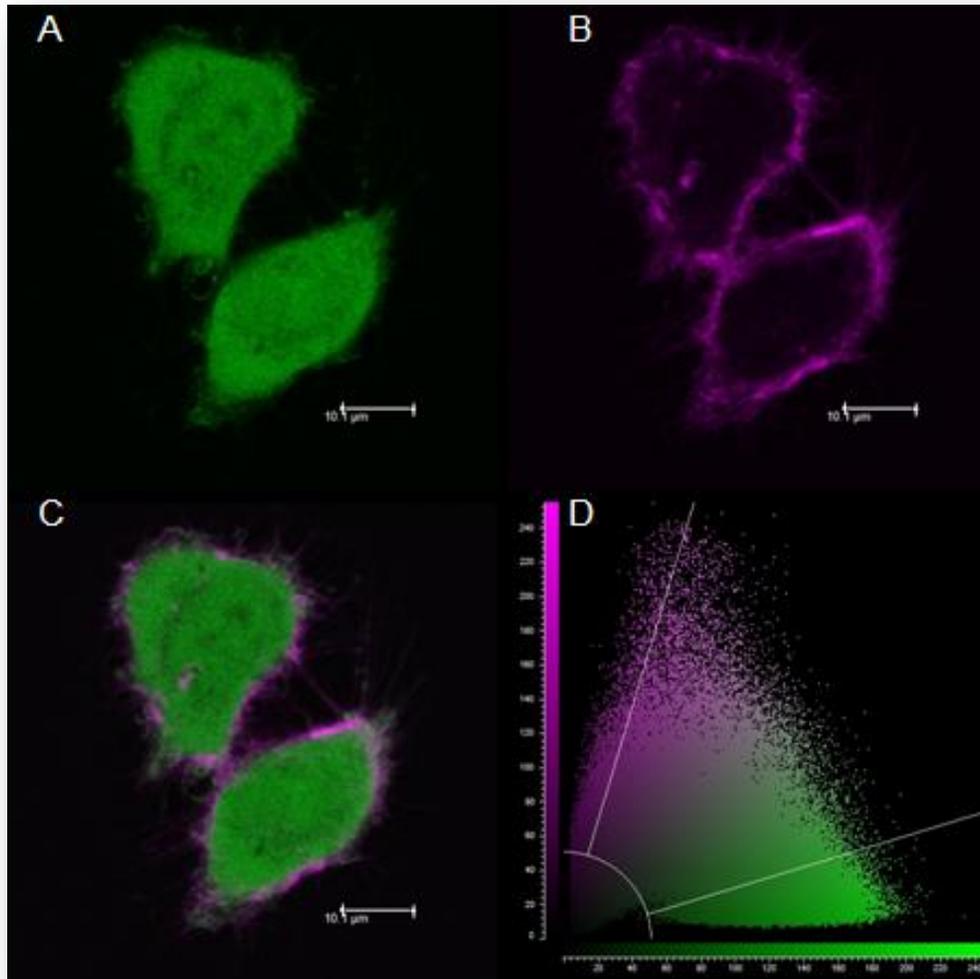


Figura 56 – Co-localização celular da proteína YFP. Legenda: (A) Expressão da proteína YFP sem a Pendrina; (B) Membrana plasmática corada; (C) Co-localização das variáveis A e B; (D) Citofluorograma evidenciando variáveis não co-localizadas.

Em seguida, foi realizada a co-localização celular de pEYFP-N1 PDS P142L. Neste caso, a Pendrina está localizada na membrana, como pode ser observado na Figura 57.

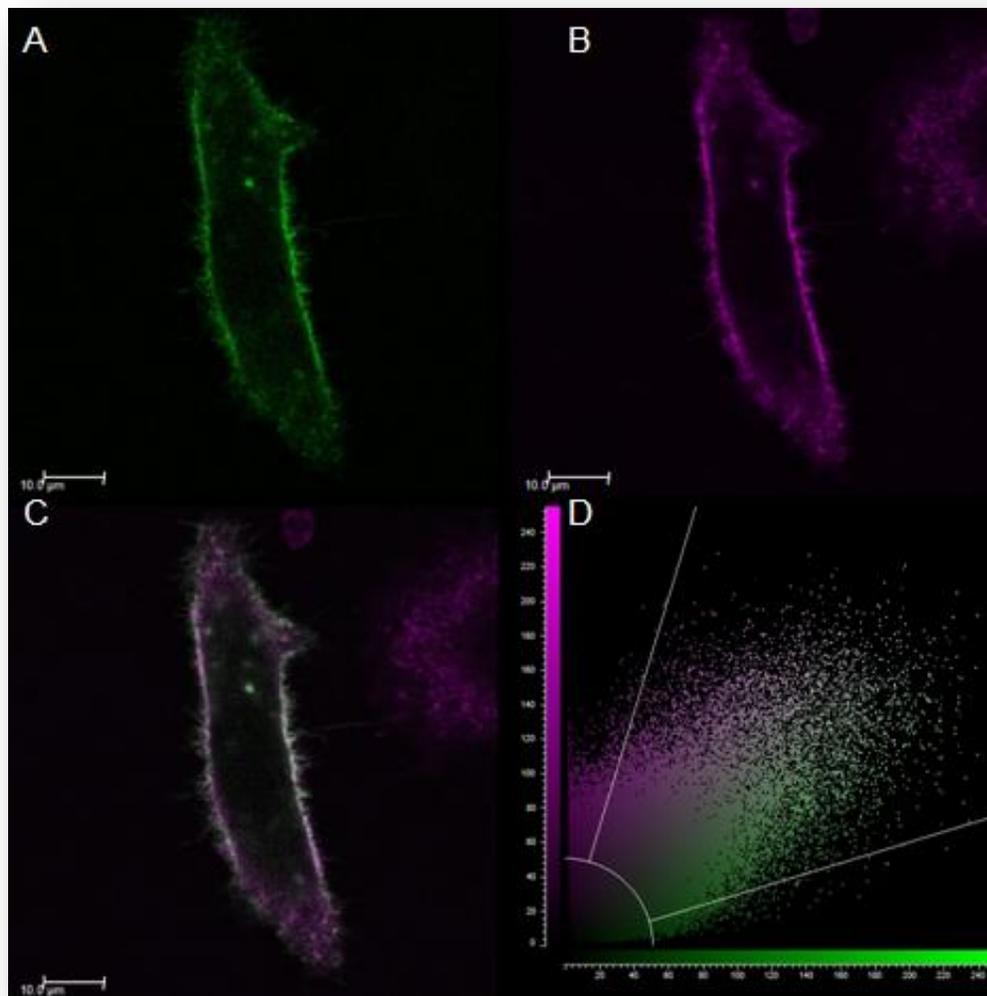


Figura 57 – Co-localização celular da proteína Pendrina P142L-YFP. Legenda: (A) Expressão da Pendrina P142L; (B) Membrana plasmática corada; (C) Co-localização das variáveis A e B; (D) Citofluorograma evidenciando variáveis co-localizadas.

Outra proteína alterada estudada foi pEYFP-N1 PDS G149R, a qual encontra-se co-localizada com a membrana plasmática, como pode ser visto na Figura 58.

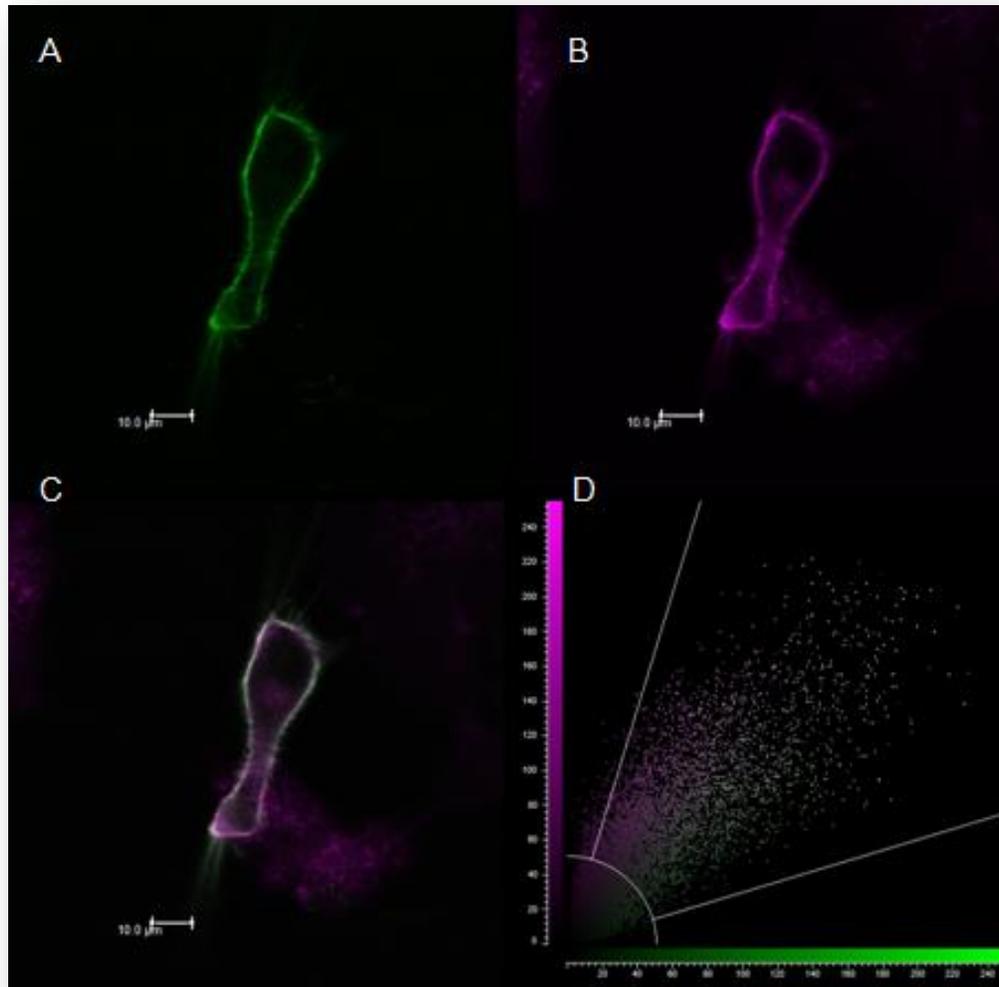


Figura 58 – Co-localização celular da proteína Pendrina G149R-YFP. Legenda: (A) Expressão da Pendrina G149R; (B) Membrana plasmática corada; (C) Co-localização das variáveis A e B; (D) Citofluorograma evidenciando variáveis co-localizadas.

A co-localização de pEYFP-N1 PDS C282Y com a membrana plasmática está ilustrada na Figura 59. Neste caso, também há co-localização.

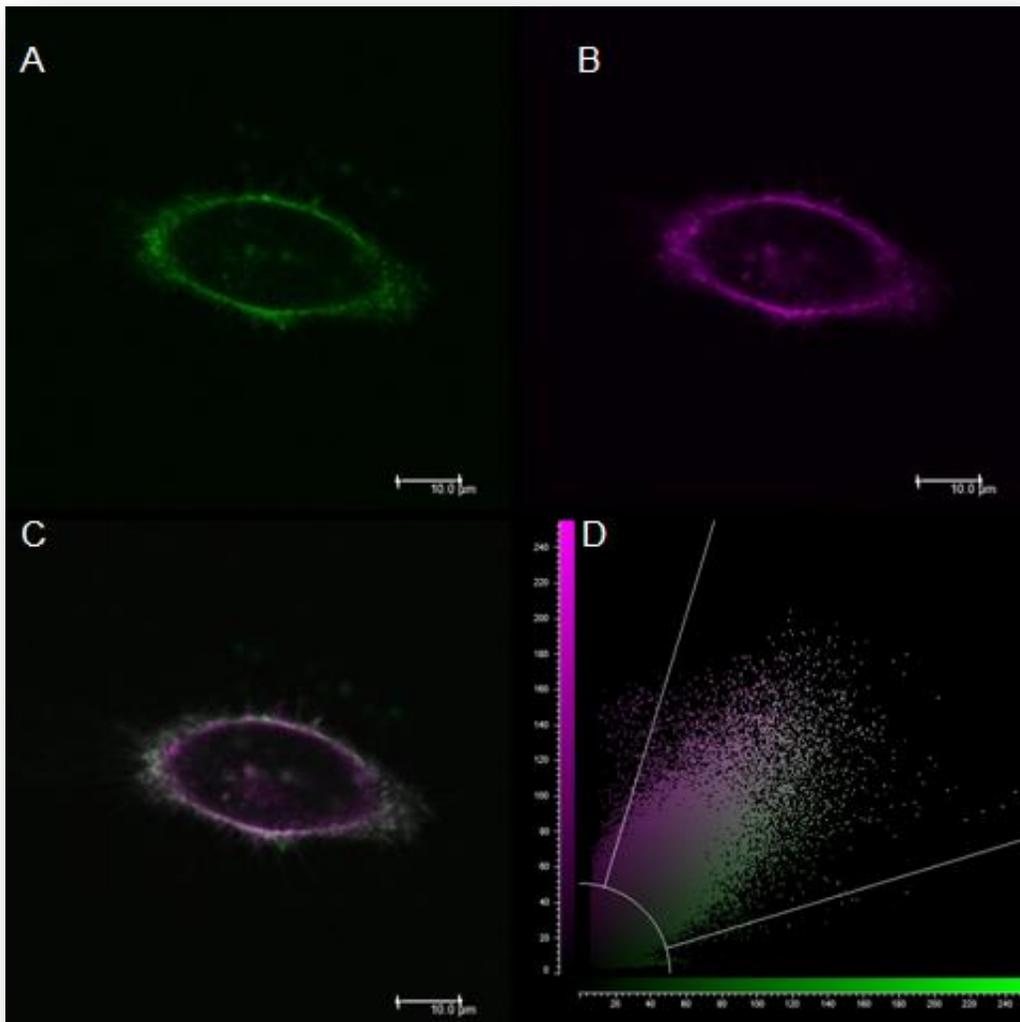


Figura 59 – Co-localização celular da proteína Pendra C282Y-YFP. Legenda: (A) Expressão da Pendra C282Y; (B) Membrana plasmática corada; (C) Co-localização das variáveis A e B; (D) Citofluorograma evidenciando variáveis co-localizadas.

A quarta alteração na proteína Pendrina estudada foi a L445W. Como pode ser observado na Figura 60, não há co-localização entre esta proteína e a membrana plasmática, uma vez que a proteína encontra-se em algum compartimento dentro da célula.

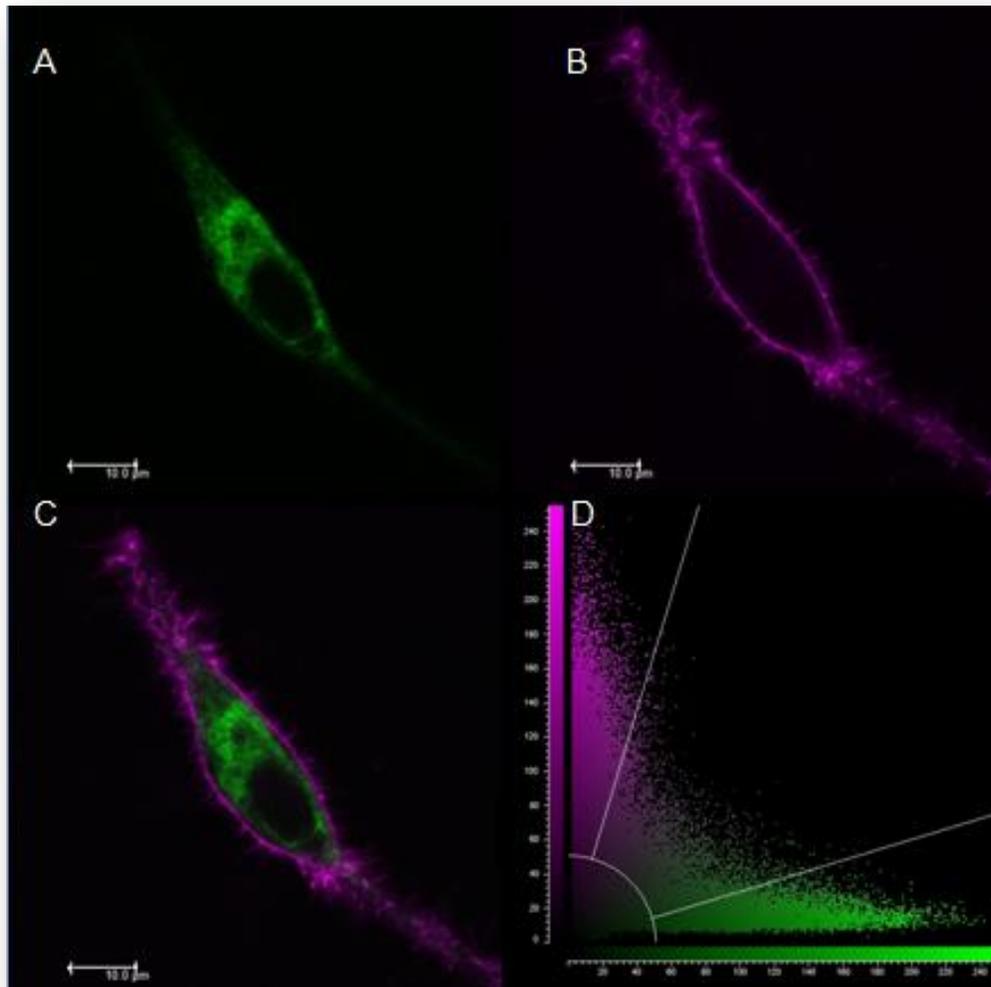


Figura 60 – Co-localização celular da proteína Pendrina L445W-YFP. Legenda: (A) Expressão da Pendrina L445W; (B) Membrana plasmática corada; (C) Co-localização das variáveis A e B; (D) Citofluorograma evidenciando variáveis não co-localizadas.

Da mesma forma que a alteração anterior, a Pendrina Q413R também não se apresentou co-localizada com a membrana plasmática, como pode ser analisado na Figura 61.

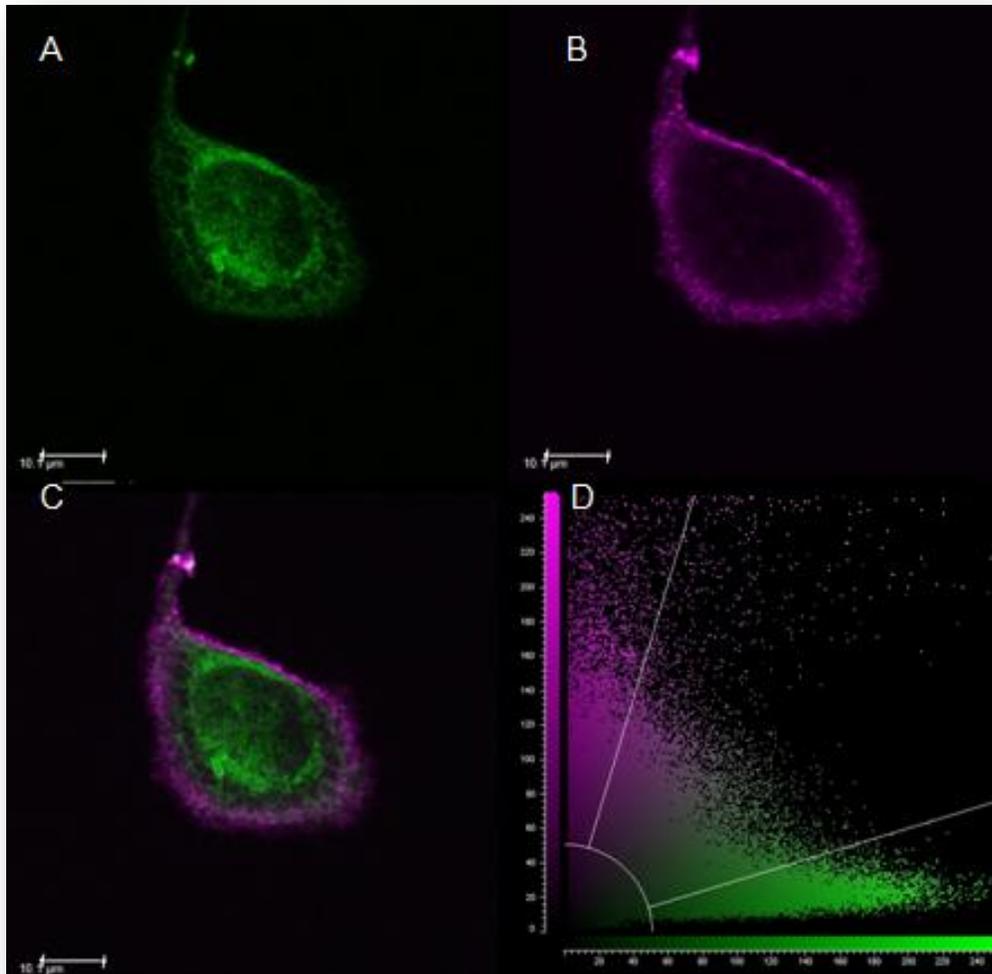


Figura 61 – Co-localização celular da proteína Pendrina Q413R-YFP. Legenda: (A) Expressão da Pendrina Q413R; (B) Membrana plasmática corada; (C) Co-localização das variáveis A e B; (D) Citofluorograma evidenciando variáveis não co-localizadas.

Além da Pendrina alterada L445W e Q413R, a proteína PDS T193I também se apresentou de forma irregular, ou seja, não houve co-localização com a membrana plasmática, ficando retida em algum compartimento intracelular (Figura 62).

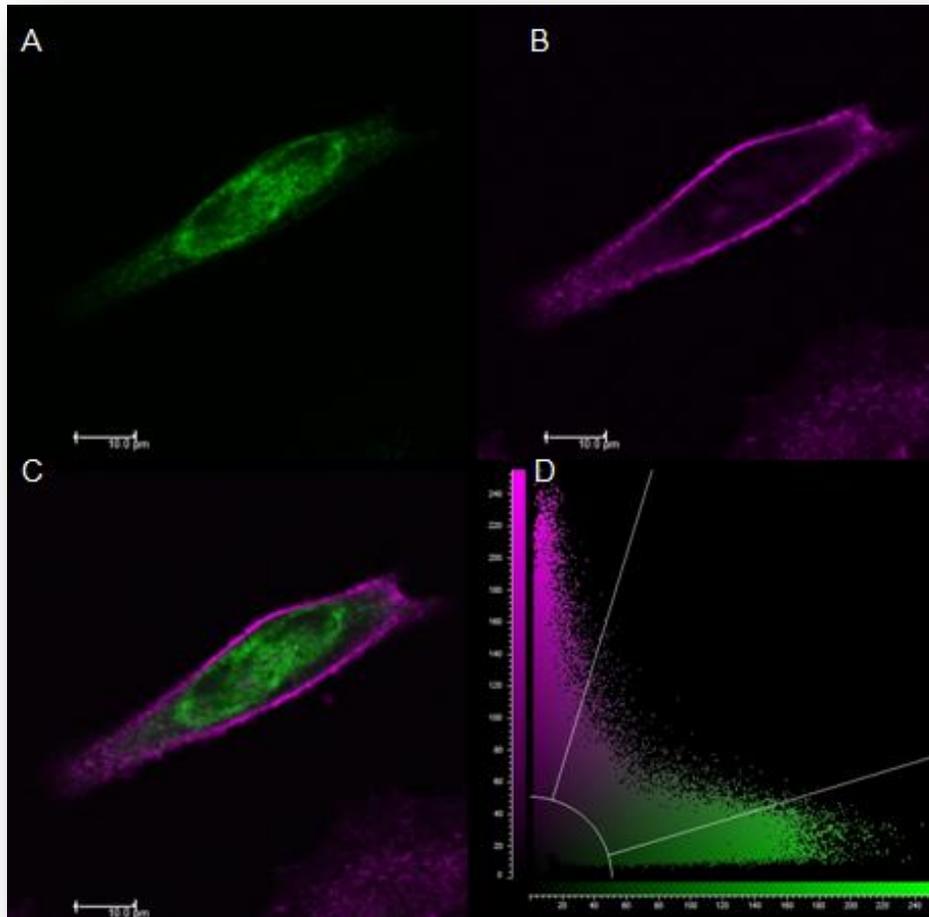


Figura 62 – Co-localização celular da proteína Pendrina T193I-YFP. Legenda: (A) Expressão da Pendrina T193I; (B) Membrana plasmática corada; (C) Co-localização das variáveis A e B; (D) Citofluorograma evidenciando variáveis não co-localizadas.

Por fim, a última proteína estudada foi a Pendrina R776C, que se apresentou de forma regular localizada na membrana plasmática (Figura 63).

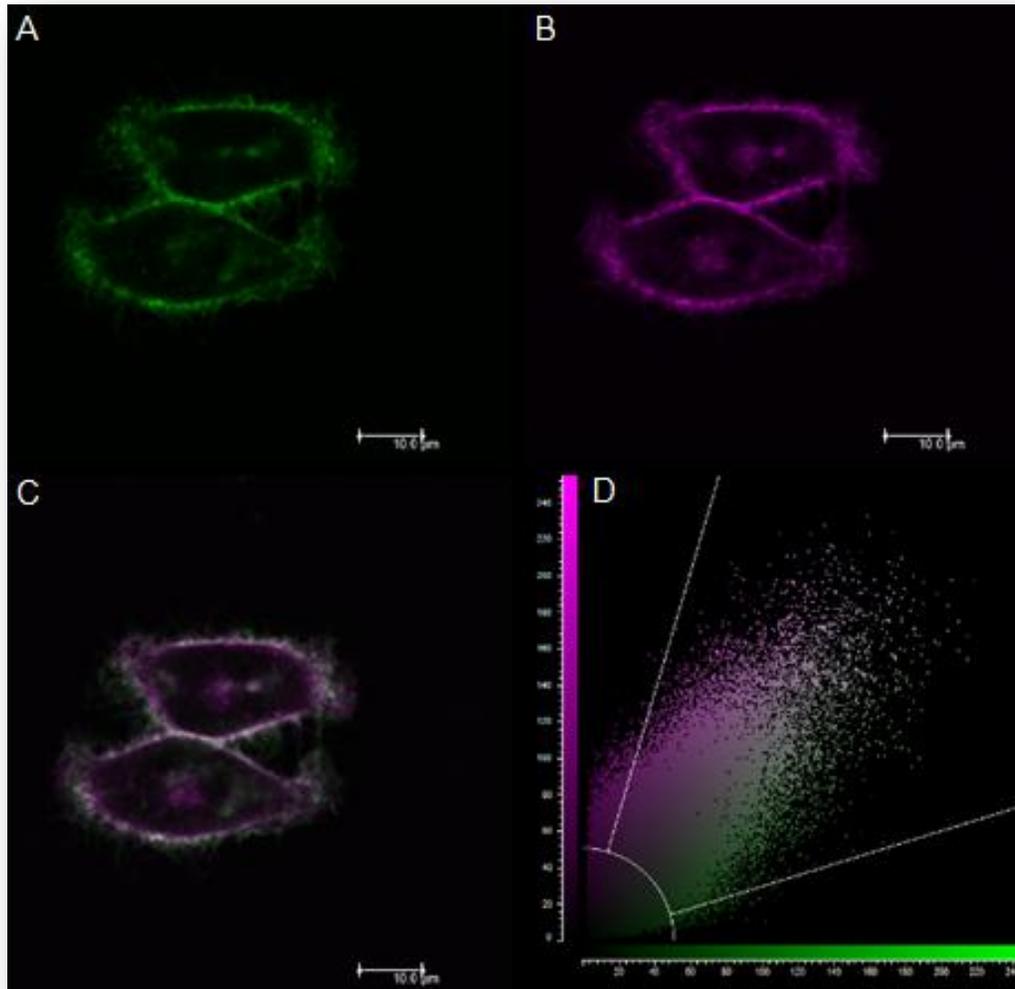


Figura 63 – Co-localização celular da proteína Pendrina R776C-YFP. Legenda: (A) Expressão da Pendrina R776C; (B) Membrana plasmática corada; (C) Co-localização das variáveis A e B; (D) Citofluorograma evidenciando variáveis co-localizadas.

Os resultados obtidos na co-localização celular da proteína Pendrina com a membrana plasmática foram resumidos no Gráfico 3 por meio de uma medida estatística aplicada para identificar a veracidade de pixels co-localizados, a Correlação de Pearson. Pode-se notar que a Pendrina com as alterações T193I, Q413R e L445W não estão localizadas na membrana plasmática.

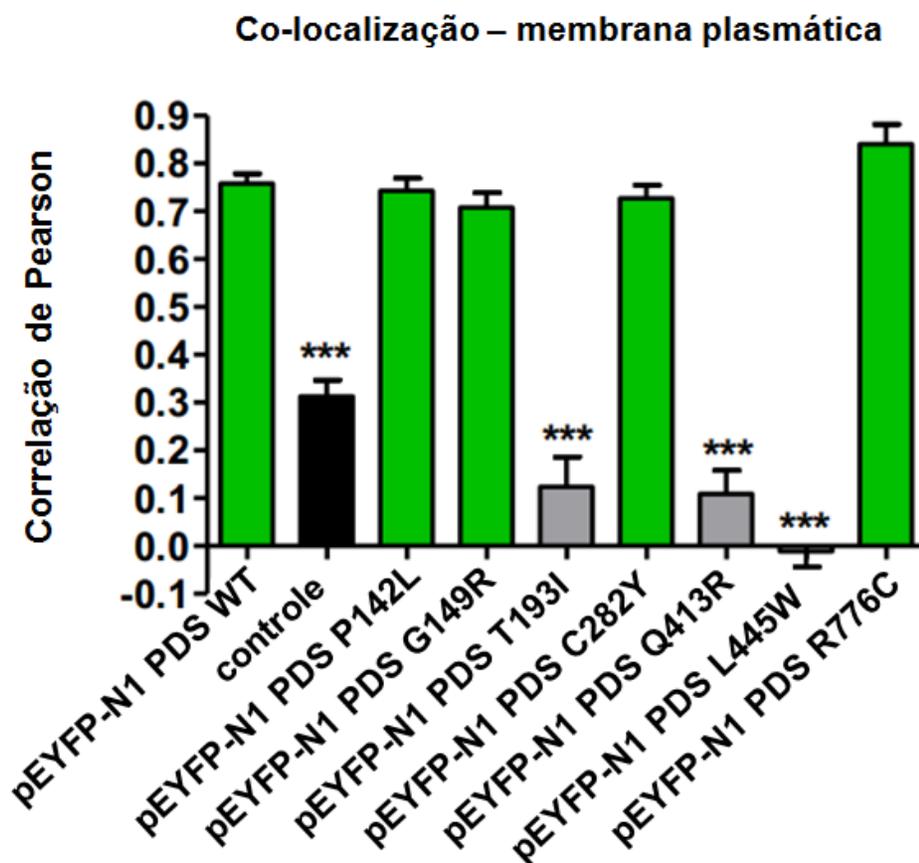


Gráfico 3 – Resumo dos resultados estatísticos da co-localização da proteína Pendrina com alterações P142L, G149R, T193I, C282Y, Q413R, L445W e R776C. Legenda: (controle) pEYFP-N1 vazio; (***) diferença significativa em relação à co-localização da Pendrina na membrana plasmática.

De acordo com a literatura, a Pendrina já foi localizada no retículo endoplasmático (Rotman-Pikielny, 2002; Taylor, 2002). Portanto, com o objetivo de elucidar a localização celular dos 3 mutantes que não estão presentes na membrana plasmática (PDS L445W, Q413R e T193I), o retículo endoplasmático foi corado. Primeiramente, foi realizada a co-localização celular do retículo endoplasmático com a Pendrina WT (Figura 64). Obviamente, não houve co-localização, já que a Pendrina WT se localiza na membrana.

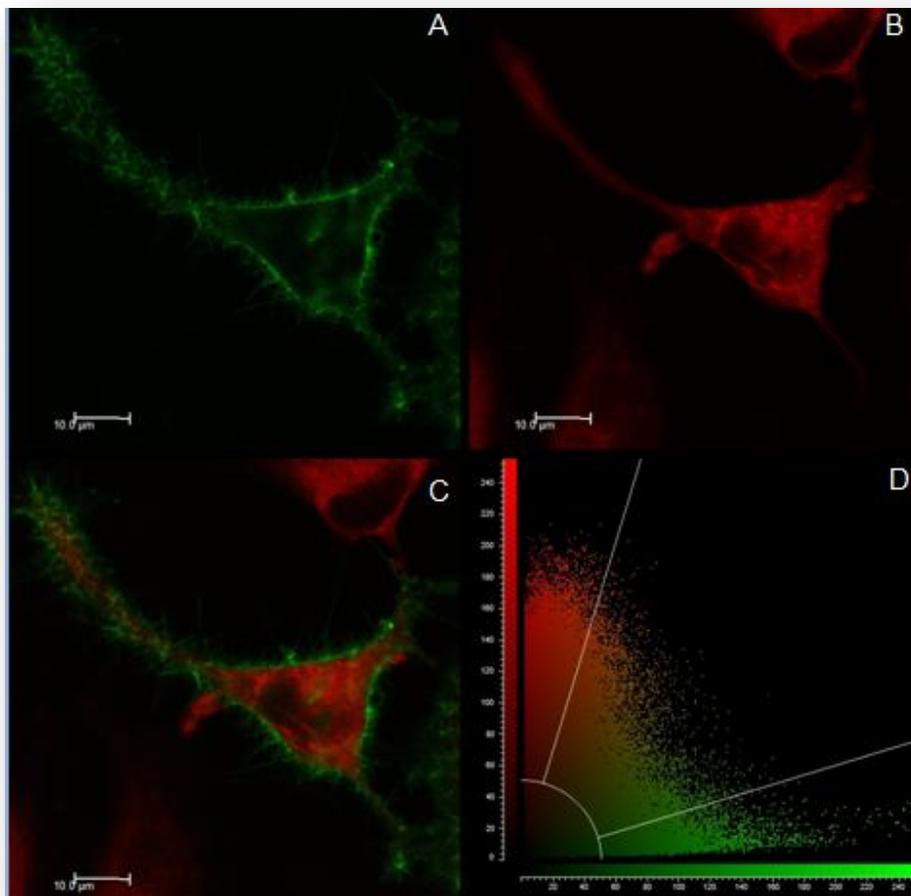


Figura 64 – Co-localização celular da proteína Pendrina WT-YFP. Legenda: (A) Expressão da Pendrina WT; (B) Retículo endoplasmático corado; (C) Co-localização das variáveis A e B; (D) Citofluorograma evidenciando variáveis não co-localizadas.

Novamente foi utilizado o controle negativo da Pendrina na co-localização, o pEYFP-N1 vazio (Figura 65). Neste caso, não houve perfeita co-localização, uma vez que uma variável é a proteína YFP que se expressa em toda a célula e a outra é o retículo endoplasmático corado.

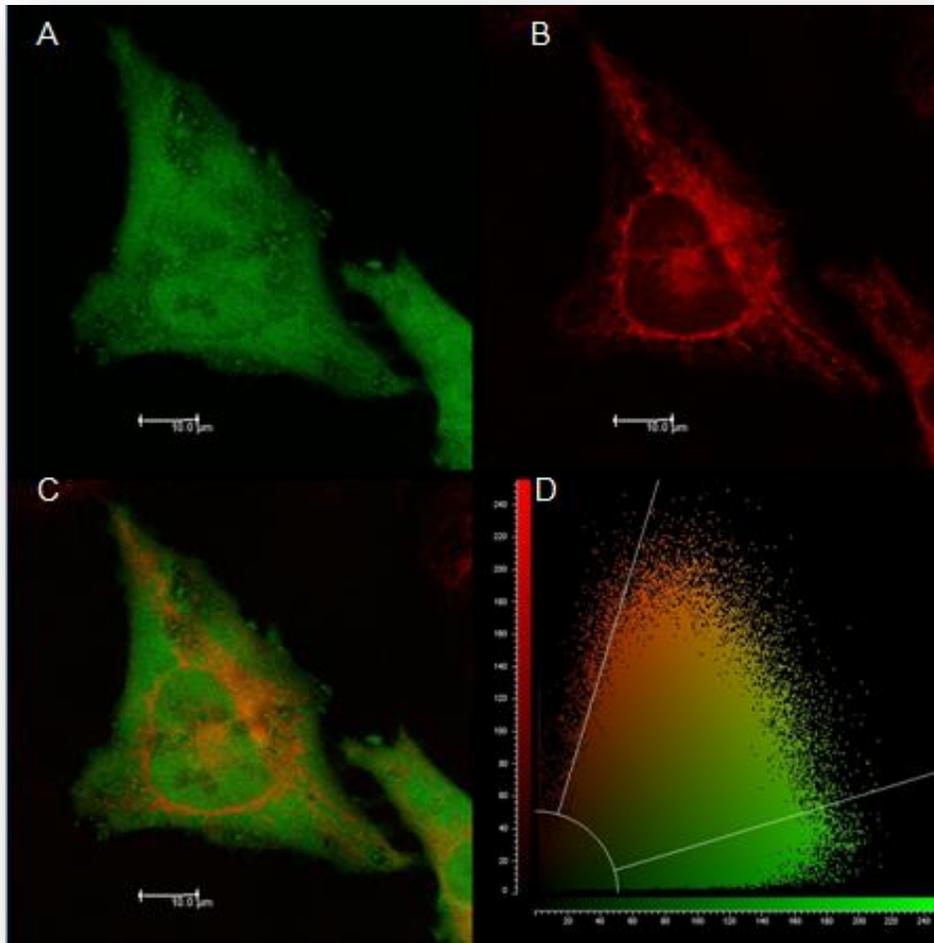


Figura 65 – Co-localização celular da proteína YFP. Legenda: (A) Expressão da proteína YFP sem a Pendrina; (B) Retículo endoplasmático corado; (C) Co-localização das variáveis A e B; (D) Citofluorograma evidenciando variáveis não co-localizadas perfeitamente.

Em seguida, foi realizada a co-localização celular de pEYFP-N1 PDS L445W. Neste caso, a Pendrina está localizada no retículo endoplasmático, como pode ser observado na Figura 66.

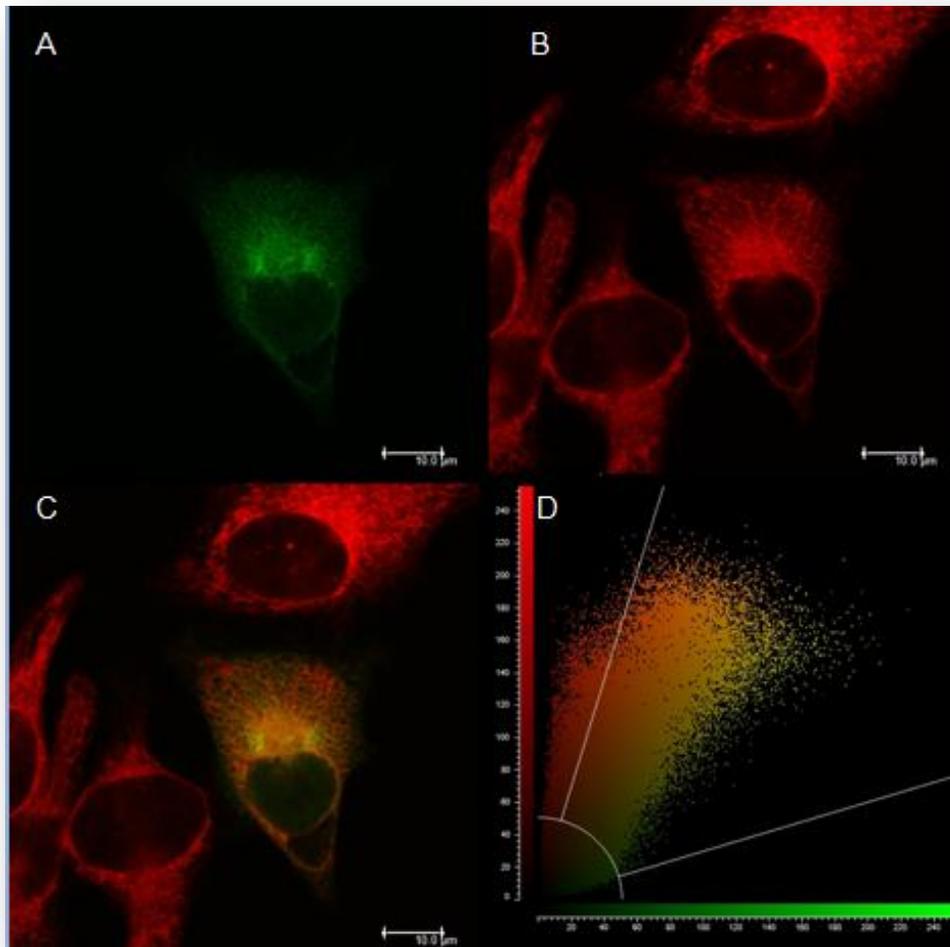


Figura 66 – Co-localização celular da proteína Pendrina L445W-YFP. Legenda: (A) Expressão da Pendrina L445W; (B) Retículo endoplasmático corado; (C) Co-localização das variáveis A e B; (D) Citofluorograma evidenciando variáveis co-localizadas.

A segunda alteração investigada por não estar localizada na membrana plasmática, foi pEYFP-N1 PDS Q413R. A co-localização celular foi realizada juntamente ao retículo endoplasmático e verificou-se que a Pendrina fica retida no mesmo (Figura 67).

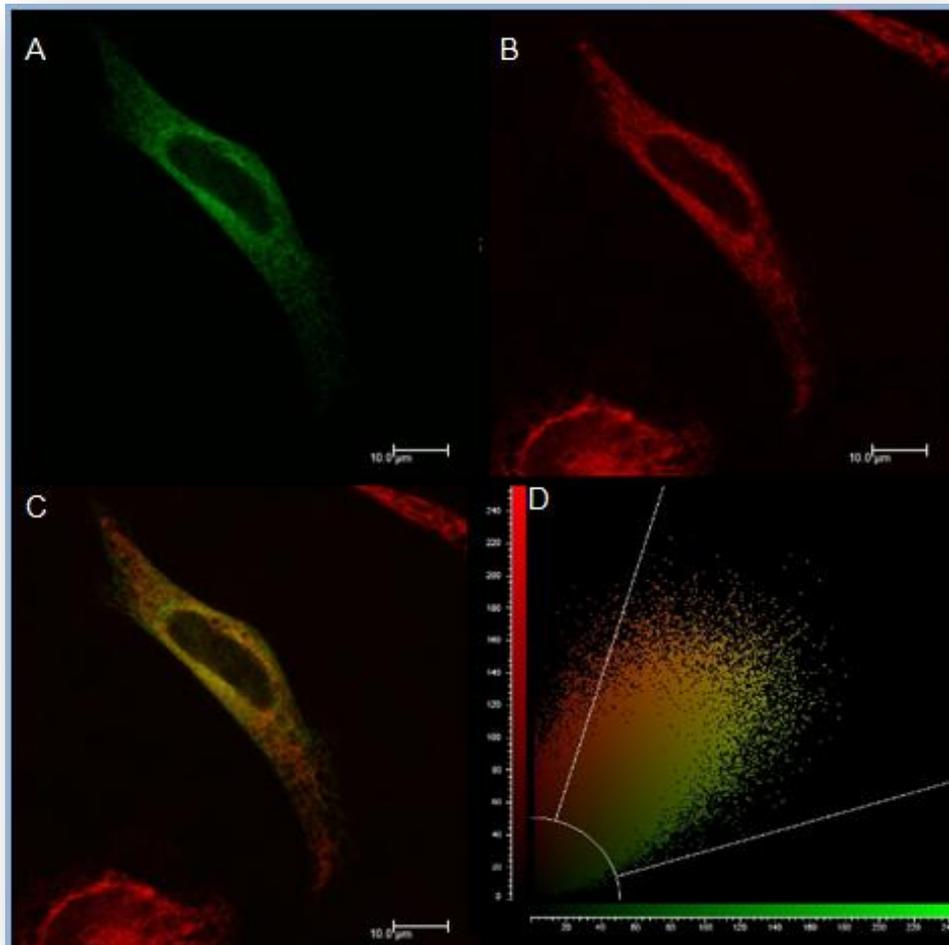


Figura 67 – Co-localização celular da proteína Pendrina Q413R-YFP. Legenda: (A) Expressão da Pendrina Q413R; (B) Retículo endoplasmático corado; (C) Co-localização das variáveis A e B; (D) Citofluorograma evidenciando variáveis co-localizadas.

Em seguida, foi realizada a co-localização celular de pEYFP-N1 PDS T193I. Neste caso, a Pendrina está localizada no retículo endoplasmático, como pode ser observado na Figura 68.

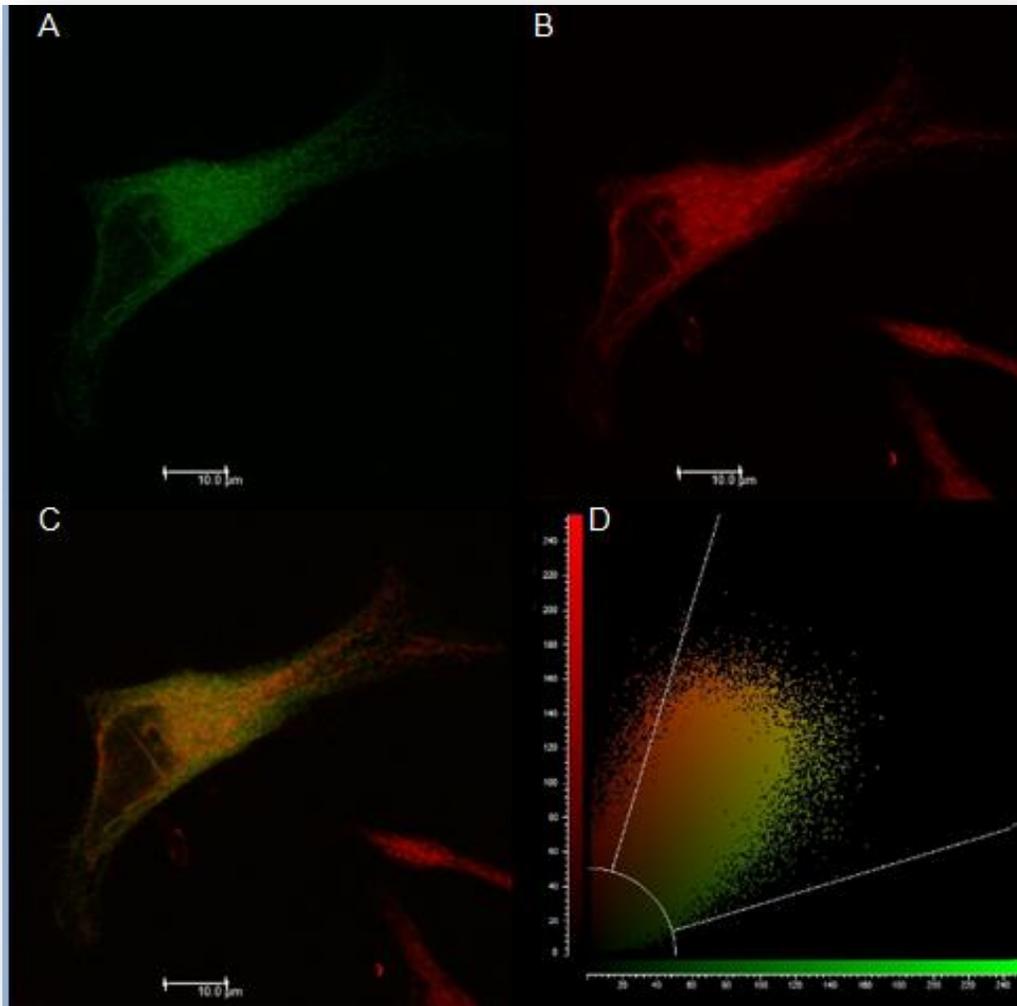


Figura 68 – Co-localização celular da proteína Pendrina T193I-YFP. Legenda: (A) Expressão da Pendrina T193I; (B) Retículo endoplasmático corado; (C) Co-localização das variáveis A e B; (D) Citofluorograma evidenciando variáveis co-localizadas.

Os resultados obtidos na co-localização celular da proteína Pendrina com o retículo endoplasmático foram resumidos no Gráfico 4 por meio da Correlação de Pearson. Pode-se notar que a Pendrina com as alterações T193I, Q413R e L445W estão localizadas no retículo. A Pendrina G149R co-localiza na membrana plasmática, porém alguma pequena fração fica retida no retículo e não alcança a membrana.

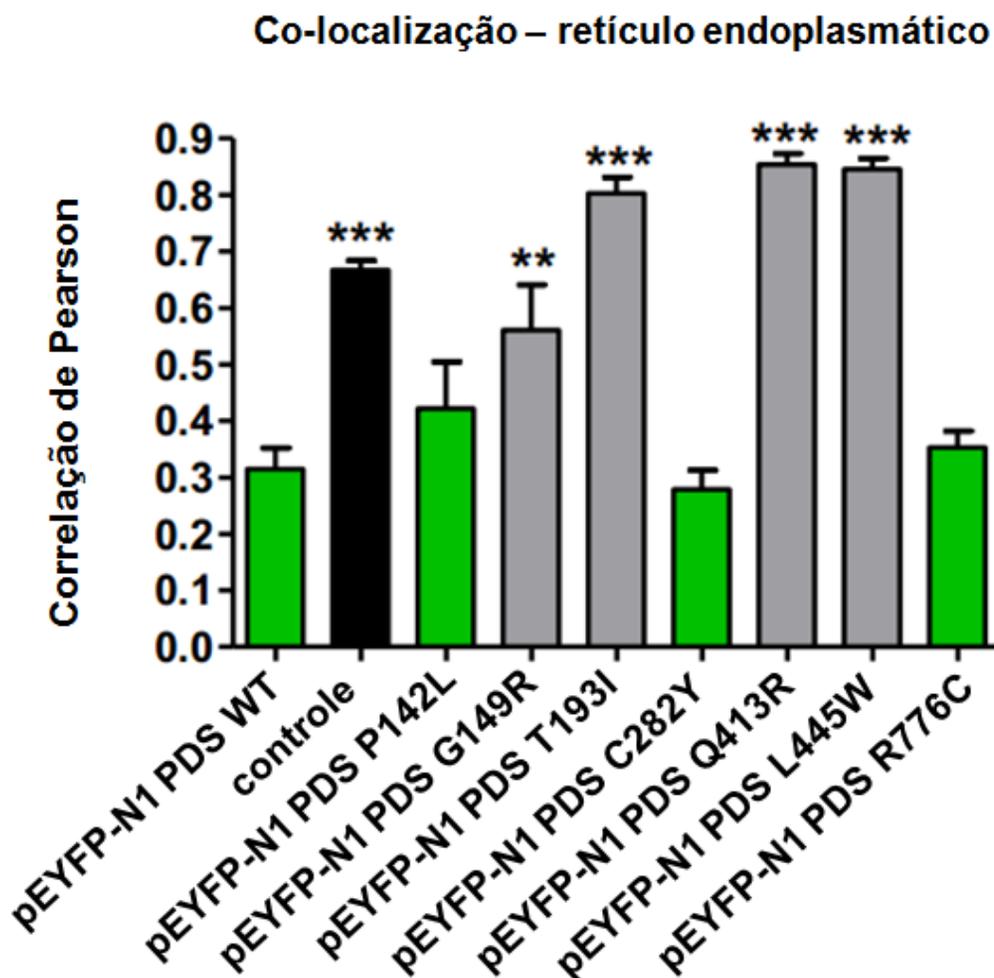


Gráfico 4 – Resumo dos resultados estatísticos da co-localização do retículo endoplasmático com a proteína Pendrina com alterações P142L, G149R, T193I, C282Y, Q413R, L445W e R776C. Legenda: (controle) pEYFP-N1 vazio; (**) diferença razoável em relação à co-localização da Pendrina na membrana plasmática; (***) diferença significativa em relação à co-localização da Pendrina na membrana plasmática.

6. RASTREAMENTO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *SLC26A4*

A região promotora do gene *SLC26A4* foi rastreada em 4 pacientes do Grupo II que apresentaram alteração em apenas um dos alelos do gene *SLC26A4*: 15AA, 16AA, 18AA e L1AA. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados obtidos no rastreamento da região promotora do gene *SLC26A4*.

Pacientes	Mutações na região promotora – <i>SLC26A4</i>	Mutações na região codificante – <i>SLC26A4</i>
15AA	rs2712228/N (c.-964A>C)	R776C/N
16AA	rs2712228/N (c.-964A>C) rs2701685/N (c.-1720A>G)	G149R/N
18AA	rs2712228/N (c.-964A>C)	T193I/N
L1AA	rs2701685/N (c.-1720A>G) rs114381113/N (c.-1368G>A) rs17154282/N (c.-66C>G)	V609G/N

Na região promotora do gene *SLC26A4* foram encontradas quatro diferentes alterações. A alteração c.-964A>C foi detectada nos pacientes 15AA, 16AA e 18AA (Figura 69). Esta mutação foi encontrada em heterozigose e trata-se da troca da base adenina para citosina na posição -964 da região promotora.

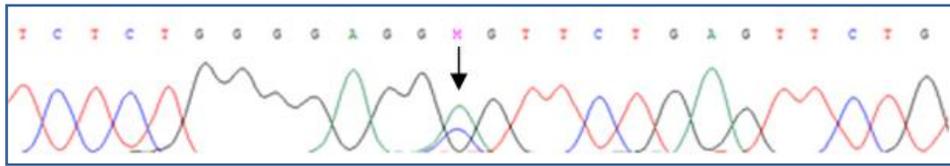


Figura 69 – Eletroferograma evidenciando a alteração c.-964A>C encontrada nos pacientes 15AA, 16AA e 18AA.

A alteração c.-1720A>G foi encontrada na região promotora do gene *SLC26A4* nos pacientes 16AA e L1AA (Figura 70). Esta mutação resulta da troca da base adenina por uma base guanina e foi detectada em heterozigose na posição -1720.

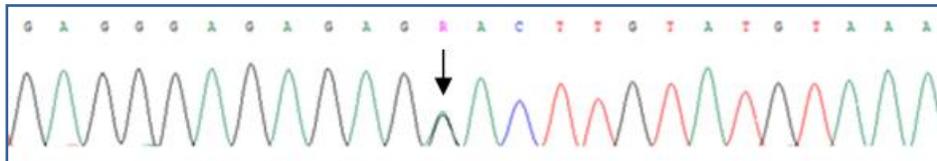


Figura 70 – Eletroferograma evidenciando a alteração c.-1720A>G encontrada nos pacientes 16AA e L1AA.

A terceira alteração encontrada na região promotora do gene *SLC26A4* foi a c.-1368G>A (Figura 71). Esta mutação foi encontrada no paciente L1AA em heterozigose e trata-se da troca da base guanina para adenina na posição -1368 da região promotora.

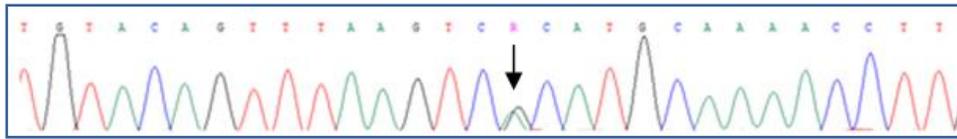


Figura 71 – Eletroferograma evidenciando a alteração c.-1368G>A encontrada no paciente L1AA.

Por fim, a alteração c.-66C>G foi encontrada na região promotora do gene *SLC26A4* no paciente L1AA (Figura 72). Esta mutação resulta da troca da base citosina por uma base guanina e foi detectada em heterozigose na posição -66.

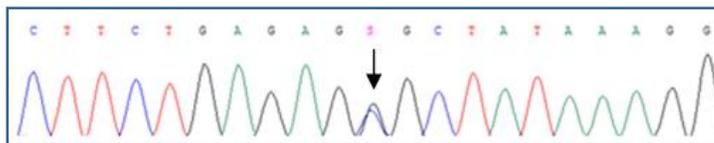


Figura 72 – Eletroferograma evidenciando a alteração c.-66C>G encontrada no paciente L1AA.

7. RESUMO DOS RESULTADOS

Todos os resultados obtidos neste trabalho referente ao gene *SLC26A4* estão resumidos na Tabela 17.

Tabela 17 – Resumo dos resultados obtidos neste trabalho. Legenda: (*) mutação monoalélica no gene *GJB2* – 35delG; (campos em azul) resultados da localização celular e da função da Pendrina obtidos neste estudo; (sublinhados) mutações novas encontradas; (NR) teste não realizado.

Pacientes	Substituição Nucleotídeo – região codificante <i>SLC26A4</i>	Substituição Aminôácido – região codificante <i>SLC26A4</i>	Localização celular da Pendrina	Função da Pendrina	Genótipo do paciente – região codificante <i>SLC26A4</i>	Genótipo do paciente – região promotora <i>SLC26A4</i> (mutações em heterozigose)	EVA	Surdez	Bócio
Pacientes surdos com EVA									
21AA	425C>T	<u>P142L</u>	membrana	reduzida	P142L/ 297delT	não realizado	bilateral	profunda	NR
16AA	446G>A	<u>G149R</u>	membrana/ retículo	reduzida	G149R/N	rs2712228 (c.-964A>C) rs2701685 (c.-1720A>G)	unilateral	profunda	NR
18AA	578C>T	T193I	retículo	ausente	T193I/N	rs2712228 (c.-964A>C)	bilateral	profunda	NR
22AA	1226G>A	R409H	parcialmente membrana	ausente ou reduzida	R409H/R409H	não realizado	bilateral	profunda	NR
02AA	1229C>T	T410M	retículo	ausente	T410M/ <i>splicing</i>	não realizado	bilateral	profunda	NR
06AA	1238A>G	Q413R	retículo	reduzida	Q413R/V138F	não realizado	bilateral	profunda	NR
24AA	1334T>G	L445W	retículo	ausente	L445W/ <i>splicing</i>	não realizado	bilateral	profunda	SIM
L1AA	1826T>G	V609G	não há dados	reduzida	V609G/N	rs2701685 (c.-1720A>G) rs114381113 (c.-1368G>A) rs17154282 (c.-66C>G)	bilateral	profunda	NR
15AA	2326C>T	R776C	membrana	normal	R776C/N	rs2712228 (c.-964A>C)	bilateral	profunda	NR
Pacientes surdos sem EVA									
C26	845G>A	<u>C282Y</u>	membrana	reduzida	C282Y/N*	não realizado	NÃO	profunda	NR
C01	1826T>G	V609G	não há dados	reduzida	V609G/N	não realizado	NÃO	profunda	NR
C04	1826T>G	V609G		reduzida	V609G/N	não realizado	NÃO	profunda	NR
C09	1826T>G	V609G		reduzida	V609G/N	não realizado	NÃO	profunda	NR
C15	412G>T	V138F	retículo	ausente	V138F/N	não realizado	NÃO	profunda	NR

DISCUSSÃO

No presente estudo, 60 pacientes foram inicialmente rastreados quanto à presença de mutações no gene *GJB2*, deleções envolvendo o gene *GJB6* e a mutação mitocondrial A1555G no gene *MTRNR1*, as quais representam as principais causas de surdez não-sindrômica de origem genética. As deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6* e a mutação mitocondrial A1555G não foram detectadas em nenhum dos indivíduos rastreados.

Sabe-se que mutações no gene *GJB2* estão envolvidas em 80% dos casos com herança autossômica recessiva, e ainda, são responsáveis por cerca de metade de todos os casos de perda auditiva de origem genética (Denoyelle *et al.*, 1997; Hilgert *et al.*, 2009). O grande obstáculo enfrentado é o fato de que o número de indivíduos com perda auditiva apresentando mutação no gene *GJB2* em apenas um dos alelos chega a ser observado em 40% das famílias, dificultando o estabelecimento da etiologia genética da surdez nesses casos. Quando uma segunda alteração no outro alelo é identificada, seja no mesmo gene ou em outro envolvido nos casos de surdez, é possível que a etiologia da perda auditiva seja estabelecida. O paciente C26 do Grupo I foi o único indivíduo que apresentou alteração em dois genes: *GJB2* e *SLC26A4*. Os pacientes C05 e C10 do Grupo I apresentaram a alteração M34T (c.101T>C) no gene *GJB2* em heterozigose. A mutação M34T foi primeiramente descrita por Kelsell e colaboradores em 1997, sendo considerada um polimorfismo neutro, sem efeito no fenótipo. Contudo, estudos funcionais posteriores mostraram que a alteração M34T causa redução na permeabilidade do conexon, responsável pela comunicação intercelular na orelha interna (Oshima *et al.*, 2003). Em seguida, foi confirmada a patogenicidade da mutação M34T por meio de estudos eletrofisiológicos e bioquímicos (Bicego *et al.*, 2006). A mutação M34T encontrada em apenas um dos alelos dos indivíduos C05 e C10 não é suficiente para explicar o fenótipo clínico da perda auditiva nesses pacientes, já que trata-se de um

padrão de herança recessivo, sendo, portanto, necessária a investigação molecular em outros genes.

Outro paciente que apresentou alteração no gene *GJB2* foi o indivíduo 01AA, no qual foi detectada a mutação V37I (c.109G>A) em heterozigose. Esta alteração foi primeiramente descrita como um polimorfismo sem efeito patogênico por Kelley *et al.*, 1998. No ano seguinte, foi relatado um estudo no Brasil de dois indivíduos irmãos com perda auditiva progressiva profunda, cujo genótipo apresentava as mutações V37I/V95M (Oliveira *et al.*, 2000). Trabalhos posteriores envolvendo a mutação V37I mostraram esta alteração segregando com a surdez em homozigose ou heterozigose composta com a mutação 35delG, estabelecendo a patogenicidade da mutação (Wilcox *et al.*, 2000; Piatto *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2005; Daahl *et al.*, 2006; Pollak *et al.*, 2007). Entretanto, como a mutação V37I foi encontrada em heterozigose, não é possível confirmar se essa alteração está relacionada à perda auditiva nesse indivíduo, uma vez que, 10 a 40% dos indivíduos com surdez podem apresentar mutações monoalélicas no gene *GJB2*.

Por fim, outra alteração encontrada no rastreamento do gene *GJB2* foi a 35delG nos pacientes C26 do Grupo I e L8AA do Grupo II. Esta deleção leva à alteração no quadro de leitura de aminoácidos, provocando o surgimento de um códon prematuro de terminação no códon 13 da proteína (Denoyelle *et al.*, 1997; Zelante *et al.*, 1997). A deleção 35delG está presente em 80% dos casos em que o gene *GJB2* está envolvido, sendo, portanto, considerada a mais frequente (Denoyelle *et al.*, 1997; Zelante *et al.*, 1997; Estivill *et al.*, 1998; Kelley *et al.*, 1998). No indivíduo L8AA, a mutação 35delG foi detectada em heterozigose, tornando o diagnóstico etiológico da perda auditiva inconclusivo, uma vez que não foi identificada uma segunda alteração no alelo normal. Nesse caso, a perda auditiva apresentada pelo paciente pode ser devido à mutação em outro gene, a fatores ambientais ou ao *background* genético do indivíduo. O paciente C26 apresentou

duas alterações em heterozigose em dois genes diferentes, uma no gene *GJB2* e outra no *SLC26A4*.

Mutações na região codificante do gene *SLC26A4* que reduzem ou anulam a atividade transportadora da proteína Pendrina são a causa mais comum de surdez síndrômica (Coyle *et al.*, 1998) e, além disso, são encontradas em mais de 4% dos pacientes com perda auditiva não-síndrômica (Albert *et al.*, 2006). Mais de 200 mutações no gene *SLC26A4* já foram identificados até o momento (<http://www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor/slcMutations.htm>). A maioria destas mutações (~64%) trata-se de alterações em um único nucleotídeo que resultam na substituição de aminoácidos. Aproximadamente 16% conduzem a inserções ou deleções de aminoácidos, 13% afetam regiões de *splicing* do gene e cerca de 6% tornam a proteína truncada. Testes funcionais da Pendrina alterada com variantes alélicas em pacientes com Síndrome de Pendred ou surdez não-síndrômica associada a EVA revelaram que o fenótipo patológico é consequência da redução ou perda de função da proteína Pendrina, a qual é responsável pelo transporte de íons (Scott *et al.*, 2000). Além disso, o estudo de localização da Pendrina apresentando diferentes alterações revelou que esta proteína mutada é frequentemente mantida em compartimentos intracelulares e incapaz de alcançar a membrana plasmática, anulando sua função de transporte. Algumas proteínas mutadas, no entanto, conseguem atingir parcialmente a membrana e mostrar a função de transporte diminuída (Taylor *et al.*, 2002; Rotman-Pikielny *et al.*, 2002). Outras se localizam apenas na membrana plasmática e podem realizar sua função normalmente ou ter sua função diminuída ou abolida. Neste trabalho, foram realizados os ensaios funcionais e de co-localização da proteína Pendrina com 7 variantes alélicas: P142L, G149R, T193I, C282Y, Q413R, L445W e R776C.

No rastreamento do gene *SLC26A4*, a alteração C282Y foi encontrada em heterozigose no paciente C26, no qual já havia sido detectada a deleção 35delG em heterozigose no gene *GJB2*. A alteração C282Y foi primeiramente encontrada

neste trabalho. Para desvendar se esta mutação altera o funcionamento normal da atividade transportadora da proteína Pendrina, ensaios funcionais e de co-localização foram realizados. Foi observado que a Pendrina C282Y exerce parcialmente sua função na membrana plasmática, já que sua atividade é reduzida em relação a Pendrina WT. Neste caso, a presença de duas alterações em heterozigose em genes diferentes (padrão de herança digênica) poderá realmente levar este indivíduo à perda auditiva? No que diz respeito à etiologia molecular da perda auditiva neurossensorial, a maioria dos estudos anteriores relataram a surdez como uma doença monogênica incluindo mutações nos dois alelos (heterozigotos compostos ou homozigotos em um gene em pacientes com surdez autossômica recessiva) (Choi *et al.*, 2009). Ocasionalmente, os padrões de herança digênica foram analisados hipoteticamente como causa da perda auditiva neurossensorial em alguns pacientes com duas mutações em heterozigose em dois genes diferentes, o gene da Caderina 23 – *CDH23*– e o gene da Protocaderina 15 – *PCDH15* (Zheng *et al.*, 2005). O grau da perda auditiva nos indivíduos que apresentam mutações no gene *GJB2* ou *SLC26A4* é muito variado, de surdez moderada à profunda. Não é possível chegar a qualquer conclusão absoluta em relação ao efeito aditivo, em que o paciente que apresenta alterações nos dois genes *SLC26A4* e *GJB2* pode não ter consequência adicional sobre a perda auditiva, isto é, a surdez nesses casos pode não ser mais grave do que aquela causada pelas mutações presentes apenas no gene *SLC26A4* ou somente no gene *GJB2*. O mecanismo subjacente a estas observações ainda é desconhecido. É possível que os genes *GJB2* e o *SLC26A4* funcionem de forma independente, apresentando pouca interação entre eles. Alternativamente, o momento de seus efeitos pode ser diferente, de tal modo que o gene *GJB2* seja mais proeminente no desenvolvimento precoce, ao passo que o efeito do gene *SLC26A4* ocorra tardiamente (Huang *et al.*, 2013). Dessa forma, não se pode afirmar que a perda auditiva no paciente C26 se deva à herança digênica e tampouco contradizer esta especulação. Portanto, para tentar elucidar os

mecanismos da herança digênica, as mutações patogênicas em dois ou mais genes poderiam ser boas candidatas para o estudo das interações em que os produtos dos dois genes participem da mesma via e, assim, entender de que maneira esse mecanismo poderia ter efeito sobre a perda auditiva.

No rastreamento molecular do gene *SLC26A4* em 60 indivíduos brasileiros, foram identificadas 14 diferentes alterações (11 alterações *missense* (de sentido trocado), 2 mutações no sítio de splicing e 1 deleção). Dessas alterações, 3 foram detectadas pela primeira vez neste trabalho (P142L, G149R e C282Y) e 2 delas já encontram-se publicadas na literatura, a P142L e G149R (de Moraes, 2012).

No Grupo I, pacientes com surdez sem EVA, cinco indivíduos apresentaram mutação em apenas um alelo do gene *SLC26A4* (heterozigotos – 3 indivíduos V609G/N; 1 V138F/N e 1 C282Y/N). A alteração V609G tem sido classificada como não patogênica no banco de dados do NCBI, pelo fato de ter sido encontrada aproximadamente na mesma frequência em um grupo controle de ouvintes e em um grupo com perda auditiva (Pera *et al.*, 2008). Porém, Dossena e colaboradores (2011) realizaram o estudo funcional da Pendrina V609G por meio de métodos fluorimétricos e demonstraram que essa mutação não elimina a função da Pendrina, contudo, leva à diminuição de função da proteína, indicando um potencial patogênico principalmente se associada a outro fator genético ou ambiental. Outra alteração encontrada no Grupo I (paciente C15) foi a mutação V138F. Esta alteração tem sido relatada em pacientes com Síndrome de Pendred (Coyle *et al.*, 1998; Van Hauwe *et al.*, 1998), porém o paciente C15 não apresenta a síndrome. Esta alteração foi funcionalmente caracterizada, sendo considerada patogênica. A Pendrina V138F fica retida no retículo endoplasmático, não realizando, portanto, sua função normal (Taylor, 2002). A grande questão é que as mutações V609G e V138F foram encontradas em heterozigose, impossibilitando o diagnóstico preciso do fenótipo da perda auditiva nestes pacientes.

No Grupo II, pacientes com perda auditiva e EVA, nove pacientes apresentaram mutações no gene *SLC26A4*, sendo quatro indivíduos com alteração em apenas um alelo (15AA, 16AA, 18AA, L1AA) cinco indivíduos com alterações nos dois alelos (02AA, 06AA, 21AA, 22AA, 24AA). Entre os cinco indivíduos que apresentaram alterações nos dois alelos, apenas um apresentou mutação em homozigose no gene *SLC26A4* (R409H/R409H). Os quatro casos restantes são heterozigotos compostos (T410M/IVS15 +5 G> A; V138F/Q413R; P142L/279delT; L445W/IVS8 +1 G> A). É importante afirmar que estes cinco indivíduos que apresentaram alterações nos dois alelos do gene *SLC26A4* tiveram o diagnóstico do fenótipo da perda auditiva estabelecido.

A mutação R409H foi detectada em homozigose no paciente 22AA. Em estudo funcional realizado, foi visto que a Pendrina R409H possui redução ou mesmo ausência de sua função transportadora de íons, afetando a composição iônica da endolinfa e levando, portanto, o indivíduo à perda auditiva (Gillam *et al.*, 2005).

Entre os quatro heterozigotos compostos, o paciente 02AA apresentou 2 mutações anteriormente descritas, T410M e IVS15+5G>A. A alteração T410M é considerada patogênica, uma vez que, a Pendrina alterada fica retida no retículo endoplasmático, não sendo capaz de exercer sua função (Taylor, 2002). A segunda mutação encontrada no indivíduo 02AA, IVS15+5G>A, é uma alteração que ocorre no sítio de splicing do gene *SLC26A4*. Esta substituição trata-se de uma mutação patogênica que leva à perda da expressão da proteína Pendrina, resultando no fenótipo da Síndrome de Pendred ou surdez não-sindrômica associada ao EVA (Ganaha *et al.*, 2013).

Além da mutação patogênica V138F encontrada no paciente 06AA, também foi detectada a alteração Q413R, a qual já havia sido descrita na literatura, porém ainda não havia sido caracterizada funcionalmente. Então, neste

estudo, foi realizada a co-localização celular e o estudo funcional da Pendrina Q413R. Esta proteína alterada fica retida no retículo endoplasmático, reduzindo a função da Pendrina. Teoricamente, neste caso, a Pendrina alterada não deveria apresentar funcionalidade alguma, uma vez que está retida no retículo. Porém, é possível que alguma porcentagem residual da Pendrina Q413R consiga alcançar a membrana plasmática, realizando sua função de forma reduzida. Além da função reduzida da Pendrina Q413R, sabe-se que a Pendrina V138F não é capaz de exercer sua função, como discutido anteriormente. Dessa forma, a surdez associada ao EVA apresentada pelo indivíduo 06AA obteve sua etiologia esclarecida.

No paciente 21AA do Grupo II também foram detectadas alterações nos dois alelos do gene *SLC26A4*, a deleção 279delT e a mutação P142L. A deleção 279delT, localizada no codon 93, altera o quadro de leitura (*frameshift*) do RNA mensageiro, ou seja, da proteína, fazendo com que ocorra o aparecimento de um *stop codon* (TAG) no códon 96. Esta alteração resulta no truncamento da Pendrina no primeiro domínio transmembrânico da proteína. A mutação P142L foi primeiramente encontrada neste trabalho, portanto, não apresentava co-localização celular definida e tampouco caracterização funcional esclarecida. Dessa forma, para elucidar se haveria alteração na proteína Pendrina P142L, foram realizados estudos funcionais e de co-localização celular. Esta proteína alterada alcança a membrana plasmática, porém apresenta função reduzida em relação à proteína sem alteração. Dessa maneira, foi possível estabelecer o diagnóstico da perda auditiva associada ao EVA no paciente 21AA.

Por fim, o quarto indivíduo heterozigoto composto encontrado neste estudo refere-se ao paciente 24AA, o qual apresenta duas mutações já descritas no gene *SLC26A4*, L445W e IVS8+1G>A. Este paciente é o único da casuística que apresenta bócio aparente, apresentando, portanto, as manifestações clínicas da Síndrome de Pendred. A mutação IVS8+1G>A ocorre no sítio de splicing

doador do gene e está envolvida no processo de splicing anormal, alterando a estrutura da proteína Pendrina (Maciaszczyk *et al.*, 2008). A mutação L445W resulta na substituição do aminoácido Leucina por Triptofano. Sabe-se que a Leucina 445 é um aminoácido altamente conservado entre diversos outros transportadores de íons, em diferentes espécies, o que sugere que poderia ser importante para a função da proteína Pendrina (Cama *et al.*, 2009). Dessa forma, foi realizado neste trabalho a co-localização da Pendrina L445W e sua caracterização funcional. Como resultado, foi visto que a proteína Pendrina alterada fica retida no retículo endoplasmático e, portanto, não realiza sua função. Então, a Síndrome de Pendred neste indivíduo apresentou etiologia esclarecida.

Mutações encontradas em apenas um alelo foram detectadas em 4 indivíduos do Grupo II (15AA – R776C/N, 16AA – G149R/N, 18AA – T193I/N, L1AA – V609G/N) . Nestes casos, o diagnóstico da perda auditiva não foi esclarecido. Dessa forma, foi realizado o rastreamento da região promotora do gene *SLC26A4* nestes 4 pacientes na tentativa de estabelecer a etiologia da perda auditiva. Algumas alterações foram encontradas na região promotora do gene, porém ainda não há como definir se estas mutações são patogênicas ou não. Pode-se especular a respeito da alteração c.-964A>C ser patogênica, uma vez que a Pendrina R776C é totalmente funcional e não é capaz de causar surdez em pacientes com EVA. Outra indagação a ser pensada é o fato do paciente L1AA apresentar 3 alterações na região promotora do gene *SLC26A4*. Este dado pode fazer a diferença entre os pacientes com perda auditiva que também apresentaram a mutação V609G, porém sem EVA. Nestes casos, é provável que o segundo alelo mutante ainda não tenha sido identificado devido a (a) mutações em introns que não foram investigadas neste estudo, (b) mutações em outros genes que podem ser patogênicas (herança digênica). O grande empecilho neste questionamento está na não realização do rastreamento da região promotora do gene *SLC26A4* nos pacientes que não apresentam EVA. Nos pacientes do Grupo

I (sem EVA), 4 pacientes apresentaram alterações em heterozigose no gene *SLC26A4* encontradas também em indivíduos com EVA, a V609G e a V138F. Nesses indivíduos não foi detectada alteração no outro alelo.

Nenhuma mutação predominante foi detectada no gene *SLC26A4* nos indivíduos brasileiros. O espectro de mutações encontradas é amplo, com mutações patogênicas que afetam 9 de 20 exons. Estes achados ainda não vão impedir que todos os 20 exons do gene *SLC26A4* sejam rastreados em busca do diagnóstico da Síndrome de Pendred ou da surdez associada ao EVA. No entanto, a análise poderia ser iniciada com os exons 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 15 e 17 nos quais foram encontradas mutações patogênicas.

Além do rastreamento molecular do gene *SLC26A4*, os pacientes deste trabalho também foram analisados quanto à presença de mutações nos genes *FOXI1* e *KCNJ10*, os quais parecem desempenhar um importante papel nos casos de indivíduos com surdez associada ao EVA ou Síndrome de Pendred. Porém, não foi encontrada nenhuma evidência de contribuição digênica, uma vez que nenhum paciente desta casuística com alteração no gene *SLC26A4* apresentou mutações nos genes *FOXI1* e/ou *KCNJ10*.

Nos casos em que os indivíduos com EVA não apresentaram mutações no gene *SLC26A4*, pode ser que haja outro gene envolvido como causa da surdez. Embora, até o momento, não tenha sido descrito na literatura nenhum outro gene que possa ser responsável pela perda auditiva associada ao EVA. Além disso, o aqueduto vestibular alargado não é uma manifestação clínica exclusiva da Síndrome de Pendred ou da surdez não-sindrômica (DFNB4), também pode ser encontrado nas síndromes de BOR (brânquio-oto-renal) e de Waardenburg. Dessa forma, pode ser postulado que alguns pacientes que não apresentam mutações no gene *SLC26A4* podem representar formas esporádicas ou incompletas da Síndrome de BOR ou de Waardenburg (Albert *et al.*, 2006). Para finalizar a

discussão em torno dos pacientes com EVA que não apresentaram alterações no gene *SLC26A4*, vários estudos têm envolvido proteínas que compõem os canais iônicos responsáveis pela homeostase da endolinfa. Alterações nestas proteínas poderiam ser responsáveis por alguns casos de surdez associada a EVA (Wangemann *et al.*, 2004).

No Grupo I, composto por indivíduos surdos que não apresentam EVA, ficou evidente que o rastreamento do gene *SLC26A4* não foi suficiente para explicar a perda auditiva nesses pacientes, uma vez que foram encontradas apenas alterações em um alelo do gene. Por outro lado, no Grupo II, formado por indivíduos surdos que apresentam EVA, o rastreamento do gene *SLC26A4* possibilitou o esclarecimento do diagnóstico etiológico da perda auditiva em 5 pacientes que apresentaram mutações nos dois alelos do gene *SLC26A4*, correspondendo a aproximadamente 17% dos casos.

Tem sido demonstrado em diversos trabalhos que embora a prevalência de mutações no gene *SLC26A4* em pacientes com Síndrome de Pendred esteja claramente estabelecida, ainda são necessários muitos estudos com um grande número de pacientes que apresentem surdez não-sindrômica e informações clínicas detalhadas. Dessa maneira, será possível direcionar de forma concisa o rastreamento a ser realizado em pacientes com este fenótipo.

É de extrema importância a implementação em conjunto do estudo molecular ao estudo funcional para que se possa discriminar de forma inequívoca as mutações patogênicas das variantes alélicas que podem não ser consideradas determinantes genéticos para a Síndrome de Pendred ou surdez não-sindrômica associada ao EVA. Portanto, vale ressaltar a grande contribuição deste trabalho para a literatura. Foram realizadas a co-localização celular e a caracterização funcional de 7 variações alélicas da proteína Pendrina. Além de terem sido detectadas 3 novas alterações no gene *SLC26A4*.

CONCLUSÕES

No Grupo I, composto por indivíduos surdos que não apresentam EVA, ficou evidente que o rastreamento do gene *SLC26A4* não foi suficiente para explicar a perda auditiva nesses pacientes, uma vez que foram encontradas apenas alterações em um alelo do gene. Por outro lado, no Grupo II, formado por indivíduos surdos que apresentam EVA, o rastreamento do gene *SLC26A4* possibilitou o esclarecimento do diagnóstico etiológico da perda auditiva em 5 pacientes que apresentaram mutações nos dois alelos do gene *SLC26A4*;

Não foi encontrada nenhuma evidência de contribuição digênica relacionada ao gene *FOXI1* e/ou *KCNJ10*, uma vez que nenhum paciente desta casuística com alteração no gene *SLC26A4* apresentou mutações nesses genes;

É de extrema importância a implementação em conjunto do estudo molecular ao estudo funcional para que se possa discriminar de forma inequívoca as mutações patogênicas das variantes alélicas que podem não ser consideradas determinantes genéticos para a Síndrome de Pendred ou surdez não-sindrômica associada ao EVA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU-SILVA, RS; LEZIROVITZ, K; BRAGA, MC; SPINELLI, M; PIRANA, S; DELLA-ROSA, VA; OTTO, PA; MINGRONI-NETTO, RC. Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNA^{Ser}(UCN) mitochondrial mutations in hearing impaired Brazilian patients. *Braz J Med Biol Res*, 39(2): 219-226, 2006.
- 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, JOURNAL H, CATROS H, DOLLFUS H, ELIOT MM, DAVID A, CALAIS C, DROUIN-GARRAUD V, OBSTOY MF, TRAN BA HP, LACOMBE D, DURIEZ F, FRANCANNET C, BITOUN P, PETIT C, GARABEDIAN 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;14:773-779.
- ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*, New York: Garland Science, 2002.
- AMIEL A. DROR, ZIPPORA BROWNSTEIN AND KAREN B. AVRAHAM. Review: Integration of Human and Mouse Genetics Reveals Pendrin Function in Hearing and Deafness. *Cell Physiol Biochem* 2011;28:535-544 Accepted: September 28, 2011.
- AMMAR-KHODJA, F; FAUGÈRE, V; BAUX, D; GIANNESINI, C; LÉONARD, S; MAKRELOUF, M; MALEK, R; DJENNAOUI, D; ZENATI, A; CLAUSTRES, M; ROUX, AF. Molecular screening of deafness in Algeria: High genetic heterogeneity involving DFNB1 and the Usher loci, DFNB2/USH1B, DFNB12/USH1D and DFNB23/USH1F. *European Journal of Medical Genetics*, 52: 174–179, 2009.
- ANDERSON, S; BANKIER, AT; BARREL, BG; BRUIJN, MHL; COULSON, AR; DROUIN, J; EPERON, IC; NIERLICH, DP; ROE, BA; SANGER, F; SCHREIER, PH; SMITH, AJ; STADEN, R; YOUNG, IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290: 457-65, 1981.
- ARAVIND L, KOONIN EV. The STAS domain - a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Curr Biol*. 2000 Jan 27;10(2):R53-5.
- AZAIÉZ H, YANG T, PRASAD S, SORENSEN JL, NISHIMURA CJ, KIMBERLING WJ, SMITH RJ. Genotype-phenotype correlations for *SLC26A4*-related deafness. *Hum Genet*. 2007 Dec;122(5):451-7. Epub 2007 Aug 10.
- BAUMAN, NG. *Ototoxic Drugs Exposed: The shocking truth about prescription drugs and other chemicals that can (and do) damage our ears*, Stewartstown, PA, Guidepost Publications, 2003.
- BELTRAMELLO, M; PIAZZA, V; BUKAUSKAS, FF; POZZAN, T; MAMMANO, F. Impaired permeability to Ins(1,4,5)P₃ in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness. *Nat Cell Biol*, 7: 63-69, 2005.
- BEYER, EC. Gap junctions. *International Review of Cytology*, 137: 1-37, 1993.

- BEYER, EC; LIPKIND, GM; KYLE, JW; BERTHOUD, VM. Structural organization of intercellular channels II. Amino terminal domain of the connexins: sequence, functional roles, and structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, doi: 10.1016/j.bbamem.2011.10.011.
- BICEGO M, BELTRAMELLO M, MELCHIONDA S, CARELLA M, PIAZZA V, ZELANTE L, BUKAUSKAS FF, ARSLAN E, CAMA E, PANTANO S, BRUZZONE R, D'ANDREA P, MAMMANO F. Pathogenetic role of the deafness-related M34T mutation of Cx26. *Hum Mol Genet*. 2006 Sep 1;15(17):2569-87.
- BILTON T, RAMOS LR, EBEL S, TEIXEIRA LS TEGA LP. Prevalência da deficiência auditiva em uma população idosa. *Mundo Saúde*; 21 (4): 218-25, 1997.
- BRIANTI, MT. Estudo da frequência de mutações mitocondriais em brasileiros portadores de deficiência auditiva neurosensorial não-sindrômica de etiologia não esclarecida. Campinas, SP: [s.n.], 2003.
- BROWNSTEIN Z, BHONKER Y, AVRAHAM KB. High-throughput sequencing to decipher the genetic heterogeneity of deafness. *Genome Biol*. 2012 May 29;13(5):245. doi: 10.1186/gb-2012-13-5-245.
- 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;134:403-407.
- CALHÁU, CMDF; LIMA-JÚNIOR, LRP; REIS, AMCS; CAPISTRANO, AKB; LIMA, DVSP; CALHÁU, ACDF; RODRIGUES-JÚNIOR, FA. Etiology profile of the patients implanted in the cochlear implant program. *Braz J Otorhinolaryngol*, 77(1): 13-8, 2011.
- CAMA E., M.S. ALEMANNI, E. BELLACCHIO, R. SANTARELLI, M. CARELLA, L. ZELANTE, PALLADINO T, INCHESE 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*. 73 (October(10)) (2009) 1458–1463 (Epub 2009 July 16).
- CHENG, X.; LI L.; BRASHEARS, S.; MORLET, T.; NG, S.S.; BERLIN, C.; HOOD, L.; KEATS, B. Connexin 26 variants and auditory neuropath/ Dys-Synchrony among children in schools for the deaf. *Am J Med Genet* 139A:13-18, 2005.
- CHOI B.Y., A.K. STEWART, A.C. MADEO, S.P. PRYOR, S. LENHARD, R. KITTLES, *ET AL.*, Hypofunctional *SLC26A4* variants associated with nonsyndromic hearing loss and enlargement of the vestibular aqueduct: genotype–phenotype correlation or coincidental polymorphisms? *Hum. Mutat*. 30 (4) (2009) 599–608.
- CORTI A: Recherches sur l'organe de l'ouïe des mammiferes. *Ztschr wissenschaft Zool* 1851;3:109–169.
- COULOIGNER, V; STERKERS, O; FERRARY, E. What's new in ion transports in the cochlea? *Pflugers Arch*, 453: 11-22, 2006.

- COYLE B, REARDON W, HERBRICK JA, TSUI LC, GAUSDEN E, LEE J, COFFEY R, GRUETERS A, GROSSMAN A, PHELPS PD, LUXON L, KENDALL-TAYLOR P, SCHERER SW, TREMBATH RC. Molecular analysis of the *PDS* gene in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet* 1998;7:1105-1112.
- CREMERS, C. W. R. J.; BOLDER, C.; ADMIRAAL, R. J. C.; EVERETT, L. A.; JOOSTEN, F. B. M.; VAN HAUWE, P.; GREEN, E. D.; OTTEN, B. J. Progressive sensorineural hearing loss and a widened vestibular aqueduct in Pendred syndrome. *Arch. Otolaryng. Head Neck Surg.* 124: 501-505, 1998.
- DAAHL, H.H.; TOBIN, S.E.; POULAKIS, Z.; RICKARDS, F.W.; XU, X.; GILLAM, L.; WILLIAMS, J.; SAUNDERS, K.; CONE-WESSON, B.; WAKE, M. The contribution of *GJB2* mutations slight or mild hearing loss in Australian elementary school children. *J Med Genet* 43: 850-855, 2006.
- DAVIS N, LUNARDI C, SHIELD JP: Sensorineural deafness and hypothyroidism: autoimmunity causing 'pseudo-Pendred syndrome'. *Horm Res* 2006;65:267-268.
- DAVIS, H & SILVERMAN, SR. AUDITORY TEST HEARING AIDS. IN: DAVIS H, SILVERMANN SR, (Ed.). *Hearing and deafness*, New York, Holt: Rinehart and Winston, 83-139, 1970.
- DAVIS, RR; KOZEL, P; ERWAY, LC. Genetic influences in individual susceptibility to noise: A review. *Noise Health*, 5(20): 19-28, 2003.
- 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. doi: 10.1016/j.ijporl.2012.11.042. Epub 2012.
- DEL CASTILLO, F.J.; DELCASTILLO, F.J.; HUTCHIN, T.; LEONARDI, E.; OLIVEIRA, C.A.; AZAHIN, H.; SIEMERING, K.R.; WEIL, D.; WUYTS, W.; AGUIRRE, L.A.; MARTIN, Y.; MORENO-PELAYO, M.A.; VILLAMAR, M.; AVRAHAM, K.B.; DAHL, H.H.; KANANN, M.; NANCE, W.E.; PETIT, C.; SMITH, R.J.; VAN CAMP, G.; SARORATO, E.L.; MURGIA, A.; MORENO, F.; DELCASTILLO, 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 nonsyndromic hearing impairment. *J. Med. Genet.*, 42: 588-94, 2005.
- DEL CASTILLO, FJ; AGUIRRE, LA; RODRÍGUEZ-BALLASTEROS, M; VILLAMAR, M; MORENO-PELAYO, MA; MORENO, F; DEL CASTILLO, I. A novel 200-kb deletion involving the *GJB6* (connexin-30) gene at the DFNB1 locus is found in the compound heterozygous state with a *GJB2* (connexin-26) mutation in subjects with autosomal recessive hearing impairment. In: 7th Molecular Biology of Hearing and Deafness, 2009, Boston. Livro de Resumos. Boston: Harvard Medical School, 85, 2009.
- DEL CASTILLO, I.; MORENO-PELAYO, M. A.; DELCASTILLO, F. J.; BROWNSTEIN, Z.; MARLIN, S.; ADINA, Q.; *et al.*- Prevalence and Evolutionary origins of the del(*GJB6-D13S1830*) mutation in the DFNB1 locus in hearing impairment subjects: a multicenter study. *Am. F. Hum. Genet.*, 73(6): 1452-8, 2003.

- DEL CASTILLO, I; VILLAMAR, M; MORENO-PELAYO, MA; DEL CASTILLO, FJ; ALVAREZ, A; TELLERÍA, D; MENÉNDES, I; MORENO, F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med*, 346(4): 243-249, 2002.
- DENOYELLE, F.; MARLIN, S.; WEIL, D.; MOATTI, L.; CHAUVIN, P.; GARABEDIAN, E.N.; PETIT, C. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin 26 gene defect: implication for genetic counseling. *Lancet* (17): 1298- 1303, 1999.
- DENOYELLE, F.; WEIL, D.; MAW, M.A.; WILCOX, A.S.; LENCH, N.J.; ALLEN-POWELL, D.R.; OSBORN, A.H.; DAHL, H.H.M.; MIDDLETON, A.; HOUSEMAN, M.J.; DODÉ, C.; MARLIN, S.; BOULILA-ELGAÏED, A.; GRATI, M.; AYADI, H.; BENARAB, S.; BITOUN, P.; LINA-GRANAE, G.; GODET, J.; MUSTAPHA, M.; LOISELET, J.; EL-ZIR, É.; AUBOIS, A.; JOANNARD, A.; LEVILLIERS, J.; GARABÉDIAN, E.N.; MUELLER, R.F. Prelingual deafness: high prevalence of a 35delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum. Mol. Genet*, 6(12): 2173-77, 1997.
- DICIONMO DP, DUCKETT A, BURCESCU I, BREMNER R, GALLIE BL. Retinoblastoma protein purification and transduction of retina and retinoblastoma cells using improved alphavirus vectors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3320-3329.
- DOSSENA S, BIZHANOVA A, NOFZIGER C, BERNARDINELLI E, RAMSAUER J, KOPP P, PAULMICHL M. Identification of allelic variants of pendrin (*SLC26A4*) with loss and gain of function. *Cell Physiol Biochem*.28(3):467-76, 2011.
- DOSSENA S, RODIGHIERO S, VEZZOLI V, NOFZIGER C, SALVIONI E, BOCCAZZI M, GRABMAYER E, BOTTA G, MEYER G, FUGAZZOLA L, BECK-PECCOZ P, PAULMICHL M: Functional characterization of wildtype and mutated pendrin (*SLC26A4*), the anion transporter involved in Pendred syndrome. *J Mol Endocrinol* 2009;43:93-103.
- DOSSENA S, NOFZIGER C, BROWNSTEIN Z, KANAAN M, AVRAHAM KB, PAULMICHL M. Functional characterization of pendrin mutations found in the Israeli and Palestinian populations. *Cell Physiol Biochem*. 2011;28(3):477-84. doi: 10.1159/000335109. Epub 2011 Nov 18.
- DOSSENA S, NOFZIGER C, TAMMA G, BERNARDINELLI E, VANONI S, NOWAK C, GRABMAYER E, KÖSSLER S, STEPHAN S, PATSCH W, PAULMICHL M. Molecular and functional characterization of human pendrin and its allelic variants. *Cell Physiol Biochem*. 2011;28(3):451-66. doi: 10.1159/000335107. Epub 2011 Nov 18.
- DOSSENA S, RODIGHIERO S, VEZZOLI V, BAZZINI C, SIRONI C, MEYER G, FÜRST J, RITTER M, GARAVAGLIA ML, FUGAZZOLA L, PERSANI L, ZOROWKA P, STORELLI C, BECK-PECCOZ P, BOTTÁ G, PAULMICHL M. Fast fluorometric method for measuring pendrin (*SLC26A4*) Cl⁻/I⁻ transport activity. *Cell Physiol Biochem*. 2006;18(1-3):67-74. Epub 2006 Aug 15.
- DROR AA, AVRAHAM KB: Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annu Rev Genet* 2009;43:411-437.

- ESTIVILL X; FORTINA P; SURREY S; RABIONET R; MELCHIONDA S; D'AGRUMA L; MANSFIELD E; RAPPAPORT E; GOVEA N; MILÀ M; ZELANTE L; GASPARINI P. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet*. 351:394-98, 1998.
- 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, 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 U S A*. 1999 Aug 17;96(17):9727-32.
- EVERETT, L.A.; GLASER, B.; BECK, J.C.; IDOL, J.R.; BUCHS, A.; HEYMAN, M.; ADAWI, F.; HAZANI, E.; NASSIR, E.; BAXEVANIS, A.D.; SHEFFIELD, V.C.; GREEN, E.D. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nature Genet*. 17(4): 411-422, 1997.
- FINSTERER, J; FELLINGER, J. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *Int J Pediat Otorhinolaryngol*, 69: 621-649, 2005.
- FISHEL-GHODSIAN, N; BYKHOVSKAYA Y, TAYLOR K, KAHEN T, CANTOR R, EHRENMAN K, SMITH R, KEITHLEY E. Temporal bone analysis of patients with presbycusis reveals high frequency of mitochondrial mutations. *Hear Res*, 110(1-2): 147-154, 1997.
- FISHEL-GHODSIAN, N; PREZANT, TR; BU, X; OZTAS, S. Mitochondrial ribosomal RNA gene mutation in a patient with sporadic aminoglycoside ototoxicity. *Am J Otolaryngol*, 14: 339-403, 1993.
- FRASER GR, MORGANS ME, TROTTER WR. The syndrome of sporadic goitre and congenital deafness. *Q J Med*. 1960 Apr;29:279-95. No abstract available.
- FRASER, G. R. Association of congenital deafness with goiter (Pendred's syndrome): a study of 207 families. *Ann. Hum. Genet*. 28: 201-249, 1965.
- FRIEDMAN, LM; DROR, AA; AVRAHAM, KB. Mouse models to study inner ear development and hereditary hearing loss. *Int J Dev Biol*, 51: 609-631, 2007
- FRIEDMAN, RA; BYKHOVSKAYA, Y; SUE, CM; DIMAURO, S; BRADLEY, R; FALLIS-CUNNINGHAM, R; PARADISE, N; PENSAK, M; SMITH, R; GORDON, J; LI, X; FISHEL-GHODSIAN, N. Maternally inherited nonsyndromic hearing loss. *American Journal of Medical Genetics*, 84(4): 369-372, 1999.
- FUGAZZOLA L, CERUTTI N, MANNAVOLA D, CRINO A, CASSIO A, GASPARONI P, VANNUCCHI G, BECK-PECCOZ P: Differential diagnosis between Pendred and pseudo-Pendred syndromes: clinical, radiologic, and molecular studies. *Pediatr Res* 2002;51:479-484.

- FUGAZZOLA L, MANNAVOLA D, CERUTTI N, MAGHNIÉ M, PAGELLA F, BIANCHI P, WEBER G, PERSANI L, BECK-PECCOZ P: Molecular analysis of the Pendred's syndrome gene and magnetic resonance imaging studies of the inner ear are essential for the diagnosis of true Pendred's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2469-2475.
- GALIETTA LJ, HAGGIE PM, VERKMAN AS. (2001). Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities. *FEBS letters*, 499(3), 220-4.
- GANAHA A, KANAME T, YANAGI K, NARITOMI K, TONO T, USAMI S, SUZUKI M. Pathogenic substitution of IVS15 + 5G>A_in *SLC26A4* in patients of Okinawa Islands with enlarged vestibular aqueduct syndrome or Pendred syndrome. *BMC Med Genet*. 2013 May 24;14:56. doi: 10.1186/1471-2350-14-56.
- GILLAM MP, L. BARTOLONE, P. KOPP, S. BENVENGA. Molecular analysis of the PDS gene in a nonconsanguineous Sicilian family with Pendred's syndrome, *Thyroid* 15 (July (7)) (2005) 734-741.
- GILLAM MP, SIDHAYE AR, LEE EJ, RUTISHAUSER J, STEPHAN CW, KOPP P. Functional characterization of pendrin in a polarized cell system. Evidence for pendrin-mediated apical iodide efflux. *J Biol Chem*. 2004 Mar 26;279(13):13004-10. Epub 2004 Jan 8
- HELLER, S.; SHEANE, C.A.; JAVED, Z.; HUDSPETH, A.J. Molecular markers for cell types of the inner ear and candidate genes for hearing disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95(19): 11400-11405, 1998.
- HILGERT, N; SMITH, RJH; VAN CAMP, G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res*, 681(2-3): 189-196, 2009a.
- HILGERT, N; SMITH, RJH; VAN CAMP, G. Function and expression pattern of nonsyndromic deafness genes. *Curr Mol Med*, 9(5): 546-564, 2009b.
- HOWELL, N; CHINNERY, PF; GHOSH, SS; FAHY, E; TURNBULL, DM. Transmission of human mitochondrial genome. *Hum Reprod*, 15(2): 235-245, 2000.
- HUANG S, HAN D, WANG G, YUAN Y, SONG Y, HAN M, CHEN Z, DAI P. Sensorineural hearing loss caused by mutations in two alleles of both *GJB2* and *SLC26A4* genes. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2013 Mar;77(3):379-83.
- HULANDER M, KIERNAN AE, BLOMQUIST SR, CARLSSON P, SAMUELSSON EJ, JOHANSSON BR, STEEL KP, ENERBACK S. Lack of pendrin expression leads to deafness and expansion of the endolymphatic compartment in inner ears of *FOX11* null mutant mice. *Development*. 2003 May; 130 (9): 2013-25.
- ITO, T; NOGUCHI, Y; YASHIMA, T; OHNO, K; KITAMURA, K. Hereditary Hearing Loss and Deafness Genes in Japan. *J Med Dent Sci*, 57: 1-10, 2010.

- IWASAKI, S; TAMAGAWA, Y; OCHO, S; HOSHINO, T, KITAMURA, K. Hereditary sensorineural hearing loss of unknown cause involving mitochondrial DNA A1555G mutation. *ORL*, 62: 100–103, 2000.
- KARA C, KILIC M, UCAKTURK A, AYDIN M: Congenital goitrous hypothyroidism, deafness and iodide organification defect in four siblings: pendred or pseudo-pendred syndrome? *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2010;2:81-84.
- KAZMIERCZAK P, SAKAGUCHI H, TOKITA J, WILSON-KUBALEK EM, MILLIGAN RA, MULLER U, KACHAR B: Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tiplink filaments in sensory hair cells. *Nature* 2007;449:87-91.
- KELLEY PM; HARRIS DJ; COMER BC; ASKEW JW; FOWLER T; SMITH SD; KIMBERLING WJ. Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 62(4):792-99, 1998.
- KELSELL, D.P.; DUNLOP, J.; STEVENS, H.P.; LENCH, N.J.; LIANG, J.N.; PARRY, G.; MUELLER, R.F.; LEIGH, I.M. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndrome sensorineural deafness. *Nature*. 387: 80-83, 1997.
- KIKUCHI, T.; KIMURA, R.S.; PAUL, D.L.; ADAMS, J.C. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat. Embryol. (Berl.)*, 191(2): 101-118, 1995.
- KO SB, SHCHEYNIKOV N, CHOI JY, LUO X, ISHIBASHI K, THOMAS PJ, KIM JY, KIM KH, LEE MG, NARUSE S, MUALLEM S: A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in cystic fibrosis. *EMBO J* 2002;21:5662-5672.
- KOBAYASHI, K; OGUCHI, T; ASAMURA, K; MIYAGAWA, M; HORAI, S; ABE, S; USAMI, S. Genetic features, clinical phenotypes, and prevalence of sensorineural hearing loss associated with the 961delT mitochondrial mutation. *Auris Nasus Larynx*, 32(2): 119-124, 2005.
- KOKOTAS, H; PETERSEN, MB; WILLEMS; PJ. Mitochondrial deafness. *Clin Genet*, 71: 379–91, 2007.
- KUMAR, NM & GILULA, NB. Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J Cell Biol*, 103: 767-776, 1986.
- LU, J; QIAN, Y; LI, Z; YANG, A; ZHU, Y; LI, R; YANG, L; TANG, X; CHEN, B; DING, Y; LI, Y; YOU, J; ZHENG, J; TAO, Z; ZHAO, F; WANG, J; SUN, D; ZHAO, J; MENG, Y; GUAN, M. Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the deafness-associated 12S rRNA 1555A>G mutation. *Mitochondrion*, 10: 69–81, 2010.
- MACIASZCZYK K, LEWIN'SKI A. Phenotypes of *SLC26A4* gene mutations: Pendred syndrome and hypoacusis with enlarged vestibular aqueduct, *Neuro Endocrinol. Lett.* 29 (February (1)) (2008) 29–36.

- MAEDA S, NAKAGAWA S, SUGA M, YAMASHITA E, OSHIMA A, FUJIYOSHI Y, TSUKIHARA T. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature*. Apr 2;458(7238):597-602, 2009.
- MAILLET, M. *Biologia Celular*. São Paulo: Santos Editora, 279-302, 2003.
- MANDERS, EMM, VERBEEK, FJ, ATEN, JA. Measurement of colocalization of objects in dual-colour confocal images, *Journal of Microscopy* 169, 375-382, 1993.
- MORGANS ME, TROTTER WR. Association of congenital deafness with goitre; the nature of the thyroid defect. *Lancet*. 1958 Mar 22;1(7021):607-9.
- NAKAYA K, HARBIDGE DG, WANGEMANN P, SCHULTZ BD, GREEN ED, *et al*. Lack of pendrin HCO₃⁻ transport elevates vestibular endolymphatic [Ca²⁺] by inhibition of acid-sensitive TRPV5 and TRPV6 channels. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 292:F1314–21, 2007.
- NANCE WE. The genetics of deafness. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, v. 9, n. 2, p. 109-119, 2003.
- NASS, MM. The circularity of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 56(4): 1215-1222, 1966.
- NOFZIGER C, DOSSENA S, SUZUKI S, IZUHARA K, PAULMICHL M. Pendrin function in airway epithelia. *Cell Physiol Biochem*. 2011;28(3):571-8. doi: 10.1159/000335115. Epub 2011 Nov 18.
- OLIVEIRA, C.A.; ALEXANDRINO, F.; SANDES, K.A.; SILVA, W.A.; MACIEL-GUERRA, A. T.; MAGNA, L. A.; SARTORATO, E. L. Frequency of the 35delG mutation in the *GJB2* gene in samples of European, Asian and African Brazilians. *Human Biology, Detroit* (76) n. 2: 313-316, 2004.
- OLIVEIRA, CA; CASTRO, SCP; GUERRA ATM; SARTORATO, EL. Report of two siblings with progressive neurosensorial hearing loss bearing V37I/V95M mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*). *The Brazilian Journal of Dysmorphology and Speech-Hearing Disorders*, Brasil, v. 2, n.3, p. 15-18, 2000.
- OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. Acesso em: Maio/2011.
- Organização Mundial de Saúde. Deafness and Hearing Impairment. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/index.html>. Acesso em: Abril/2010.
- ORMÖ M, CUBITT AB, KALLIO K, GROSS LA, TSIEN RY, REMINGTON SJ. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273:1392-1395, 1996.
- OSHIMA A, DOI T, MITSUOKA K, MAEDA S, FUJIYOSHI Y. Roles of Met-34, Cys-64, and Arg-75 in the assembly of human connexin 26. Implication for key amino acid residues for channel formation and function. *J Biol Chem*. 2003 Jan 17;278(3):1807-16.

- 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, 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;40:242-248
- PARVING A, HAUCH AM. The causes of profound hearing impairment in a school for the deaf--a longitudinal study. *Br J Audiol.* Apr;28(2): 63-9, 1994.
- PAUL, DL. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J Cell Biol*, 103: 123-134, 1986.
- PENDRED, V. Deaf-mutism and goitre. *Lancet.* II: 532, 1896.
- PERA A, DOSSENA S, RODIGHIERO S, GANDIA M, BOTTA G, MEYER G, MORENO F, NOFZIGER C, HERNANDEZ-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* 008;105:18608-18613, 2008.
- PFARR N, BORCK G, TURK A, NAPIONTEK U, KEILMANN A, MULLER-FORELL W, KOPP P, POHLENZ J: Goitrous congenital hypothyroidism and hearing impairment associated with mutations in the *TPO* and *SLC26A4/PDS* genes. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2678-2681.
- PIATTO VB, MANIGLIA JV. Hearing evaluation in children aged 3-6 years in day-care centers. *J Pediatr (Rio J)*. 2001 Mar-Apr;77(2):124-30.
- PIATTO, V.B.; BERTOLLO, E.M.G.; SARTORATO, E.L.; MANIGLIA, J.V. Prevalence of the *GJB2* mutations and the del(*GJB6*-d13s1830) mutation in Brazilian patients with deafness. *Hearing Research*: 196: 87-93, 2004.
- PICKLES JO, COMIS SD, OSBORNE MP: Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hear Res* 1984;15:103-112.
- PICKLES JO. Mutation in mitochondrial DNA as a cause of presbycusis. *Audiol Neurootol*, 9(1): 23-33, 2004.
- PINTO, JA; MELLO JUNIOR, CF; MARQUI, ACS; PERFEITO, DJ; FERREIRA, RDP; SILVA, RH. Enlarged vestibular aqueduct syndrome: reporto of 3 cases and literature review. *Rev Bras Otorrinolaringol*, 71(3): 386-391, 2005.
- POLLAK ,A.; SKÓRKA, A.; MUELLER-MALESINSKA, M.; KOSTRZEWA, G.; KISIEL, B.; WALIGÓRA, J.; KRAJEWSKI, P.; OLDAK, M.; KORNISZEWSKI, H.; PLOSKI, R. M34T and V37I mutations in *GJB2* associated hearing impairment: Evidence for pathogenicity and reduced penetrance. *Am J Med Genet A.*: 143A: 2534-2543, 2007.
- PRECIADO, DA; LAWSON, L; MADDEN, C; MYER, D; NGO, C; BRADSHAW, JK; CHOO, DI; GREINWALD JR, JH. Improved diagnostic effectiveness with a sequential diagnostic

- paradigm in idiopathic pediatric sensorineural hearing loss. *Otology & Neurotology*, 26: 610-615, 2005.
- PREZANT, TR; AGAPIAN, JV; BOHLMAN, MC; BU, X; OZTAS, S; QIU, WQ; ARNOS, KS; CORTOPASSI, GA; JABER, L; ROTTER, JI *et al.* Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet*, 4: 289-294, 1993.
- 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 Feb;42(2):159-65.
- PUPO, AC; BALIEIRO, CR; FIGUEIREDO, RSL. Retrospective study of hearing impaired children and teenager: characterizing the etiologies and audiological aspects. *Rev CEFAC*, 10(1):84-91, 2008.
- RABIONET, R.; GASPARINI, P.; ESTIVILL, X. - Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum. Mut.* 16(3): 190-202, 2000.
- RABIONET, R; LÓPES-BIGAS, N; ARBONÈS, ML; ESTIVILL, X. Connexin mutations in hearing loss, dermatological and neurological disorders. *TRENDS in Molecular Medicine*, 8(5): 205-212, 2002.
- Reardon W, Coffey R, Phelps PD, Luxon LM, Stephens D, Kendall-Taylor P, Britton KE, Grossman A, Trembath R. Pendred syndrome--100 years of underascertainment? *QJM*. 1997 Jul;90(7):443-7.
- ROBERTSON, N.G.; KHETARPAL, U.; GUTIERREZ-ESPELETA, G.A.; BIEBER, F.R.; MORTON, C.C. Isolation of novel and known genes from a human fetal cochlear cDNA library using subtractive hybridization and differential screening. *Genomics*; 23(1): 42-50, 1994.
- ROTMAN-PIKIELNY P, KORET HIRSCHBERG, PADMA MARUVADA, KOICHI SUZUKI, INES E. ROYAUX, ERIC D. GREEN, LEONARD D. KOHN, JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ, PAUL M. YEN. Retention of pendrin in the endoplasmic reticulum is a major mechanism for Pendred syndrome. Published by Oxford University Press Human Molecular Genetics, 2002, Vol. 11, No. 21 2625–2633.
- ROYAUX IE, SUZUKI K, MORI A, KATOH R, EVERETT LA, KOHN LD, GREEN ED. Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology*. 2000 Feb;141(2):839-45.
- RUSSO, ICP. Overview of audiology in Brazil: state of the art. *Audiology*, 39(4): 202-206, 2000.
- SANTOS AF, FELIX F, MARTINS GSQ, PINNA MH, BENTO RF, MONTEIRO TA, ANDRADA NC. Perda Auditiva Neurosensorial: Tratamento - Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e

cirurgia Cérvico-Facial, 2011 http://www.projetodiretrizes.org.br/diretrizes11/perda_auditiva_neurossensorial_tratamento.pdf

- SANTOS, R.L.; AULCHENKO, Y.S.; HUYGEN, P.L.; VAN DER DONK, K.P.; WIJS, I.J.; KEMPERMAN, M.H.; ADMIRAAL, R.J.C.; KREMER, H.; HOEFSLOOT, L.H.; CREMERS, C.W.R.J. Hearing impairment in Dutch patients with connexin 26 (*GJB2*) and connexin 30 (*GJB6*) mutations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 69 (2): 165-174, 2005.
- SARTORATO, E.L.; GOTTARDI, E.; OLIVEIRA, C.A; MAGNA L.A.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; SEIXAS, C.A.; MACIEL-GUERRA, A.T. Determination of the frequency of 35delG allele in Brazilian neonates. *Clin. Genet.* 58(1): 339-340, 2000.
- SCHERER WF, SYVERTON JT, GEY GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.* 1953 May;97(5):695-710.
- SCOTT DA, WANG R, KREMAN TM, ANDREWS M, MCDONALD JM, BISHOP JR, SMITH RJ, KARNISKI LP, SHEFFIELD VC. Functional differences of the *PDS* gene product are associated with phenotypic variation in patients with Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss (DFNB4). *Hum Mol Genet* 2000;9:1709-1715.
- SCOTT DA, WANG R, KREMAN TM, SHEFFIELD VC, KARNISKI LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nature Genetics*, v. 21, n. 4, p. 440-3, 1999.
- SHAFRIR Y, GUY HR. STAM: simple transmembrane alignment method. *Bioinformatics.* 2004 Mar 22;20(5):758-69. Epub 2004 Jan 29.
- SHAUKAT, S; FATIMA, Z; ZEHRRA, U; WAQAR, AB. Syndromic and non-syndromic deafness, molecular aspects of Pendred syndrome and its reported mutations. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 15(3): 59-64, 2003.
- SILVA, DPC; MONTOVANI, JC; OLIVEIRA, DT; FIORAVANTI, MP; TAMASHIRO, IA. The large vestibular aqueduct syndrome: a cause of neurosensory dysacusia (original title: Síndrome do aqueduto vestibular alargado: uma causa de disacusia neurossensorial). *Pró-Fono Revista de Atualização Científica*, 20(2): 133-135, 2008.
- SIMÕES, A.M. & MACIEL-GUERRA, A.T. – A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez sensorioneural profunda. *Jornal de Pediatria* 68: 254-257, 1992.
- SINCLAIR, JH & STEVENS, BJ. Circular DNA filaments from mouse mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 56(2): 508-514, 1966
- STEEL, K.P. Genetic deafness: a step closer. *Pediatrics.* Mar;103(3): 674, 1999.
- SUZUKI H, OSHIMA A, TSUKAMOTO K, ABE S, KUMAKAWA K, NAGAI K, SATOH H, KANDA Y, IWASAKI S, USAMI S. Clinical characteristics and genotype-phenotype correlation of hearing loss patients with *SLC26A4* mutations. *Acta Otolaryngol.* 2007 Dec;127(12):1292-7.

- SWEET RM, EISENBERG D. Correlation of sequence hydrophobicities measures similarity in three-dimensional protein structure. *J Mol Biol.* 1983 Dec 25;171(4):479-88.
- TAYLOR JP, RUSSELL A. METCALFE, PHILIP F. WATSON, ANTHONY P. WEETMAN, RICHARD C. TREMBATH. Mutations of the PDS Gene, Encoding Pendrin, Are Associated with Protein Mislocalization and Loss of Iodide Efflux: Implications for Thyroid Dysfunction in Pendred Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2002, 87(4):1778–1784.
- VAN BRUGGEN, EF; BORST, P; RUTTENBERG, GJ; GRUBER, M; KROON, AM. Circular mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta*, 119(2): 437-439, 1966.
- VAN CAMP, G & SMITH, RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. Disponível em <<http://hereditaryhearingloss.org>>. Acesso 2012.
- VAN HAUWE P, L.A. EVERETT, P. COUCKE, D.A. SCOTT, M.L. KRAFT, C. RIS-STALPERS, et al. Two frequent missense mutations in Pendred syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 7 (1998) 1099–1104.
- WALLACE, DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem*, 61: 1175-1212, 1992.
- WANGEMANN P, KIM HM, BILLINGS S, NAKAYA K, LI X, SINGH R, SHARLIN DS, FORREST D, MARCUS DC, FONG P. Developmental delays consistent with cochlear hypothyroidism contribute to failure to develop hearing in mice lacking *SLC26A4*/pendrin expression. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 Nov;297(5):F1435-47. doi: 10.1152/ajprenal.00011.2009. Epub 2009 Aug 19.
- WANGEMANN P, NAKAYA K, WU T, MAGANTI RJ, ITZA EM, SANNEMAN JD, HARBIDGE DG, BILLINGS S, MARCUS DC. Loss of cochlear HCO₃⁻ secretion causes deafness via endolymphatic acidification and inhibition of Ca²⁺ reabsorption in a Pendred syndrome mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 May;292(5):F1345-53. Epub 2007 Feb 13.
- WANGEMANN P, SCHACHT J: Cochlear homeostasis; in Dallos P, Popper AN, Fay RR (eds): *The Cochlea Handbook of Auditory Research*. New York, Springer, 1996, vol 8, pp 130-185.
- 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 abolishes endocochlear potential and causes deafness in Pendred syndrome mouse model. *BMC Med.* 2004 Aug 20;2:30.
- WILCH, E; AZAIEZ, H; FISHER, RA; ELFEBEIN, J; MURGIA, A; BIRKENHÄGER, R; BOLZ, H; DA SILVA-COSTA, SM; DEL CASTILHO, 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*, 78(3): 267-274, 2010.
- WILCOX, ER; FEX, J. Construction of a cDNA library from microdissected guinea pig organ of Corti. *Hear Res.* 62(1): 124-6, 1992.

- WILCOX, S.A.; SAUNDERS, K.; OSBORN, A.H.; ARNOLD, A.; WUNDERLICH, J.; KELLY, T.; COLLINS, V.; WILCOX, L.J.; MCKINLAY GARDNER, R.J.; KAMARINOS, M.; CONE-WESSON, B.; WILLIAMSON, R.; DAHL, H.H. High Frequency Hearing Loss Correlated with mutations in the *GJB2* Gene. *Hum. Genet.* 106: 399-405, 2000.
- WILLECKE, K.; EIBERGER, J.; DEGEN, J.; ECKARDT, D.; ROMUALDI, A.; GULDENAGEL, M.; et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem*, 383: 725-737, 2002.
- WU CC, YEH TH, CHEN PJ, HSU CJ. Prevalent *SLC26A4* mutations in patients with enlarged vestibular aqueduct and/or Mondini dysplasia: a unique spectrum of mutations in Taiwan, including a frequent founder mutation. *Laryngoscope*. 2005 Jun;115(6):1060-4.
- WU, CC; LEE, YC; CHEN, PJ; HSU, CJ. Predominance of genetic diagnosis and imaging results as predictors in determining the speech perception performance outcome after cochlear implantation in children. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 162(3): 269-276, 2008.
- XIN GUAN, M. Molecular Pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness. *Ann N Y Acad Sci*, 1011: 259-71, 2004.
- YANG, J; LIU, X; ZHAO, Y; ADAMIAN, M; PAWLYK, B et al. Ablation of whirlin long isoform disrupts the USH2 protein complex and causes vision and hearing loss. *PLoS Genet*, 6(5): e1000955, 2010.
- ZDEBIK AA, WANGEMANN P, JENTSCH TJ: Potassium ion movement in the inner ear: insights from genetic disease and mouse models. *Physiology (Bethesda)* 2009;24:307-316.
- ZELANTE L; GASPARINI P; ESTIVILL X; MELCHIONDA S; D'AGRUMA L; GOVEA N; MILÁ M; DELLA MONICA M; 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 Mediterranean. *Hum. Mol. Genet.* 6(9):1605-9, 1997.
- ZHAI Y, SAIER MH JR. A web-based program (WHAT) for the simultaneous prediction of hydrophathy, amphipathicity, secondary structure and transmembrane topology for a single protein sequence. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2001 Oct;3(4):501-2.
- ZHENG QY, D. YAN, X.M. OUYANG, L.L. DU, H. YU, B. CHANG, *ET AL.*, Digenic inheritance of deafness caused by mutations in genes encoding cadherin 23 and protocadherin 15 in mice and humans, *Hum. Mol. Genet.* 14 (January (1)) (2005) 103–111.
- ZU-JIAN, C; BIN, Y; QI-CAI, L; LIN, J; JING, C; QI-SHUI, O. Quantification of mitochondrial DNA with the A1555G mutation in deaf patients using real-time amplification refractory mutation system-quantitative PCR. *JMD*, 12(1): 1-6, 2009.

ANEXOS



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijporl

Molecular analysis of *SLC26A4* gene in patients with nonsyndromic hearing loss and EVA: Identification of two novel mutations in Brazilian patients

Vanessa Cristine Sousa de Moraes^{a,*}, Nathalia Zocal Pereira dos Santos^a, Priscila Zonzini Ramos^a, Maria Carolina Costa Melo Svidnicki^a, Arthur Menino Castilho^b, Edi Lúcia Sartorato^a

^a Center of Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMG), Molecular Biology Laboratory, State University of Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil
^b Medical Sciences Faculty, State University of Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 September 2012

Received in revised form 26 November 2012

Accepted 29 November 2012

Available online 27 December 2012

Keywords:

Pendred syndrome

SLC26A4

EVA

Deafness

ABSTRACT

The *SLC26A4* gene has been described as the second gene involved in most cases of sensorineural non-syndromic hearing loss, since the first is the *GJB2* gene. Recessive mutations in the *SLC26A4* gene encoding pendrin, an anion transporter, are responsible for non-syndromic hearing loss associated with an enlarged vestibular aqueduct (EVA) and Pendred syndrome, which causes early hearing loss and affects the thyroid gland. Typically, the hearing loss is profound and prelingual. However, in some individuals, hearing impairment may develop later in childhood and then progress. Over 200 different *SLC26A4* mutations have been reported, with each ethnic population having its own distinctive mutant allele series including a few prevalent founder mutations.

Objective: Perform the screening of the 20 coding exons of *SLC26A4* gene in Brazilian deaf individuals with EVA.

Patients and methods: Among the 23 unrelated non-syndromic hearing loss Brazilian patients with EVA, in whom no deafness-causing mutations of the *GJB2* gene, the direct sequencing was performed to screen the 20 exons and their flanking regions of the *SLC26A4* gene.

Results: The sequencing results revealed 9 cases (39%) carrying 13 different *SLC26A4* mutations, including 11 known mutations (279delT, V138F, T193I, IVS8+1G>A, T410M, Q413R, R409H, I445W, IVS15+5G>A, V609G, and R726C) and 2 novel mutation (G149R and P142L).

Conclusion: The *SLC26A4* mutations have a high carrying rate in non-syndromic hearing loss Brazilian patients. The identification of a disease-causing mutation can be used to establish a genotypic diagnosis and provide important information to the patients and their families.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pendred syndrome (PS) is an autosomal recessive disorder clinically characterized by congenital sensorineural hearing loss, goiter and a defective iodide organification. Vaughan Pendred first described the association of goiter and deafness in 1896 [1]. Morgans and Trotter then first demonstrated in 1958 that patients with PS have a partial iodide organification defect [2]. The incidence of PS is estimated to be 7.5–10 in 100,000 individuals, which represents one of the most common forms of syndromic deafness [3].

In 1997, Everett et al. showed that mutations in the *SLC26A4* gene were the molecular cause of PS. The *SLC26A4* gene consists of 21 exons, of which 20 are coding exons and encodes a highly hydrophobic protein named pendrin [4]. Pendrin is known to be an anion transporter expressed in at least three human tissues: in the thyroid, kidneys and inner ear [5].

In addition to Pendred syndrome, mutations in the *SLC26A4* gene cause DFNB4, a type of non-syndromic autosomal recessive deafness associated with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA) even in the absence of goiter. EVA is the most common radiologically detectable inner ear malformation among hearing impairment subjects [6–8]. The most accepted criterion for definition of a large vestibular aqueduct is that suggested by Valvassori [9]: a vestibular aqueduct is considered enlarged if its diameter is >1.5 mm at the midpoint between the common crus and the external aperture of the vestibular aqueduct on computed tomography (CT) images.

Patients with non-syndromic hearing loss caused by *SLC26A4* mutations and PS have in common the bilateral hearing loss,

* Corresponding author at: Laboratório de Genética Molecular Humana, UNICAMP/CBMG, Cidade Universitária Zeferino Vaz s/n, Barão Geraldo, Campinas, SP 13083-970, Brazil. Tel.: +55 19 3521 1001; fax: +55 19 3521 1009.

E-mail addresses: moraes.van@gmail.com (V.C.S. de Moraes), nath.zpp@hotmail.com (N.Z.P. dos Santos), prizoc@hotm.com (P.Z. Ramos), mcostinawid@gmail.com (Svidnicki), arthurcastilho@gmail.com (A.M. Castilho), sartorato@unicamp.br (E.L. Sartorato).

typically prelingual or early postlingual, frequently severe or profound with variable evolution, and associated with inner ear anomalies, such as EVA [10,11]. More than 200 different mutations have been found in patients with PS and nonsyndromic deafness [12].

This work aimed to evaluate the occurrence of mutations in the *SLC26A4* gene among the 23 unrelated nonsyndromic hearing loss Brazilian patients with EVA, in whom no deafness-causing mutations of the *GJB2* gene was found previously. The identification of a disease-causing mutation can be used to establish a genotypic diagnosis and provide important information to the patients and their families.

2. Patients and methods

2.1. Patients

A total of 23 Brazilian individuals (11 female and 12 male; age range, 04–55 years) diagnosed with severe-to-profound nonsyndromic hearing loss (NSHL) and EVA was included in the study. In addition we also performed the screening of the 20 coding exons of *SLC26A4* gene in a control group (30 Brazilian deaf individuals with no EVA). After obtaining written informed consent, DNA samples of all individuals were obtained from Clinic of Otorhinolaryngology, from State University of Campinas. All patients had previously been shown to be negative for the most common cause of genetic hearing loss – mutations in the coding region of *GJB2*, the two deletions affecting *GJB6* gene [del(QB6-D13S1830), del(GJB6-D13S1854)] and A1555G mitochondrial mutation in the 12S rRNA gene.

2.2. Audiological findings

After audiological evaluation, all individuals were referred to imaging studies from the inner ear, which were obtained with the use of computer tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) of the temporal bones. EVA was defined when enlargement of the vestibular aqueduct was >1.5 mm at midway between the endolymphatic sac and the vestibule.

2.3. Molecular genetic analysis

Genomic DNA was extracted from blood samples using a standard phenol–chloroform method. The 20 coding exons (numbered from 2 through 21) of the *SLC26A4* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using previously reported primers [4]. The PCR products were sequenced using a 3500 Genetic Analyzer. The resulting sequences were edited and compared against the published NCBI *Homo sapiens SLC26A4* DNA

Table 1

Summary of clinical features and mutational analysis of all individuals.

Patient	Sex	Age (years)	EVA	SLC26A4 genotype	
				Allele 1	Allele 2
01	F	19	B	N	N
02	M	42	B	T410M	IVS15+5G>A
05	M	13	B	N	N
06	F	17	B	V138P	Q413R
09	M	55	B	N	N
10	F	51	B	N	N
11	M	15	B	N	N
12	M	07	B	N	N
13	M	06	B	N	N
15	F	13	B	R776C	N
16	F	04	U	G149R*	N
17	M	06	B	N	N
18	F	23	B	T193I	N
19	M	04	B	N	N
20	M	47	B	N	N
21	F	04	B	P142L*	T79delT
22	M	19	B	R409H	R409H
23	F	04	B	L445W	IVS8+1G>A
L1	M	05	B	V609G	N
L2	M	18	B	N	N
L8	F	11	B	N	N
L9	F	19	B	N	N
L13	F	10	B	N	N

F – female; M – male; EVA – enlarged vestibular aqueduct; B – bilateral; U – unilateral; N – normal.

* Mutations first found in this study.

sequence reference assembly (accession NC_000007 region: 107301080.107358254).

3. Results

3.1. Genetic testing

Sequence analysis of *SLC26A4* gene was performed in 23 patients with profound nonsyndromic hearing loss and EVA. Mutation in both alleles was found in 5 patients (4 compound heterozygotes and 1 mutant homozygote). Monoallelic mutation was found in 4 individuals and in 14 patients no mutation was found. The clinical features and mutational analysis of *SLC26A4* gene are shown in Table 1.

Thirteen mutations were identified in a total of 9 affected individuals. Two patients (16 and 21) carry a novel unclassified missense variant, G149R and P142L, respectively. Table 2 summarizes all mutations found in the *SLC26A4* gene in this study.

We also performed the screening of the 20 coding exons of *SLC26A4* gene in 30 Brazilian deaf individuals with no EVA (control group). No coding mutations were found in this group.

Table 2

Spectrum of *SLC26A4* mutations in Brazilian NSHL patients with EVA.

Mutations	Nucleotide change	Location	No. of affected	First described
T79delT	–	Exon 03	1	Kopp (1990) J Clin Endocrinol Metab 84:336
V138P	412G>T	Exon 04	1	van Haeswe (1998) Hum Mol Genet 7:1090
P142L	425C>T	Exon 05	1	Novel mutation
G149R	446G>A	Exon 05	1	Novel mutation
T193I	578C>T	Exon 05	1	Adato (2000) Eur J Hum Genet 8:437
IVS8+1G>A	c.1001+1G>A	Intron 08	1	Coyle (1998) Hum Mol Genet 7:1105
R409H	1228G>A	Exon 10	1	van Haeswe (1998) Hum Mol Genet 7:1090
T410M	1229C>T	Exon 10	1	Coyle (1998) Hum Mol Genet 7:1105
Q413R	1238A>G	Exon 10	1	J (2009) Zhonghua Yi Xue Za Zhi 89:2531
L445W	1334T>G	Exon 11	1	van Haeswe (1998) Hum Mol Genet 7:1090
IVS15+5G>A	c.1707+5G>A	Intron 15	1	Park (2005) Clin Genet 67:160
V609G	1826T>G	Exon 17	1	Pryor (2005) J Med Genet 42:159
R776C	2126C>T	Exon 21	1	Pryor (2005) J Med Genet 42:159

deafness have consisted of screening for the relevant mutations in a certain population. Comprehensive testing for the entire gene is not done routinely due to high costs.

References

- [1] V. Pendred, Deaf-mutation and goiter, *Lancet* 2 (1986) 532.
- [2] M.E. Morgan, W.R. Tretter, Association of congenital deafness with goiter: the nature of thyroid defect, *Lancet* 1 (1958) 607–609.
- [3] G.R. Fraser, Association of congenital deafness with goiter (Pendred's syndrome): a study of 207 families, *Am. Hum. Genet.* 28 (1965) 201–240.
- [4] L.A. Everett, B. Glaser, J.C. Beck, J.R. Iddi, A. Buch, M. Heyman, et al., Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS), *Nat. Genet.* 17 (1997) 411–422.
- [5] D.A. Scott, R. Wang, T.M. Kruman, V.C. Sheffield, L.P. Kamitski, The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein, *Nat. Genet.* 21 (1999) 440–443.
- [6] P.J. Antonelli, A.E. Vianola, A.A. Mancuso, Diagnostic yield of high-resolution computed tomography for pediatric sensorineural hearing loss, *Laryngoscope* 109 (10) (1999) 1642–1647.
- [7] D.E. Bemis, P. Phelps, T. Sirtanena, Temporal bone computed tomography findings in bilateral sensorineural hearing loss, *Arch. Dis. Child.* 82 (3) (2000) 257–260.
- [8] D.D. Mufson, E.J. Shin, A.K. Lalwani, Use of laboratory evaluation and radiologic imaging in the diagnostic evaluation of children with sensorineural hearing loss, *Laryngoscope* 112 (1) (2002) 1–7.
- [9] G.E. Velvonsat, J.D. Gemis, The large vestibular aqueduct syndrome, *Laryngoscope* 88 (5) (1978) 723–728.
- [10] P.D. Phelps, R.A. Coffey, R.C. Trembath, L.M. Luxon, A.B. Grossman, K.E. Britton, et al., Radiological malformations of the ear in Pendred syndrome, *Clin. Radiol.* 53 (1998) 268–273.
- [11] D.A. Scott, R. Wang, T.M. Kruman, M. Andrews, J.M. McDonald, J.R. Bishop, et al., Functional differences of the PDS gene product are associated with phenotypic variation in patients with Pendred syndrome and non-syndromic hearing loss (20780-4), *Hum. Mol. Genet.* 9 (11) (2000) 1709–1715.
- [12] C.C. Lai, C.Y. Chiu, A.S. Shiao, Y.C. Tuo, Y.C. Wu, T.Y. Tu, et al., Analysis of the SLC26A4 gene in patients with Pendred syndrome in Taiwan, *Metabolism* 56 (September 03) (2007) 1229–1234.
- [13] H.J. Park, S. Shankar, K.Z. Liu, S.H. Hahn, S. Nae, M. Ghosh, et al., Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asian: global implications for the epidemiology of deafness, *J. Med. Genet.* 40 (April (4)) (2003) 242–248.
- [14] B. Goyle, W. Reardon, J.A. Hebrink, L.C. Tsai, E. Gaudon, J. Lee, et al., Molecular analysis of the PDS gene in Pendred syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 7 (July (7)) (1998) 1105–1112.
- [15] S. Albert, H. Blom, L. Jansen, D. Feldmann, P. Charvin, N. Lalande, et al., SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations, *Eur. J. Hum. Genet.* 14 (June (6)) (2006) 773–779.
- [16] A.A. Dier, Z. Brownstein, K.B. Avraham, Integration of human and mouse genetics reveals pendrin function in hearing and deafness, *Cell. Physiol. Biochem.* 28 (3) (2011) 535–544. [Epub 2011 November 18, Review].
- [17] A.J. Griffith, P. Wettersmann, Hearing loss associated with enlargement of the vestibular aqueduct: mechanistic insights from clinical phenotypes, genotypes, and mouse models, *Hear. Res.* 281 (November (1–2)) (2011) 11–17. [Epub 2011 June 6, Review].
- [18] S. Awakaji, S. Usami, S. Abe, H. Inada, T. Watanabe, T. Hoshino, long-term and inigical feature in Pendred syndrome caused by PDS mutation, *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 127 (8) (2001) 705–708.
- [19] M.P. Gilliam, L. Bietoloni, P. Kopp, S. Benveniste, Molecular analysis of the PDS gene in a nonconsanguineous Sicilian family with Pendred's syndrome, *Thyroid* 15 (July (7)) (2005) 734–741.
- [20] P. Van Haesebroeck, L.A. Everett, P. Coucke, D.A. Scott, M.L. Knoff, C. Ris-Stalpers, et al., Two frequent missense mutations in Pendred syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 7 (1998) 1099–1104.
- [21] A. Pena, S. Domingos, S. Rudolph, M. Garcia, G. Botik, G. Meyer, et al., Functional assessment of allelic variants in the SLC26A4 gene involved in Pendred syndrome and nonsyndromic EVA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105 (November (47)) (2008) 18608–18613. [Epub 2008 November 18].
- [22] P. Kopp, O.K. Aravenet, L. Sabacan, T. Kotlar, J. Dupuis, H. Cavalieri, et al., Phenocopies for deafness and goiter development in a large inbred Brazilian kindred with Pendred's syndrome associated with a novel mutation in the PDS gene, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (January (1)) (1999) 336–341.
- [23] E. Carra, M.S. Akerman, E. Bellacchio, R. Santaroli, M. Carrella, L. Zelante, et al., Identification of a novel mutation in the SLC26A4 gene in an Italian with fluctuating sensorineural hearing loss, *Int. J. Pediatric Otorhinolaryngol.* 73 (October (10)) (2009) 1488–1493. [Epub 2009 July 16].
- [24] K. Maciejczyk, A. Lewicki, Phenotypes of SLC26A4 gene mutations: Pendred syndrome and hyposmia with enlarged vestibular aqueduct, *Neuro Endocrinol. Lett.* 29 (February (1)) (2008) 29–36.



UNICAMP

CEP, 23/07/13.
(PARECER CEP: Nº 396/2006)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO MOLECULAR DA PERDA AUDITIVA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Edi Lúcia Sartoro

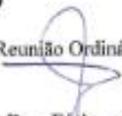
II – PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo intitulado “ANÁLISE MOLECULAR DE GENES RELACIONADOS A SÍNDROME DE PENDRED EM INDIVÍDUOS COM SURDEZ E ESTUDO FUNCIONAL DA PROTEÍNA PENDRINA”, com finalidade de tese de doutorado da aluna Vanessa Cristine Sousa de Moraes, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de julho de 2013.


Prof. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz
COORDENADORA do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tomálio Vieira do Carmo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

PHONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Projeto: ANÁLISE MOLECULAR DE GENES RELACIONADOS À SÍNDROME DE PENDRED EM INDIVÍDUOS COM SURDEZ E ESTUDO FUNCIONAL DA PROTEÍNA PENDRINA.

Responsável: Vanessa Cristine Sousa de Moraes

Orientação: Dra. Edi Lúcia Sartorato

Co-orientação: Dr. Arthur Menino Castilho

Nome do Paciente: _____

Registro Hospitalar: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Responsável: _____

RG: _____ Grau de parentesco: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Justificativa e objetivos do estudo:

O gene *SLC26A4* tem sido apontado como o segundo gene mais envolvido nos casos de surdez. Dessa maneira, será realizada a busca de alterações neste gene em indivíduos com perda auditiva, associada ou não a alterações no ouvido interno (aqueduto vestibular alargado), provenientes do Ambulatório de Otorrinolaringologia do HC–UNICAMP. O objetivo do trabalho é esclarecer a prevalência de mutações no gene *SLC26A4* em indivíduos que apresentem algum tipo de perda auditiva e correlacionar a alteração encontrada ao sinal clínico do paciente. Nos casos em que forem encontradas alterações genéticas, será emitido um laudo que será inserido no prontuário do paciente, o qual será reconvocado para que seja realizado o aconselhamento genético no ambulatório de Otorrino do HC da Unicamp pelo Dr. Arthur Menino Castilho e pela bióloga Vanessa de Moraes.

Procedimentos a que serão submetidos os pacientes:

Os exames complementares serão realizados, após indicação do otorrinolaringologista responsável, consistindo das investigações descritas a seguir:

- Avaliação comportamental da audição: Audiometria;
- Emissões Otoacústicas Evocadas: Transientes e Produto de Distorção;
- Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (PEATE);
- Tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética;
- Análise molecular genética.

Risco e desconforto:

As amostras de sangue periférico serão obtidas por punção venosa, ou punção na polpa digital, que é um procedimento médico comum, com riscos muito baixos. O risco da coleta de sangue pode incluir hiperemia local transitória, hematoma, celulite ou flebite. O desconforto será mínimo, pois a coleta será realizada pela veia intermédia do cotovelo, por profissional treinado ou pelo responsável pelo projeto, devidamente habilitados para este procedimento.

Medidas de proteção: assepsia e antisepsia do local para a coleta de amostra de sangue e utilização de materiais descartáveis.

A avaliação de potenciais evocados auditivos de tronco encefálico, tomografia computadorizada e ressonância magnética não apresentam risco ao paciente, exceto às

crianças que necessitem de sedação para realização do exame. Contudo, a sedação é de baixo risco e realizada em meio hospitalar, na presença de médico radiologista e otorrinolaringologista e de equipamento de segurança necessários.

Benefícios esperados:

Os pacientes estudados não receberão benefício direto. Porém, nos casos em que forem detectadas alterações auditivas de qualquer natureza, será instituída a reabilitação auditiva, através da colocação de prótese auditiva e do atendimento de equipe multidisciplinar na própria instituição. Diante da necessidade de implante coclear ou de procedimentos não contemplados no serviço, os indivíduos serão encaminhados para serviços de referência. Nos casos em que forem encontradas alterações genéticas, será emitido um laudo que será inserido no prontuário do paciente, o qual será reconvocado para que seja realizado o aconselhamento genético no ambulatório de Otorrino do HC da Unicamp pelo Dr. Arthur Menino Castilho e pela bióloga Vanessa de Moraes.

Garantia de resposta às perguntas:

Será garantido aos pacientes e responsáveis, respostas a quaisquer perguntas que possam aparecer em qualquer momento da pesquisa, e esclarecimento de qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados com esta pesquisa.

Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si:

O paciente ou responsável deve estar ciente que a participação neste projeto de pesquisa é voluntária e que pode recusar ou retirar seu consentimento, a qualquer momento (incluindo a amostra de sangue), sem comprometer os cuidados médicos que o paciente recebe atualmente ou receberá no futuro.

Garantia de privacidade:

Será mantido o sigilo e o caráter confidencial das informações, e a identificação dos pacientes não será exposta nas conclusões ou publicações.

Armazenamento de Materiais Biológicos:

O material biológico será descartado após o término do estudo.

Compromisso com informações atualizadas do estudo:

Durante todo o decorrer da pesquisa será mantido o compromisso de se proporcionar informações atualizadas referentes aos resultados dos procedimentos realizados.

Despesas da pesquisa:

Todas as despesas da pesquisa serão financiadas com recursos de projetos FAPESP e/ou CNPq.

Contato:

Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a pesquisa, o paciente ou responsável pode entrar em contato com os pesquisadores responsáveis pelo fone (19) 3521-1091, ou no Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), situado na Avenida Cândido Rondon, 400, Caixa Postal 6010, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas/SP.

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa:

Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, o paciente ou responsável pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas, da UNICAMP, situado na Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Caixa Postal 6111, CEP 13083-887, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas/SP, fone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187, e-mail cep@unicamp.br.

Declaro que recebi uma via do presente Termo de Consentimento assinada pelo responsável legal e pela pesquisadora Dra. Edi Sartorato.

Data: ___/___/_____

Nome do Paciente ou Responsável Legal

Assinatura do Paciente ou Responsável Legal