

NEUROTOLOGIA

SURDEZ E GENES COCLEARES PERSPECTIVA ACTUAL

DEAFNESS AND COCHLEAR GENES - STATE OF THE ART

Carla Pinto de Moura . Serviço de Otorrinolaringologia, Serviço de Genética Médica, Hospital S. João, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Nuno Trigueiros Cunha . Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Pedro Hispano,
Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Correspondência: Carla Pinto de Moura; R. Pero Escobar, 301; 4450-771 Leça da Palmeira; Telef: 917572261;
E-mail: cmoura@med.up.pt

RESUMO

A surdez de causa hereditária é um exemplo de heterogeneidade genética, em que mutações de genes diferentes cursam com o mesmo fenótipo e, em oposição, mutações no mesmo gene apresentam uma clínica completamente distinta. Muito embora existam avanços significativos para a compreensão da base molecular da perda auditiva, a identificação da causa genética para a surdez de um indivíduo ainda se mantém incompleta. Após exclusão de síndromes que curse com hipoacusia, na população mediterrânica, deverá ser efectuada a análise do gene GJB2 (conexina 26) em todos os casos de surdez não síndrómica, sem outra causa etiológica. De igual modo, sempre que numa família existir hipoacusia em múltiplas gerações, particularmente se for relacionável com exposição a aminoglicosídeos, é fundamental considerar a possibilidade de hereditariedade mitocondrial, com análise dos respectivos genes. Consideram-se alguns exemplos de genes com expressão coclear, relacionando-se as funções das proteínas que codificam com as manifestações clínicas do doente.

PALAVRAS-CHAVE: Surdez, Cóclea, Genes.

ABSTRACT

Hereditary hearing loss is extremely heterogeneous genetically, with identical phenotypes originated by different genes and with different mutations of the same gene leading to distinct phenotypes. Despite of significant advances in the understanding of the molecular bases of deafness, it is still difficult to diagnose the specific mutated gene of an individual. The etiological investigation should first exclude syndromic cases of deafness followed by the molecular screening of GJB2 (connexin26) gene on Mediterranean populations. Furthermore, in families with deafness in multiple generations, particularly if there is an history of aminoglycoside exposure, mitochondrial inheritance of hearing loss should be investigated. There were considered some examples of genes with cochlear expression, relating their protein function with the clinical symptoms of the patients.

KEY-WORDS: Deafness, Cochlea, Genes.

INTRODUÇÃO

A surdez é o défice sensitivo mais frequente ao nascimento, afectando 1/650 recém-nascidos¹. As causas de perda auditiva são numerosas, estando demonstrado que cerca de 50% das mesmas são atribuíveis a causas genéticas². A literatura refere que 70% dos casos não estão associados a síndromes, sendo esta perda consequentemente denominada surdez não-sindrómica (S-NS)^{3,4}. Nestas circunstâncias, a hipoacusia é o único sintoma, não sendo diagnosticáveis outras alterações fenotípicas.

Em cerca de 60% dos casos, a forma pré-lingual da S-NS é monogénica, isto é, causada pela mutação num único gene. Este grupo de surdez pode ser classificado de acordo com a sua hereditariedade: cerca de 20% dos casos tem hereditariedade autossómica dominante, em que o fenótipo se expressa em heterozigotia - é referida como DFNA; 80% apresentam hereditariedade autossómica recessiva, quando só se expressa em homozigotia - este grupo denomina-se DFNB; 1% estão ligadas ao cromossoma X - trata-se da DFNM; e, numa percentagem inferior a 1%, estão associadas a mutações mitocondriais⁵. Nestas últimas, a transmissão faz-se por via materna, dado que apenas o genoma mitocondrial da mãe é transmitido à descendência. Presentemente, estão descritos cerca de 57 *loci* para a S-NS autossómica dominante (DFNA), 77 *loci* para formas de S-NS autossómica recessiva (DFNB) e 8 *loci* para surdez ligada ao cromossoma X (DFNM)⁶.

Em contrapartida, a S-NS pós-lingual é uma patologia extremamente prevalente, afectando aproximadamente 10% dos indivíduos com 60 anos e 50% das pessoas com 80 anos⁷. Como a forma mais frequente deste tipo de hipoacusia neurossensorial é progressiva, com perda predominante das frequências agudas, os genes responsáveis por situações de surdez com fenótipo semelhante, ainda que com manifestação em idade muito mais precoce, tornam-se excelentes candidatos de estudo para descodificar a susceptibilidade para este tipo de patologia⁸. Embora a hereditariedade autossómica dominante seja a mais frequente para estes genes, a grande maioria dos casos de S-NS pós-lingual é considerada como uma doença complexa, com hereditariedade multifactorial, valorizando-se a interacção desfavorável entre factores genéticos e ambientais.

Os testes de análise de DNA (ácido desoxirribonucleico) são um elemento decisivo no diagnóstico de diversas doenças. A título de exemplo, a análise do gene da fibrose cística num recém-nascido que apresente o teste de rastreio de tripsinogénio imunorreactivo elevado é um procedimento corrente que permite aumentar a especificidade do diagnóstico e efectuar o aconselhamento genético da família⁹. Idealmente, este modelo deveria ser aplicável à generalidade das doenças, nomeadamente ao estudo das hipoacusias. Neste último caso, a premência tem vindo a aumentar, na sequência da adopção crescente de programas de rastreio universal da audição em recém-nascidos. Uma vez efectuado o diagnóstico da perda auditiva, seria desejável a avaliação completa das anomalias

genéticas que lhe possam estar subjacentes¹⁰. No entanto, os genes ligados à audição apresentam especificidades, exceptuando alguns genes da conexina, que tornam difícil a sua identificação, bem como o seu papel patofisiológico. Como condições subjacentes, destaca-se que a cóclea humana é composta por cerca de 20.000 células ciliadas neurossensoriais, com uma duração inferior à da vida humana, sendo que as mesmas não se regeneram quando perdidas. Face ao exposto, torna-se claro que tem sido difícil obter informação sobre a função destas células usando estudos bioquímicos, devido particularmente ao parco número de células existentes, bem como à dificuldade de acesso ao osso temporal. Por estas razões, a identificação dos factores genéticos que contribuem para os casos de surdez monogénica é temporalmente recente.

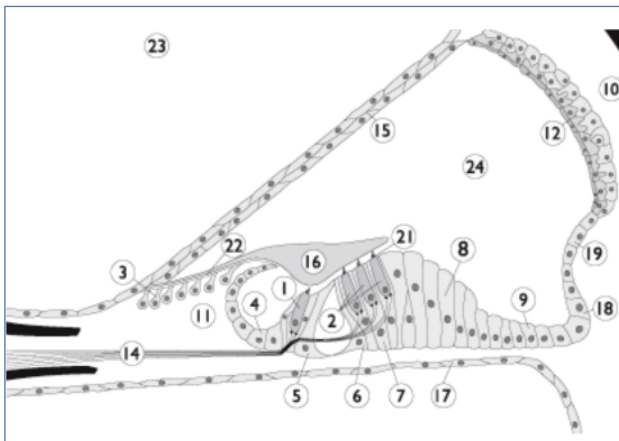
Leon e colaboradores localizaram o primeiro *locus* de surdez hereditária em 1992¹¹. Após esta primeira descrição, observou-se um progresso extraordinário na identificação dos genes responsáveis pela surdez. Estas descobertas inseriram-se nos programas de sequenciação dos genomas humano e do rato, assim como no desenvolvimento de métodos de anotação génica e de técnicas de colonagem posicional, utilizadas para a localização dos genes. De igual modo, a conjugação existente entre a investigação genética e a informação morfológica e fisiológica do ouvido, tem contribuído para o conhecimento da fisiologia e dos mecanismos patofisiológicos complexos do processo auditivo. Corolário desta associação, a investigação desta patologia centra-se nas causas monogénicas de surdez. Contudo, ainda não estão definidas as funções de diversos genes já identificados, sendo que muitos dos genes responsáveis pela surdez não-sindrómica (S-NS) não foram ainda identificados, pelo que se mantém uma investigação intensa sobre este tema. A este propósito, a página electrónica *Hereditary Hearing Loss Homepage* (<http://webhost.ua.ac.be/hhh/>)⁶ é uma fonte de informação, com actualização regular, sobre as causas já conhecidas de hipoacusia monogénica em Humanos, acompanhando, em tempo real, a evolução do conhecimento científico.

Nas últimas décadas, diversos estudos demonstraram que a classificação da surdez em sindrómica e NS é mais académica do que clínica, uma vez que alguns genes podem estar correlacionados com ambos os tipos de surdez. Provavelmente, as proteínas daí resultantes desempenham diversas funções: funções específicas e insubstituíveis no ouvido interno, bem como funções menos críticas noutros tecidos que podem ser comprometidas por certas mutações ou em condições determinadas. Um destes modelos é o gene *WFS1*. Este gene, pode causar S-NS autossómica dominante ou estar associado à síndrome de Wolfram, caracterizada por diabetes *mellitus* e atrofia óptica^{12,13}.

Neste trabalho, efectua-se a descrição de alguns exemplos de genes que causam S-NS e que estão envolvidos na homeostasia da cóclea ou são necessários para a morfogénese do feixe de células ciliadas, de componentes da matriz extracelular e de factores de transcrição. Referem-se ainda alguns genes que codificam proteínas cujas funções ainda não estão determinadas.

GENES ENVOLVIDOS NA HOMEOSTASIA DA CÓCLEA

O potássio (K^+) desempenha um papel primordial na homeostasia coclear. Após o influxo de potássio, as células ciliadas internas e externas removem o excesso de iões, utilizando a designada via de reciclagem do K^+ . Esta via utiliza *gap-junctions* e canais de $K^{+14,15}$. Inicialmente, os iões de potássio são removidos da região basolateral das células ciliadas para o espaço extra-celular do órgão de Corti, através dos canais de K^+ . Estes iões são posteriormente transportados através das células de suporte, utilizando *gap-junctions*, movendo-se em direcção ao ligamento espiral. Subsequentemente, os iões penetram no espaço extra-celular do ligamento espiral, passando para os fibrócitos que os transportam novamente em direcção à estria vascular, regressando ao saco endolinfático¹⁶ (Figura 1).



Esquema da localização dos diferentes componentes cocleares; indicação da via de reciclagem do potássio.

Fonte: Imagem adaptada com autorização dos autores⁵

1 Célula ciliada interna; 2 Célula ciliada externa; 3 Célula interdentadas; 4 Célula do sulco interno; 5 Célula pilar interna; 6 Célula pilar externa; 7 Célula de Deiters; 8 Célula de Hensen; 9 Célula de Claudius; 10 Ligamento espiral; 11 Limbo da lâmina espiral; 12 Estria vascular; 14 Nervo auditivo; 15 Membrana de Reissner; 16 Membrana tectória; 17 Membrana basilar; 18 Células do sulco externo; 19 Proeminência espiral; 21 Lâmina reticular; 23 Escala vestibular; 24 Escala média; [K^+] – concentração de potássio.

CONEXINAS

As conexinas são uma família de proteínas trans-membranares que formam *gap-junctions* entre células adjacentes, permitindo uma comunicação inter-celular de pequenas moléculas, como as de K^+ . A expressão abundante destas proteínas na cóclea, demonstra o papel fundamental que desempenham no desenvolvimento do ouvido interno e no processo da audição¹⁷. Actualmente, estão descritas mais de 100 mutações diferentes em genes codificantes de conexinas associadas à hipoacusia. A mutação mais frequente afecta a conexina 26, codificada por um gene *gap-junction* denominado *GJB2*, situado no locus DFNB1^{16,18,19}. Esta mutação é responsável por cerca de 50% dos casos de hipoacusia NS neurosensorial grave-a-profunda, nas populações Europeia, Mediterrânica e da América do Norte¹⁷. Qualquer mutação no gene da conexina 26 pode originar surdez, patologia cutânea, polineuropatia e cataratas¹⁰.

As *gap-junctions*, são compostas por 2 semi-canais, os conexões, que se alinham para formar um canal. No espaço extra-celular, estão firmemente unidos, topo a topo, com os da célula adjacente, formando um canal membranoso hidrófilo inter-celular, pelo que são extraordinariamente importantes para o equilíbrio metabólico e eléctrico entre células vizinhas. Cada conexão é composto por 6 sub-unidades de conexina; estas proteínas expressam-se em diversos órgãos, incluindo a pele e a cóclea. Desta forma, as *gap-junctions* permitem o transporte de metabolitos e iões entre células que participam no sistema de sinalização dos neurónios. Este facto é especialmente importante no sistema nervoso em desenvolvimento.

Na cóclea, o gene *GJB2* tem expressão a nível das células de suporte, no ligamento espiral, no limbo espiral e na estria vascular, estruturas estas que contribuem para a reciclagem dos iões de K^{+20} (Figura 2). A mutação mais frequente do gene *GJB2* é a c.35delG^{18,21-24}. A deleção deste único par de bases causa uma alteração da matriz de leitura do gene, originando uma modificação completa da sua expressão. Curiosamente, em populações não-Europeias, a mutação c.35delG é rara, encontrando-se mutações específicas para cada população^{25,26}. Nesta sequência, Van Laer e colaboradores demonstraram que a mutação c.35delG provinha de um fundador comum que estimou ter existido há cerca de 10.000 anos²². Dado que o rato *Knockout* – com inactivação do gene – para o gene *GJB2* morre ainda em fase embrionária, foi necessário criar um rato específico para o sistema epitelial coclear, mantendo-se intacta a expressão do gene no tecido conjuntivo da cóclea e dos outros órgãos^{27,28}. Este rato apresenta surdez, sem outros sinais de disfunção vestibular ou alterações cutâneas.

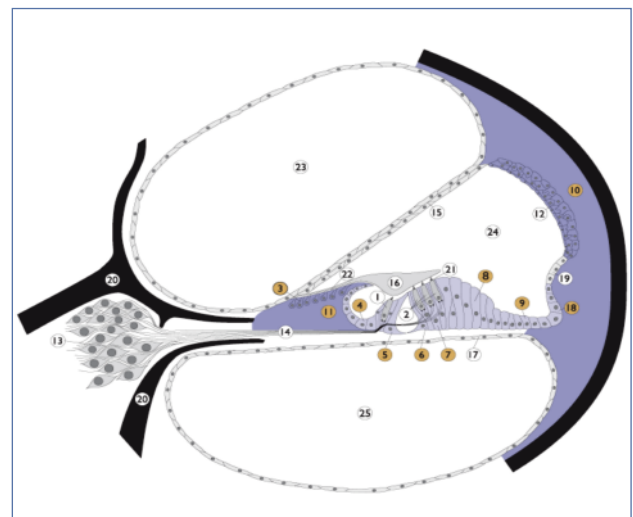


Ilustração da expressão coclear do gene *GJB2*. Este gene expressa-se a nível das células de suporte, no ligamento espiral, no limbo espiral e na estria vascular.

Fonte: Imagem adaptada com autorização dos autores⁶

1 Célula ciliada interna; 2 Célula ciliada externa; 3 Célula interdentadas; 4 Célula do sulco interno; 5 Célula pilar interna; 6 Célula pilar externa; 7 Célula de Deiters; 8 Célula de Hensen; 9 Célula de Claudius; 10 Ligamento espiral; 11 Limbo da lâmina espiral; 12 Estria vascular; 13 Gânglio Espiral; 14 Nervo auditivo; 15 Membrana de Reissner; 16 Membrana tectória; 17 Membrana basilar; 18 Células do sulco externo; 19 Proeminência espiral; 20 Lâmina espiral óssea; 21 Lâmina reticular; 23 Escala vestibular; 24 Escala média; 25 Escala timpânica.

FIG 2

Mais recentemente, foram descritas duas outras mutações perto do gene *GJB2*, em 13q12^{29,30}. Estas mutações, detectadas em indivíduos espanhóis com S N-S autossómica recessiva, denominaram-se del (*GJB6-D13S1830*) e del (*GJB6-D13S1854*). Embora a região que codifica o gene *GJB2* permaneça intacta, aquelas mutações cursam com a deleção de uma larga região perto de *GJB2*, e com o aparecimento de outra conexina truncada - *CX30/GJB6* – localizada a 50Kb de *GJB2*. É frequente o aparecimento destas deleções em heterozigotia composta com a mutação *GJB2*. Ahmad e colaboradores demonstraram a expressão da conexina 26 e da conexina 30 nas mesmas placas *gap-junction*³¹. Em Espanha, a mutação del (*GJB6-D13S1830*) estava presente em 50% dos surdos heterozigotos para a *GJB2*, enquanto que a mutação del (*GJB6-D13S1854*) foi identificada em apenas 25% destes casos. Estas mutações correlacionam-se clinicamente com uma perda auditiva mais marcada³².

Actualmente, as mutações do gene *GJB2* são a causa *major* para a S-NS autossómica recessiva de muitas populações etnicamente diferentes. Desta forma, o teste genético mais importante para o estudo deste tipo de surdez é o rastreio molecular das mutações no gene *GJB2*. Em cerca de 60% dos recém-nascidos com diagnóstico de S-NS autossómica recessiva grave-a-profunda ou profunda, detectam-se mutações no gene *GJB2*³³. Contudo, pode existir uma variabilidade clínica intra-familiar no grau de surdez, no facto de ser estável ou progressiva, ou de ser congénita ou manifestar-se apenas após os primeiros meses de vida². Em dois-terços dos indivíduos com hipoacusia relacionada com a conexina-26, a mutação encontrada é a c.35delG³³. Em situações mais raras, o gene *GJB2* causa surdez autossómica dominante, síndromica e não-síndromica (*DFNA3*). Os fenótipos descritos incluem hipoacusia ligeira-a-profunda, habitualmente progressiva, podendo estar associada a alterações cutâneas².

CANAL DE POTÁSSIO DEPENDENTE DA VOLTAGEM

Este gene codifica um canal de potássio dependente da voltagem, *KCNQ4*, sendo responsável pela forma mais frequente de S-NS autossómica dominante (*DFNA2*). As proteínas *KCNQ* são compostas por 6 domínios trans-membranares e, de acordo com os resultados de diversos trabalhos, os canais de potássio são formados por um tetrâmero de sub-unidades desta proteína³⁴. O gene *KCNQ4* expressa-se nas células ciliadas internas e externas da cóclea e a nível dos núcleos auditivos do tronco cerebral. Investigações recentes demonstram que o gene *KCNQ4* está envolvido na secreção basolateral de potássio das células ciliadas^{34,35} (Figura 3). Qualquer mutação deste gene com efeito dominante-negativo pode causar uma redução marcada na actividade do canal de potássio. Este resultado é compatível com o padrão de hereditariedade autossómico dominante com penetrância completa, da surdez progressiva associada às mutações do gene *KCNQ4*.

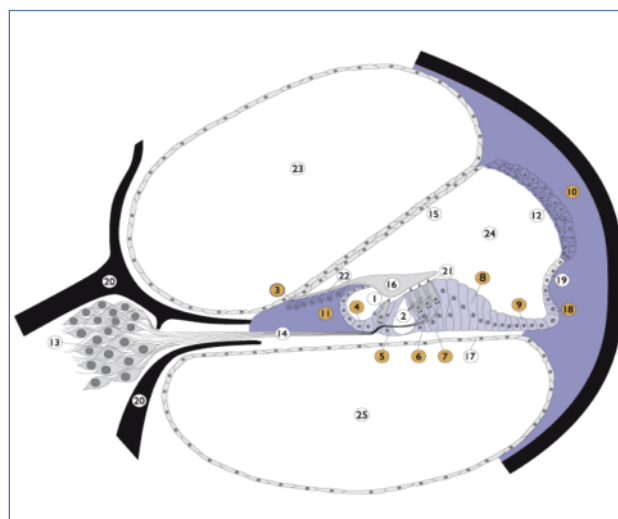


Diagrama da cóclea em que se destaca a expressão do gene *KCNQ4*; expressão a nível das células ciliadas internas e externas e no gânglio espiral.

Fonte: Imagem reproduzida com autorização dos autores⁶.

1 Célula ciliada interna; 2 Célula ciliada externa; 3 Célula interdentada; 4 Célula do sulco interno; 5 Célula pilar interna; 6 Célula pilar externa; 7 Célula de Deiters; 8 Célula de Hensen; 9 Célula de Claudius; 10 Ligamento espiral; 11 Limbo da lâmina espiral; 12 Estria vascular; 13 Gânglio Espiral; 14 Nervo auditivo; 15 Membrana de Reissner; 16 Membrana tectória; 17 Membrana basilar; 18 Células do sulco externo; 19 Proeminência espiral; 20 Lâmina espiral óssea; 21 Lâmina reticular; 23 Escala vestibular; 24 Escala média; 25 Escala timpânica.

FIG 3

PENDRINA (*SLC26A4*)

A síndrome de Pendred tem hereditariedade autossómica recessiva e caracteriza-se pela associação de surdez congénita com anomalias da tiróide. Estas últimas podem ser rastreadas com o teste de perclorato. As malformações cocleares, como a displasia de Mondini, são frequentes nesta síndrome. Sublinhe-se, contudo, que todos os doentes apresentam alargamento do aqueduto vestibular³⁶. O gene *SLC26A4*, responsável por esta síndrome, codifica a pendrina, um transportador de aniões, que se expressa nas células da cóclea e da tiróide³⁷. A pendrina tem um padrão de expressão discreto nos ducto e saco endolinfático, em áreas distintas do utrículo e do sáculo e na região externa do sulco³⁸ (Figura 4). Estas regiões são importantes para a reabsorção da endolinfa no ouvido interno. Algumas mutações neste gene podem dar origem a casos de surdez congénita NS, com alargamento do aqueduto vestibular, mas sem patologia da tiróide. No entanto, esta perda auditiva pode ser flutuante e progressiva, afectando predominantemente as frequências agudas². Porém, convém realçar a impossibilidade de efectuar uma correlação absoluta entre o genótipo e o fenótipo, dada a variabilidade fenotípica intra-familiar marcada e a não penetrância do fenótipo tiroideu. É de assinalar que, em muitos doentes com surdez congénita NS, apenas é encontrada uma única mutação do gene *SLC26A4*, o que sugere a existência frequente de mutações indetectáveis fora da região codificante ou, em alternativa, um efeito dominante da mutação³⁹.

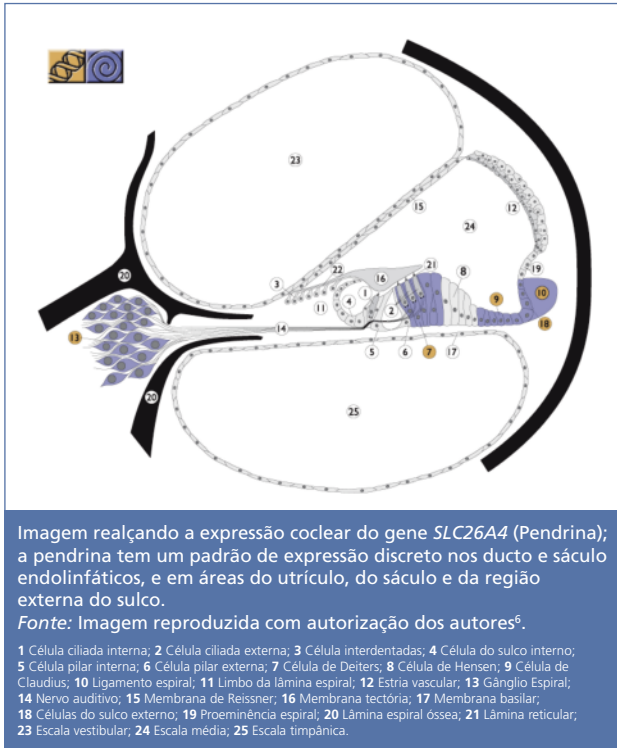


FIG 4

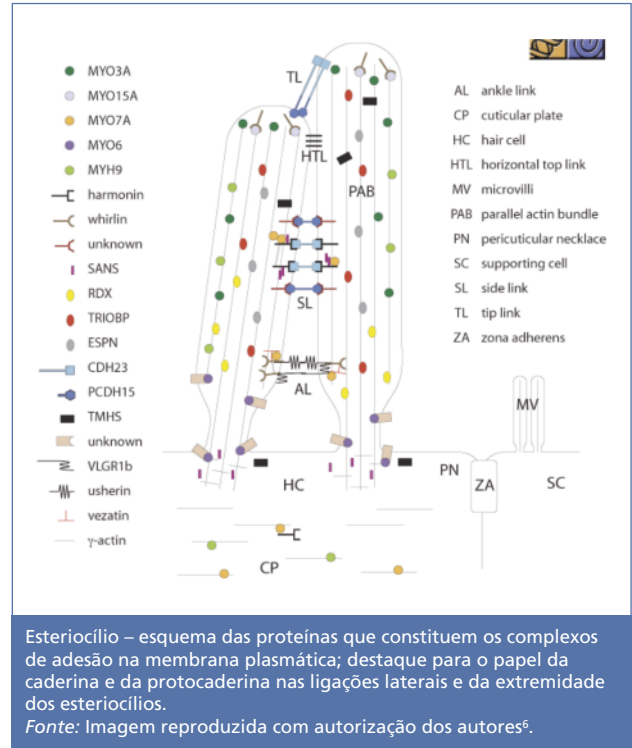


FIG 5

GENES ENVOLVIDOS NA ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS CÉLULAS CILIADAS

MOLÉCULAS DE ADEÇÃO

A caderina 23 e a protocaderina 15 pertencem a uma família de proteínas que, na sua maioria, desempenha um papel importante na adesão célula a célula, dependente do cálcio. A caderina 23 está localizada nas extremidades dos cílios das células ciliadas, sendo um componente essencial na ligação entre as extremidades dos esteríocílios^{40,41} (Figura 5). As mutações *missense* (que levam a uma troca do aminoácido codificado) do gene *CDH23* estão associadas à S-NS (DFNB12), com manifestação ocasional de sintomas vestibulares² (Figura 6). Em contrapartida, a síndrome de Usher tipo 1D (USH1D) é causada por mutações distintas no gene *CDH23*, caracterizando-se pela associação de surdez e retinite pigmentar^{42,43}. A nível ocular, a caderina 23 exerce funções fundamentais na organização das junções sinápticas, justificando as manifestações oculares da síndrome.

De forma semelhante ao *CDH23*, outros genes necessários para a morfogénese dos feixes de células ciliares foram igualmente associados a outras formas de S-NS. Um dos exemplos é a protocaderina 15 que desempenha um papel importante na morfogénese e na coesão dos feixes dos esteríocílios, promovendo a manutenção, a longo prazo, das ligações laterais entre eles⁴⁴ (Figura 5). As mutações no gene *PCDH15* são responsáveis por S-NS em famílias com DFNB23 e pela síndrome

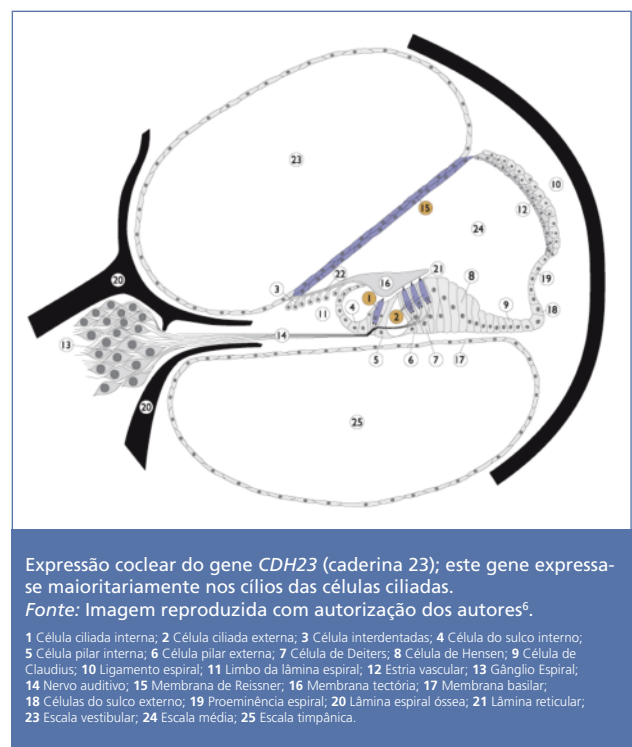


FIG 6

de Usher em famílias correlacionáveis com USH1F^{45,46}. Para estas duas mutações, também já se criaram modelos animais, com mutações em *cdh23* e em *pcdh15*, facto que tem permitido o estudo mais detalhado da patogenia das respectivas manifestações fenotípicas⁴⁷⁻⁴⁹.

GENES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DO CITOESQUELETO

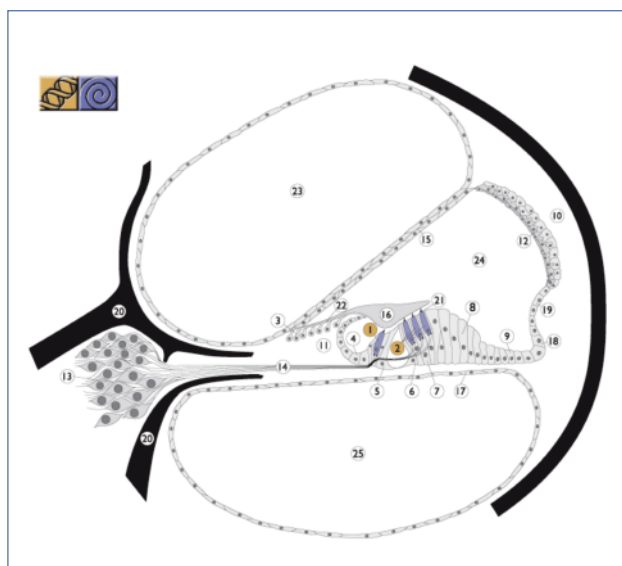
O citoesqueleto regula a forma da célula, o transporte, a mobilidade e a sua integridade. É constituído por microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos. A actina é a proteína dos microfilamentos mais abundante nas células. Contrariamente ao que ocorre na maioria das outras células, γ -actina, codificada pelo gene *ACTG1*, prevalece nas células ciliadas auditivas, podendo ser encontrada nos esteriocílios, na placa cuticular e nas *adherens junctions*⁵⁰ (Figura 7). As células auditivas são altamente dependentes da actina do respectivo citoesqueleto⁵¹. Este conceito é reforçado pela descrição de Zhu e colaboradores que associam as mutações do gene *ACTG1* com a S-NS progressiva e com hereditariedade autossómica dominante (DFNA20/26)⁵². A nucleação da actina é acelerada pela interacção da proteína *diaphanous* (*DIAPH1*) com os filamentos de actina⁵³. Mutações em *DIAPH1* originam hipoacusia nas frequências graves, em famílias ligadas ao locus DFNA154; indivíduos com esta mutação, podem apresentar hipoacusia rapidamente progressiva, evoluindo para surdez profunda em todas as frequências, cerca da quarta década de vida.

Outro elemento estrutural importante nos feixes das células ciliadas dos mamíferos é a proteína espina (*ESPN*) (Figura 5). No rato jerker (*je*) com a mutação em homozigotia não é possível detectar esta proteína nos feixes das células ciliadas, o que leva ao aparecimento de esteriocílios mais pequenos, com perda da resistência mecânica e à sua eventual desintegração⁵⁵. É de as-

sinhar que a quantidade de espina encontrada é proporcional ao tamanho dos esteriocílios⁵⁶. Estes dados, são compatíveis com o fenótipo da mutação em Humanos, onde as mutações recessivas de *ESPN* no locus DFNB36 causam surdez profunda pré-lingual e arreflexia vestibular periférica⁵⁷.

COMPONENTES DA MATRIZ EXTRA-CELULAR COLAGÉNEO XIA2 (*COL11A2*)

As fibras de colagénio são elementos estruturais que conferem uma resistência elevada à matriz extra-celular. O colagénio Xla2 (*COL11A2*) é um componente estrutural importante da membrana tectória (Figura 8). A sua mutação foi relacionada com casos de S-NS afectando as frequências médias, aparente, na maioria dos casos, por volta dos 30 anos; a hereditariedade é autossómica dominante e estão ligados ao locus DFNA13⁵⁸. Mutações no mesmo gene, *COL11A2*, também podem causar síndrome de Stickler (*STL2*), caracterizada pela associação de miopia progressiva, alterações articulares prematuras, hipoplasia do andar médio da face, irregularidade dos corpos vertebrais, fenda palatina e graus variáveis de perda auditiva. Esta síndrome também pode ser devida a mutações noutros dois tipos de colagénio: o colagénio IIa1 (*COL2A1*) e o colagénio XIa1 (*COL11A1*). Curiosamente, as pessoas com síndrome de Stickler devido à mutação *COL11A2* não apresentam alterações visuais. Este dado pode ser explicado pela ausência desta substância no vítreo, onde é substituída pelo colagénio V. Os exames em microscopia electrónica da membrana tectória de ratos homozigóticos para esta mutação (*col11a2*) demonstram uma perda da organização das fibras de colagénio, ao que corresponde uma perda auditiva moderada a grave⁵⁸.



Esquema evidenciando a expressão coclear do gene *ACTG1* que codifica a γ -actina localizada nos esteriocílios.

Fonte: Imagem reproduzida com autorização dos autores⁵.

1 Célula ciliada interna; 2 Célula ciliada externa; 3 Célula interdentadas; 4 Célula do sulco interno; 5 Célula pilar interna; 6 Célula pilar externa; 7 Célula de Deiters; 8 Célula de Hensen; 9 Célula de Claudius; 10 Ligamento espiral; 11 Limbo da lâmina espiral; 12 Estria vascular; 13 Gânglio Espiral; 14 Nervo auditivo; 15 Membrana de Reissner; 16 Membrana tectória; 17 Membrana basilar; 18 Células do sulco externo; 19 Proeminência espiral; 20 Lâmina espiral óssea; 21 Lâmina reticular; 23 Escala vestibular; 24 Escala média; 25 Escala timpânica.

FIG 7

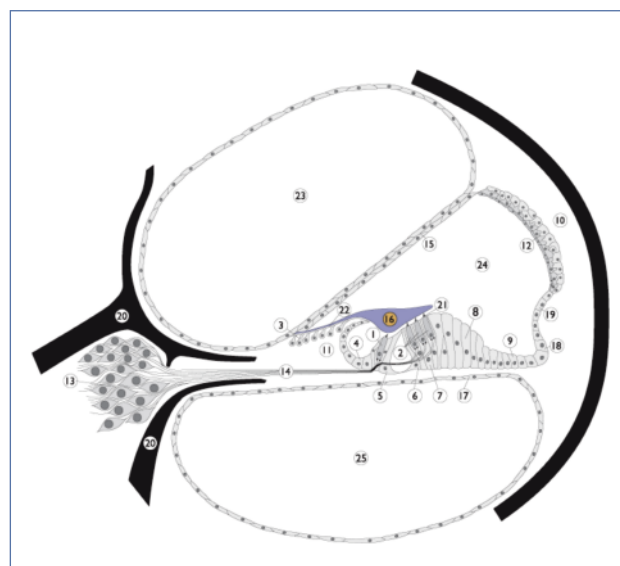


Diagrama da expressão coclear do gene *COL11A2*. O colagénio Xla2 é um componente estrutural importante da membrana tectória.

Fonte: Imagem reproduzida com autorização dos autores⁵.

1 Célula ciliada interna; 2 Célula ciliada externa; 3 Célula interdentadas; 4 Célula do sulco interno; 5 Célula pilar interna; 6 Célula pilar externa; 7 Célula de Deiters; 8 Célula de Hensen; 9 Célula de Claudius; 10 Ligamento espiral; 11 Limbo da lâmina espiral; 12 Estria vascular; 13 Gânglio Espiral; 14 Nervo auditivo; 15 Membrana de Reissner; 16 Membrana tectória; 17 Membrana basilar; 18 Células do sulco externo; 19 Proeminência espiral; 20 Lâmina espiral óssea; 21 Lâmina reticular; 23 Escala vestibular; 24 Escala média; 25 Escala timpânica.

FIG 8

A-TECTORINA (*TECTA*)

A tectorina é um componente primordial da matriz extra-celular da membrana tectória que está localizada sobre os esterílios (Figura 9). O som induz deflexões nesta membrana, o que resulta na geração de um potencial receptor. A membrana tectória é composta por colagénio e glicoproteínas não-cola-génicas, das quais, as mais importantes, são as tectorinas α (*TECTA*) e β que interagem entre si. Já foram descritas diversas mutações dominantes e recessivas do gene *TECTA*, que cursam com perda auditiva, em famílias ligadas a DFNA8/12 e DFNB21^{59,60}. As mutações dominantes exercem um efeito dominante negativo, alterando a interacção correcta entre os diferentes polipeptídeos da tectorina α ⁵⁹. Clinicamente, de acordo com as mutações existentes no gene, causam hipoacusia pré-lingual, não progressiva, das frequências médias ou hipoacusia progressiva, das frequências agudas. As mutações recessivas são funcionalmente alelos nulos, pelo que metade da dose funcional destas proteínas é suficiente para preservar a função auditiva. Este dado explica a ausência de sintomas nos portadores da mutação em heterozigotia, sendo reforçado pelo facto dos ratos homocigóticos para a deleção alvo da tectorina α apresentarem perda auditiva moderada-a-grave, secundária à separação da membrana tectória dos cílios das células ciliadas⁶¹.

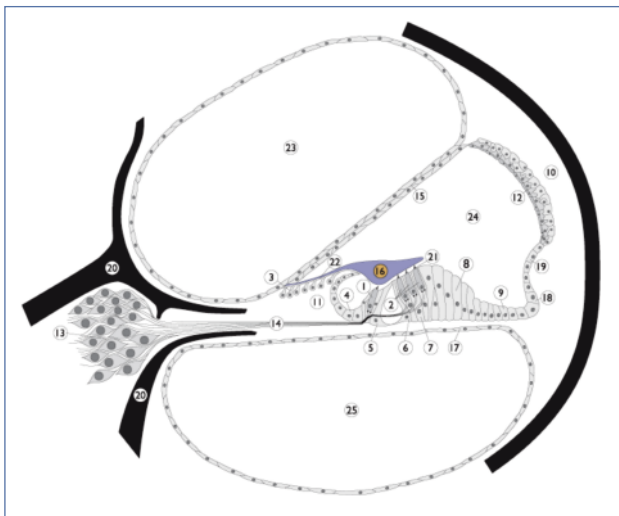


Ilustração da expressão do gene *TECTA* na cóclea; a tectorina α é uma das proteínas que compõem a membrana tectória.

Fonte: Imagem reproduzida com autorização dos autores⁵.

1 Célula ciliada interna; 2 Célula ciliada externa; 3 Célula interdentadas; 4 Célula do sulco interno; 5 Célula pilar interna; 6 Célula pilar externa; 7 Célula de Deiters; 8 Célula de Hensen; 9 Célula de Claudius; 10 Ligamento espiral; 11 Limbo da lâmina espiral; 12 Estria vascular; 13 Gânglio Espiral; 14 Nervo auditivo; 15 Membrana de Reissner; 16 Membrana tectória; 17 Membrana basilar; 18 Células do sulco externo; 19 Proeminência espiral; 20 Lâmina espiral óssea; 21 Lâmina reticular; 23 Escala vestibular; 24 Escala média; 25 Escala timpânica.

FACTORES DE TRANSCRIÇÃO

EYES ABSENT 4 (EYA4)

A família de genes *EYA* codifica para um grupo de activadores da transcrição que interactuam com outras proteínas, numa hierarquia de regulação altamente conservadora, assegurando o desenvolvimento embriológico normal. A ocorrência de mutações em *EYE4* pode causar surdez autossómica dominante, em famílias ligadas ao locus DFNA10⁶². O trabalho de Wayne e colaboradores demonstrou que a proteína produzida por este gene desempenha um papel importante

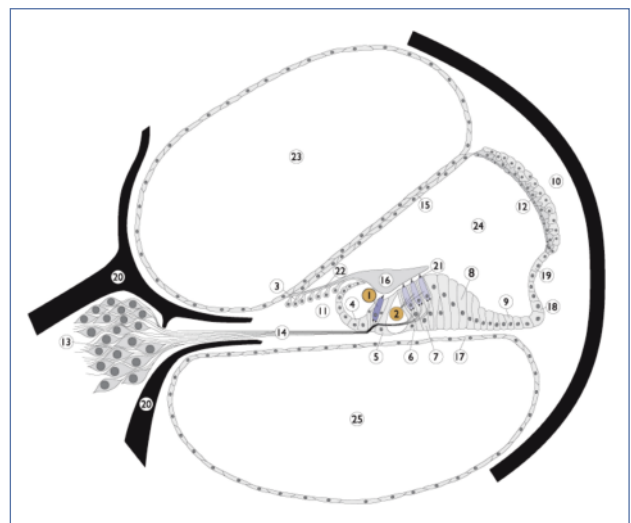
na embriogénese e tem uma função essencial na sobrevivência das células de uma cóclea já desenvolvida⁶². É de realçar que as mutações no *EYA1* originam síndrome Branquio-Oto-Renal (BOR), uma doença autossómica dominante, caracterizada por combinações variáveis de anomalias branquiais, hipoacusia e malformações renais⁶³.

GENES COM FUNÇÃO ATÍPICA OU POUCO CONHECIDA

Como referido anteriormente, a função de diversos genes associados à hipoacusia ainda se mantém desconhecida. Desta forma, não é possível integrá-los nos grupos previamente enumerados, descrevendo-se, para o efeito, alguns exemplos.

OTOFERLINA (OTOF)

A otoferlina (*OTOF*) é membro de uma família de genes de mamíferos, relacionada com o factor da espermatogénese *Caenorhabditis elegans fer-1*. Este gene tem uma expressão predominante nas células ciliadas⁶⁴ (Figura 10). Foram descritas diversas mutações causadoras de perda auditiva em famílias ligadas ao locus recessivo DFNB9^{65,66}. É uma causa frequente de hipoacusia pré-lingual, com hereditariedade autossómica recessiva, em indivíduos espanhóis que não apresentam a mutação *GJB2*. Este facto deve-se à existência de uma mutação fundadora neste gene (Q829Z) em Espanha⁶⁶. Curiosamente, o fenótipo da mutação é único dentro das hipoacusias recessivas, caracterizando-se por neuropatia auditiva, em que o indivíduo surdo apresenta otoemissões acústicas normais⁶⁷. No entanto, posteriormente, Kim *et al.* descreveram outra família com neuropatia auditiva progressiva e com hereditariedade autossómica dominante, cujo locus está mapeado no cromossoma 13q14-21⁶⁸.



Esquema evidenciando a expressão coclear do gene *OTOF*. A otoferlina tem uma expressão exclusiva nas células ciliadas. Fonte: Imagem reproduzida com autorização dos autores⁵.

1 Célula ciliada interna; 2 Célula ciliada externa; 3 Célula interdentadas; 4 Célula do sulco interno; 5 Célula pilar interna; 6 Célula pilar externa; 7 Célula de Deiters; 8 Célula de Hensen; 9 Célula de Claudius; 10 Ligamento espiral; 11 Limbo da lâmina espiral; 12 Estria vascular; 13 Gânglio Espiral; 14 Nervo auditivo; 15 Membrana de Reissner; 16 Membrana tectória; 17 Membrana basilar; 18 Células do sulco externo; 19 Proeminência espiral; 20 Lâmina espiral óssea; 21 Lâmina reticular; 23 Escala vestibular; 24 Escala média; 25 Escala timpânica.

VOLFRAMINA (*WFS1*)

O gene *WFS1* codifica a glicoproteína volframina, com localização preponderante no retículo endoplasmático. A nível da cóclea, a volframina localiza-se maioritariamente nas células que recobrem a escala média, nas células ciliadas vestibulares e nas células do gânglio espiral⁶⁹ (Figura 11). As mutações no gene *WFS1* causam: a síndrome de Wolfram, com hereditariedade autossómica recessiva, que se caracteriza por diabetes *mellitus* e atrofia óptica, à qual se podem associar diabetes insípida, hipoacusia e atonia do tracto urinário^{13,70,71}; e, hipoacusia neurossensorial, ligeiramente progressiva, bilateral e simétrica, com atingimento das baixas-frequências, cuja hereditariedade é autossómica dominante (DFNA6/14)^{12,72}. Embora esta hipoacusia tenha início precoce, muitas vezes só se manifesta na segunda década, com agravamento consistente com presbiacusia². A função exacta da volframina ainda não se encontra completamente definida, na sequência da dificuldade de avaliação fenotípica do rato *wfs1*^{73,74}. Curiosamente, a maioria das mutações que inactivam completamente o gene cursa com a síndrome de Wolfram. Em contrapartida, as não-inactivantes, localizadas preferencialmente na região c-terminal, causam perda auditiva.

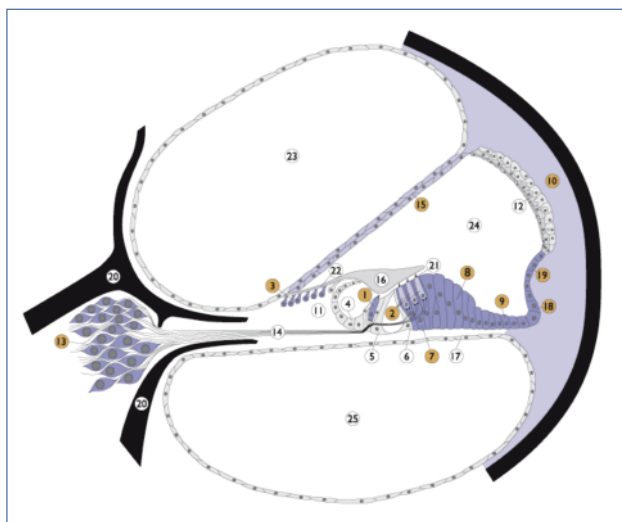


Diagrama representando a expressão coclear do gene *WFS1*; a volframina localiza-se maioritariamente nas células que recobrem a escala média, nas células ciliadas vestibulares e nas células do gânglio espiral. Fonte: Imagem reproduzida com autorização dos autores⁶.

1 Célula ciliada interna; 2 Célula ciliada externa; 3 Célula interdentada; 4 Célula do sulco interno; 5 Célula pilar interna; 6 Célula pilar externa; 7 Célula de Deiters; 8 Célula de Hensen; 9 Célula de Claudius; 10 Ligamento espiral; 11 Limbo da lâmina espiral; 12 Estria vascular; 13 Gânglio Espiral; 14 Nervos auditivos; 15 Membrana de Reissner; 16 Membrana tectória; 17 Membrana basilar; 18 Células do sulco externo; 19 Proeminência espiral; 20 Lâmina espiral óssea; 21 Lâmina reticular; 22 Escala vestibular; 23 Escala média; 24 Escala timpânica.

FIG 11

SURDEZ MITOCONDRIAL

A molécula de DNA mitocondrial (mtDNA) contém 13 genes codificadores de proteínas, assim como dois rRNA (ácido ribonucleico ribossómico) e vinte e dois tRNA (RNA de transferência) que são essenciais num sistema mitocondrial sintetizador de proteínas. Uma célula contém múltiplos genomas mitocondriais. Quando um doente tem a mutação em todas as moléculas de mtDNA, esta é denominada homoplásmica. Existindo uma mistura de populações de genomas normais e mutantes, a mutação é heteroplásmica. Neste con-

texto, uma distribuição heterogénea da mutação nos diferentes tecidos, pode causar uma variabilidade fenotípica marcadíssima, em doentes com mutações heteroplásmicas. As mutações do mtDNA são habitualmente heteroplásmicas e a grande maioria causa síndromes multisistémicas. Neste contexto, as hipoacusias sindrómicas secundárias a mutações mitocondriais, estão habitualmente associadas a anomalias neuromusculares⁷⁵.

No entanto, as mutações mitocondriais também podem causar S-NS⁷⁶. Apesar de existirem diversas mutações mitocondriais descritas⁷⁷⁻⁷⁹, uma das primeiras mutações descobertas foi a mutação homoplásmica 1555A>G no gene *MTRNR1* que codifica o 12S rRNA⁸⁰⁻⁸². Embora muitos indivíduos com esta mutação apenas manifestem a perda auditiva após exposição aos aminoglicosídeos, existem diversos casos de surdez sem relação com este grupo de antibióticos^{81,83,84}. Contrariamente à forma normal do 12S rRNA, a forma mutada apresenta uma afinidade muito elevada para os aminoglicosídeos que afectam a síntese proteica nestas células^{85,86}. O fenótipo destes indivíduos é muito variável, podendo oscilar entre a surdez congénita profunda, a perda auditiva progressiva moderada ou cursar com audição normal. Esta variabilidade fenotípica é influenciada por genes modificadores, dos quais dois já estão identificados. O gene *MTO1*, envolvido na modificação do tRNA, que regula a eficiência da transferência e a eficácia do emparelhamento dos pares de bases, codão-anti-codão, na região codificante do ribossoma. Este gene pode suprimir a manifestação fenotípica da mutação 1555A>G. O segundo gene modificador codifica o factor de transferência mitocondrial TFB1M que metila resíduos de alalina na ansa adjacente à da mutação 1555A>G, no gene *MTRNR1*⁸⁷. A sua função está associada à manutenção da mitocôndria^{87,88}.

GENES MODIFICADORES PARA SURDEZ

Diversos são os trabalhos que descrevem casos de variabilidade fenotípica da hipoacusia dentro de uma família ou entre indivíduos portadores da mesma mutação. Esta variabilidade pode ser atribuída a factores genéticos e/ou ambientais. Um dos mecanismos consiste na interacção entre um gene mutado e os genes modificadores podendo, desta forma, alterar a manifestação fenotípica de um dado genótipo. Para melhor se detectar e entender a função destes genes modificadores, têm sido criados modelos de ratos que permitem estudar a interacção dos diferentes factores⁸⁹⁻⁹¹.

Como exemplo, refira-se que numa família ligada ao DFNB26, diversos indivíduos homocigóticos para o haplotipo da doença não apresentavam hipoacusia. No entanto, todos eles apresentavam um haplotipo comum no *locus* modificador de *DFNM1*, localizado no cromossoma 1q24⁹². O gene modificador existente neste *locus* não permite a expressão da perda auditiva associada ao alelo patogénico DFNB26. Outros genes modificadores já identificados apresentam efeitos mais subtils, afectando a idade de aparecimento da hipoacusia, o grau de gravidade ou a rapidez de progressão da doença, como o anteriormente mencionado *MTO1*, ligado à surdez mitocondrial.

A expressão destes genes modificadores, ao aumentar a variabilidade clínica dos doentes, dificulta a correcta interpretação das árvores genealógicas, tornando mais difícil a presunção diagnóstica.

FACTORES DE RISCO GENÉTICO PARA A PRESBIACUSIA

Os estudos de herdabilidade da presbiacusia têm demonstrado existir um papel importante da predisposição genética. Estas investigações concluíram que cerca de 50% da variabilidade da acuidade auditiva nas altas frequências, numa população com mais de 65 anos, seria atribuível a factores genéticos e as restantes 50%, a factores ambientais⁹³⁻⁹⁵. A localização dos genes da presbiacusia está maioritariamente definida em modelos animais, com reprodutibilidade ainda reduzida em Humanos⁹⁶⁻⁹⁸.

As diversas investigações existentes apontam como agentes etiológicos, os factores de *stress* oxidativo e as deleções mitocondriais⁹⁹. Os primeiros são potencialmente tóxicos e podem causar lesão tecidual, celular ou mesmo a nível do ADN e do mtDNA, se não forem devidamente inactivados pelos sistemas de protecção celular antioxidantes que incluem o glutatião e as enzimas relacionadas, como a catalase e a superóxido dismutase. A hipoperfusão da cóclea conduz à formação de produtos resultantes das reacções oxidativas e à consequente perda auditiva¹⁰⁰. Desta forma, os níveis baixos de glutatião no nervo auditivo e a sub-expressão de superóxido dismutase já foram associadas a perda auditiva nos ratos idosos^{101,102}. Também o suplemento de vitaminas E e C, associados a metabolitos mitocondriais, como a carnitina acetil-1 e o ácido alfa-lipoico e as dietas restritivas em calorias, apresentavam atenuação do efeito do envelhecimento a nível auditivo, o que está associado a uma redução do *stress* oxidativo¹⁰³. Os animais estudados apresentavam uma diminuição das deleções mitocondriais, uma menor perda de células ciliadas externas e uma melhor preservação da capacidade auditiva. Estes dados não foram reproduzidos na totalidade em Humanos, dado que foi observado um efeito pouco valorizável com a restrição calórica, o que faz pressupor que o metabolismo oxidativo é menos simples do que o previamente assumido¹⁰⁴. No entanto, Seidman e colaboradores demonstraram que os suplementos com lecitina ou fosfatidilcolina poli-insaturada, os quais desempenham um papel importante na activação da superóxido dismutase, resultam num nível significativo de protecção¹⁰⁰.

O DNA mitocondrial apresenta uma elevada taxa de mutação, alterando a eficiência bio-energética da célula. As células cocleares são muito vulneráveis, por requererem níveis energéticos elevados, associados ao facto de terem uma diferenciação terminal, em que as células lesadas não são substituídas. Foram descritas mutações adquiridas, específicas do mtDNA, ocorrendo mais frequentemente com o aumento da idade e com a progressão da hipoacusia. Em Humanos, a denominada deleção mitocondrial comum ao envelhecimento, envolve 4977 pares de bases (pb)¹⁰⁵. Contudo, uma proporção de doentes com presbiacusia apresenta um soma-

tório adquirido de mutações mitocondriais distintas¹⁰⁶. Naturalmente, a expressão clínica destas mutações está dependente da interacção com os factores ambientais e com os genes modificadores, codificados pelo DNA nuclear¹⁰⁷.

A associação entre genes candidatos e a presbiacusia não foram significativas até ao momento, provavelmente devido à complexidade da doença⁸. No entanto, no futuro, o tratamento da presbiacusia deverá assentar mais numa aproximação etiológica e não tanto sintomática. Para o efeito, é essencial o conhecimento dos processos celulares e moleculares subjacentes ao seu desenvolvimento.

APLICAÇÕES DIAGNÓSTICAS

Apesar da recente evolução científica sobre genes associados à S-NS, existem ainda inúmeros genes por identificar e *loci* por localizar. Ou seja, o conhecimento entretanto adquirido ainda não permite uma aplicação diagnóstica generalizada, tal como já ocorre noutras doenças. Na realidade, o principal obstáculo é a existência de uma extrema heterogeneidade genética, associado ao facto de a S-NS não cursar com outras alterações clínicas que permitam distinguir as diferentes mutações existentes. Adicionalmente, as poucas características patológicas associadas, são indicadores pobres do gene específico envolvido, dado que, na sua grande maioria, se verifica uma grande variabilidade clínica.

Neste momento, perante uma S-NS em caucasianos, com exclusão das mutações do gene *GJB2*, podem considerar-se algumas excepções, em que a coexistência de pequenas alterações orienta para a pesquisa da mutação de um gene específico:

O gene *COCH* - codifica a coclina – cuja hereditariedade é autossómica dominante, causa uma perda auditiva progressiva, habitualmente após os trinta anos de idade, com aparecimento simultâneo de sintomas de disfunção vestibular;

O gene *OTOF* - codifica a otoferlina - em que é diagnosticada uma neuropatia auditiva congénita, inserida numa doença com hereditariedade autossómica recessiva;

O gene *SLC26A4* - codifica a pendrina – tem hereditariedade autossómica recessiva e pode ser presumido com o aparecimento de alargamento congénito do aqueduto vestibular em tomografia computadorizada do ouvido;

O gene *MTRNR1(12SrRNA)*, que determina surdez com hereditariedade mitocondrial, induzida pela exposição aos aminoglicosídeos;

O gene *WFS1* - codifica a volframina - tem hereditariedade autossómica dominante e história familiar positiva, causando uma perda auditiva para as frequências graves, de início precoce.

No entanto, é de destacar que estas situações clínicas representam uma percentagem insignificante dos casos clínicos de surdez de possível causa genética, o que traduz o fosso existente entre o conhecimento científico sobre os genes da sur-

dez e as aplicações diagnósticas resultantes.

De enfatizar que as mutações do gene *GJB2* (conexinas) são responsáveis por uma grande percentagem de doentes surdos nalgumas populações, nomeadamente mais de 50% dos casos na região Mediterrânea, sendo, desde que a clínica assim o demonstre, uma indicação excelente para testes de DNA. Por outro lado, dado tratar-se de um gene de pequenas dimensões, permite que a sua sequenciação seja rápida e economicamente viável. Contrariamente, em doentes sem mutações para o gene *GJB2*, ou pertencentes a populações em que estas mutações são pouco frequentes, as possíveis causas genéticas distribuem-se por inúmeros genes, alguns de grandes dimensões. Estes factos tornam o rastreio sequencial de todos os genes associados à surdez, com a tecnologia correntemente existente, muito moroso e economicamente proibitivo.

Uma técnica de diagnóstico deveras promissora é a utilização de *microarrays*, também denominados *chips* de ADN, que permite a execução simultânea de um número elevado de testes genéticos. Nesta sequência, o ideal seria a utilização desta técnica para o rastreio de diferentes mutações conhecidas ligadas à surdez congénita. Embora, a utilização de *microarrays* ainda só permita a análise de um número limitado de testes em simultâneo, o seu desenvolvimento é muito encorajador e encontra-se em franco desenvolvimento¹⁰⁸.

CONCLUSÃO

A surdez hereditária é uma patologia com uma heterogeneidade genética marcada, estando mais de 50 genes descritos para a surdez N-S autossómica dominante e um número superior a 70 para a surdez N-S autossómica recessiva. Embora existam avanços significativos na compreensão da base molecular da perda auditiva, a identificação da causa genética precisa, num determinado indivíduo, mantém-se difícil de efectuar. Consequentemente é importante excluir as causas sindrómicas de surdez congénita, com base nas alterações fenotípicas existentes e em exames subsidiários para confirmação do diagnóstico.

O rastreio molecular do gene *GJB2*, nomeadamente da conexina 26, deverá ser efectuado em todos os casos de surdez isolada, sem etiologia definida, dado ser a causa mais comum de hipoacusia com hereditariedade recessiva e ser tecnicamente fácil de executar.

Desta feita, o desenvolvimento desta área de investigação continua crucial, uma vez que o conhecimento dos genes mutados responsáveis pela surdez, como os da família das conexinas em geral e da conexina 26 em particular, fornece-nos informações sobre a patogénese do ouvido interno, permitindo a obtenção de soluções clínicas para o tratamento da hipoacusia¹⁷.

O tratamento da hipoacusia, com a inserção do gene normal no genoma alterado, utilizando bactérias como vectores, ainda se encontra em fase experimental. Esta linha de investigação começa a apresentar resultados atractivos em mode-

los animais, permitindo a expressão normal do gene anteriormente mutado¹⁰⁹. Uma das áreas que tem vindo a ser desenvolvida recentemente é a utilização terapêutica de células toti/pluripotentes, denominadas células estaminais. Uma vez induzida a diferenciação no tecido cujo gene está alterado, permitiria a sua substituição ou renovação por células normofuncionantes proporcionando o tratamento da hipoacusia neurossensorial inserida na S-NS¹¹⁰. Relativamente às células cocleares, que possuem um nível de diferenciação complexo, as diferentes investigações *in vitro* e em modelos animais ainda se encontram numa fase inicial, mas revelam-se muito prometedoras¹¹¹.

BIBLIOGRAFIA

1. Mehl AL, Thompson V: The Colorado new-born hearing screening project, 1992-1999: on the threshold of effective population-based universal newborn hearing screening. *Pediatrics* 109:E7 (2002).
2. Bitner-Glindzic M: Hereditary deafness and phenotyping in humans. *British Medical Bulletin* 63:73-94 (2002).
3. Marazita ML, Ploughman LM, Rawling B, et al.: Genetic epidemiology studies of early-onset deafness in the US school-age population. *Am J Med Genet* 46:486-491 (1993).
4. Morton NE: Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 630:16-31 (1991).
5. Glindzic M: Hereditary deafness and phenotyping in humans. *British Medical Bulletin* 63:73-94 (2002).
6. Van Camp G, Smith RJH. *Hereditary Hearing Loss Homepage*. Disponível em URL: <http://webho1.ua.ac.be/hhh/> (Setembro 2008).
7. Cruickshanks KJ, Wiley TL, et al.: The 5-year incidence and progression of hearing loss: the epidemiology of hearing loss study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129:1041-1046 (2003).
8. Van Laer L, Van Camp G: Age related hearing impairment: ensemble playing of environmental and genetic factors. In: Martini A, Stephens D, Read AP (Eds.): *Genes, Hearing and Deafness – From Molecular Biology to Clinical Practice*. Thompson Publishing Services, Andover UK; 2007:79-90.
9. McCabe ER, McCabe LL: State-of-the-art for DNA technology in newborn screening. *Acta Paediatr Suppl* 88 (432):58-60 (1999).
10. Karakshah J: Universal Newborn Hearing Screening – Genetic testing of connexin-26. *ENT News* 17;3:76 (2008).
11. Leon PE, Raventos H, Lynch E, et al.: The gene for an inherited form of deafness maps to chromosome 5q31. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5181-5184 (1992).
12. Bessalova IN, Van Camp G, Bom SJ et al.: Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (*WFS1*) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Hum Mol Genet* 10:2501-2508 (2001).
13. Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, et al.: A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet* 20:143-148 (1998).
14. Steel K: The benefits of recycling. *Science* 285: 1363-1364 (1999).
15. Kikutchi T, Adams JC, Miyabe Y et al.: Potassium ion recycling pathway via gap junction system in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electronic Microsc* 33:51-56 (2000).
16. Kikutchi T, Kimura RS, Paul DL, et al.: Gap junctions in the rat

- cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol (Berl)* 191: 101-118 (1995).
17. Zelante L, Gasparini P, Estivil X, et al.: Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 6:1605-1609 (1997).
 18. Estivil X, Fortina P, Surrey S, et al.: Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 351:394-398 (1998).
 19. Sabag AD, Dagan O, Avraham KB: Connexins in hearing loss: a comprehensive overview. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 16(2-3):101-116 (2005).
 20. Lautermann J, tem Cat WJ, Altenhoff P, et al.: Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea. *Cell Tissue Res* 294:415-120 (1998).
 21. Green GE, Scott DA, McDonald JM, et al.: Carrier rates in the mid-west United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *JAMA* 281:2211-2216 (1999).
 22. Van Laer L, Coucke P, Mueller RF, et al.: A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet* 38:515-518 (2001).
 23. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, et al.: Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 6:2173-2177 (1997).
 24. Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, et al.: Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 62:792-799 (1998).
 25. Kudo T, Ikeda K, Kure S, et al.: Novel mutations in connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population. *Am J Med Genet* 90:141-145 (2000).
 26. Sobe T, Erlich P, Berry A, et al.: High frequency of the deafness associated 167delT mutation in the connexin 26 (GJB2) gene in Israeli Ashkenazim. *Am J Med Genet* 86:499-500 (1999).
 27. Gabriel HD, Jung D, Butzler C, et al.: Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin 26-deficient mice. *J Cell Biol* 140:1453-1461 (1998).
 28. Cohen-Salmon M, Ott T, Michel V, et al.: Targeted ablation of connexin 26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr Biol* 12:1106-1111 (2002).
 29. del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, et al.: A deletion involving the connexin 30 gene in non-syndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 346:243-249 (2002).
 30. del Castillo FJ, Rodriguez-Ballesteros M, Alvarez A, et al.: A novel deletion involving the connexin-30 gene, del (GJB6d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet* 42(7):588-594 (2005).
 31. Ahmad S, Chen S, Sun J, et al.: Connexins 26 and 30 are co-assembled to form gap junctions in the cochlea of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 307:362-368 (2003).
 32. Cryns K, Orzan E, Murgia A, et al.: A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness. *J Med Genet* 41:147-154 (2004).
 33. Fernández-Burriel M, Rodríguez-Quinones F: A simple method of screening for the common connexin-26 gene 35delG mutation in nonsyndromic neurosensory autosomal recessive deafness. *Genet Test* 7 (2):147-9 (2003).
 34. Kharkovets T, Hardelin JP, Safieddine S, et al.: KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4333-4338 (2000).
 35. Beisel KW, Nelson NC, Delimont DC, et al.: Longitudinal gradients of KCNQ4 expression in spiral ganglion and cochlear air cells correlate with progressive hearing loss in DFNA2. *Brain Res Mol Brain Res* 82:137-149 (2000).
 36. Phelps PD, Coffey RA, Trembath RC, et al.: Radiological malformations of the ear in Pendred Syndrome. *Clin Radiol* 53:268-273 (1998).
 37. Everett LA, Glaser B, Beck JC, et al.: Pendred syndrome is caused by mutation in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 17:411-422 (1997).
 38. Everett LA, Morsli H, Wu DK, et al.: Expression patterns of the mouse ortholog of the Pendred's syndrome gene (Pds) suggests a key role for pendrin in the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9727-9732 (1999).
 39. Naganawa S, Koshikawa T, Fukatsu H, et al.: Enlarged endolymphatic duct and sac syndrome: relationship between MR findings and genotype of mutation in Pendred syndrome gene. *Magn Reson Imaging* 22:25-30 (2004).
 40. Siemens J, Lillo C, Dumont RA, et al.: Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia. *Nature* 428:950-955 (2004).
 41. Sollner C, Rauch GJ, Siemene J, et al.: Mutations in cadherin 23 affect tip links in zebrafish sensory hair cells. *Nature* 428:955-959 (2004).
 42. Bork JM, Peters LM, Riazuddin S, et al.: Usher syndrome ID and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutation of the novel cadherin-like gene CDH23. *Am J Hum Genet* 68:26-37 (2001).
 43. Bolz H, von Brederlow B, Ramirez A, et al.: Mutation of CDH23 encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nat Genet* 27:108-112 (2001).
 44. Ahmed ZM, Riazuddin S, Ahmad J, et al.: PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Hum Mol Genet* 12:3215-3223 (2003).
 45. Alagramam KN, Yuan H, Kuehn MH, et al.: Mutations in the novel protocadherin PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Hum Mol Genet* 10:1709-1718 (2001).
 46. Ahmed ZM, Riazuddin S, Bernstein SL, et al.: Mutations of the protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Am J Hum Genet* 69:25-34 (2001).
 47. Di Palma F, Holme RH, Bryda EC, et al.: Mutations in Cdh23, encoding a new type of cadherin, cause stereocilia disorganization in Waltzer, the mouse model for Usher syndrome type 1D. *Nat Genet* 27:103-107 (2001).
 48. Hampton LL, Wright CG, Alagramam KN, et al.: A new spontaneous mutation in the mouse Ames Waltzer gene, Pcdh15. *Hear Res* 180:67-75 (2003).
 49. Libby RT, Kitamoto J, Holme RH, et al.: Cdh23 mutations in the mouse are associated with retinal dysfunction but no retinal degeneration. *Exp Eye Res* 77:731-739 (2003).
 50. Khaitlina SY: Functional specificity of actin isoforms. *Int Ver Cytol* 202:35-98 (2001).
 51. Hofer D, Ness W, Drenckhahn D: Sorting of actin isoforms in chicken auditory hair cells. *J Cell Sci* 110 (Pt6): 765-770 (1997).
 52. Zhu M, Yang T, Wei S, et al.: Mutations in the gamma-actin gene (ACTG1) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26). *Am J Hum Genet* 73:1082-1091 (2003).

53. Higashida C, Miyoshi T, Fujita A, et al.: Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells. *Science* 303:2007-2010 (2004).
54. Lynch ED, Lee MK, Morrow JE et al.: Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the Drosophila gene diaphanous. *Science* 278: 1315-1318 (1997).
55. Zheng L, Sekerkova G, Vranich K, et al.: The deaf jerker mouse has a mutation in the gene encoding the espin actin-bundling proteins of hair cell stereocilia and lacks espin. *Cell* 102:377-385 (2000).
56. Loomis PA, Zheng L, Sekerkova G, et al.: Espin cross-links causes the elongation of microvillus-type parallel actin bundles in vivo. *J Cell Biol* 163:1045-1055 (2003).
57. Naz S, Griffith AJ, Riazuddin S, et al.: Mutations of ESPN cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction. *J Med Genet* 41:591-595 (2004).
58. McGuirt WT, Prasad SD, Griffith AJ, et al.: Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nat Genet* Dec 23(4):413-9 (1999).
59. Verhoeven K, Van Laer L, Kirschhofer K, et al.: Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet* May; 19(1):60-2 (1998).
60. Mustapha M, Weil D, Chardenoux S, et al.: An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum Mol Genet* Mar;8(3):409-12 (1999).
61. Legan PK, Lukashkina VA, Goodyear RJ, et al.: A targeted deletion in alpha-tectorin reveals that the tectorial membrane is required for the gain and timing of cochlear feedback. *Neuron*. 28(1):273-85 (2000).
62. Wayne S, Robertson NG, DeClau F, et al.: Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet* 1;10(3):195-200 (2001).
63. Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, et al.: A human homologue of the Drosophila eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat Genet* 15(2):157-64 (1997).
64. Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, et al.: A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet* 21(4):363-9 (1999).
65. Houseman MJ, Jackson AP, Al-Gazali LI, et al.: A novel mutation in a family with non-syndromic sensorineural hearing loss that disrupts the newly characterised OTOF long isoforms. *J Med Genet* Aug; 38(8):E25 (2001).
66. Miglioni V, Modamio-Høybjør S, Moreno-Pelayo MA, et al.: Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *J Med Genet* Jul; 39(7):502-6 (2002).
67. Rodríguez-Ballesteros M, del Castillo FJ, Martín Y, et al.: Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene (OTOF). *Hum Mutat* Dec; 22(6):451-6 (2003).
68. Kim TB, Isaacson B, Sivakumaran TA, et al.: A gene responsible for autosomal dominant auditory neuropathy (AUNA1) maps to 13q14-21. *J Med Genet* Nov; 41(11):872-6 (2004).
69. Cryns K, Thys S, Van Laer L, et al.: The WFS1 gene, responsible for low frequency sensorineural hearing loss and Wolfram syndrome, is expressed in a variety of inner ear cells. *Histochem Cell Biol* Mar; 119(3):247-56 (2003).
70. Wolfram DJ, Wagener HP: Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases. *Mayo Clin Proc* 13:715-718 (1938).
71. Valéro R, Bannwarth S, Roman S, et al.: Autosomal dominant transmission of diabetes and congenital hearing impairment secondary to a missense mutation in the WFS1 gene. *Diabet Med* 25(6):657-61 (2008).
72. Young TL, Ives E, Lynch E, et al.: Non-syndromic progressive hearing loss DFNA38 is caused by heterozygous missense mutation in the Wolfram syndrome gene WFS1. *Hum Mol Genet* 10(22):2509-14 (2001).
73. Ishihara H, Takeda S, Tamura A, et al.: Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet* Jun 1; 13(11):1159-70 (2004).
74. Luuk H, Koks S, Plaas M, et al.: Distribution of Wfs1 protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *J Comp Neurol* 509(6):642-60 (2008).
75. Fischel-Ghodsian N: Mitochondrial deafness mutations reviewed. *Hum Mutat* 13(4):261-70 (1999).
76. Maász A, Komlósi K, Hadzsiev K, et al.: Phenotypic variants of the deafness-associated mitochondrial DNA A7445G mutation. *Curr Med Chem* 15(13):1257-62 (2008).
77. Hutchin T: Sensorineural hearing loss and the 1555G mitochondrial DNA mutation. *Acta Otolaryngol* 119(1):48-52 (1999).
78. Sue CM, Tanji K, Hadjigeorgiou G, et al.: Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Ser(UCN)) gene. *Neurology* Jun 10; 52(9):1905-8 (1999).
79. Liu XZ, Angeli S, Ouyang XM, et al.: Audiological and genetic features of the mtDNA mutations. *Acta Otolaryngol* 128(7):732-8 (2008).
80. Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, et al.: Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 4(3):289-94 (1993).
81. Estivill X, Govea N, Barceló E, et al.: Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am J Hum Genet* 62(1):27-35 (1998).
82. Usami S, Abe S, Kasai M, et al.: Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. *Laryngoscope* 107(4):483-90 (1997).
83. Gardner JC, Goliath R, Viljoen D, et al.: Familial streptomycin ototoxicity in a South African family: a mitochondrial disorder. *J Med Genet* 34(11):904-6 (1997).
84. el-Schahawi M, López de Munain A, Sarrazin AM, et al.: Two large Spanish pedigrees with nonsyndromic sensorineural deafness and the mtDNA mutation at nt 1555 in the 12s rRNA gene: evidence of heteroplasmy. *Neurology* 48(2):453-6 (1997).
85. Hamasaki K, Rando RR: Specific binding of aminoglycosides to a human rRNA construct based on a DNA polymorphism which causes aminoglycoside-induced deafness. *Biochemistry* 36(40):12323-8 (1997).
86. Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G: A biochemical basis for the inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. *Hum Mol Genet* 22; 9(12):1787-93 (2000).

87. Bykhovskaya Y, Mengesha E, Wang D, *et al.*: Human mitochondrial transcription factor B1 as a modifier gene for hearing loss associated with the mitochondrial A1555G mutation. *Mol Genet Metab* 82(1):27-32 (2004).
88. Seidel-Rogol BL, McCulloch V, Shadel GS: Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop. *Nat Genet* 33(1):23-4 (2003).
89. Street VA, McKee-Johnson JW, Fonseca RC, *et al.*: Mutations in a plasma membrane Ca²⁺-ATPase gene cause deafness in deaf-waddler mice. *Nat Genet* 19(4):390-4 (1998).
90. Zheng QY, Johnson KR, Erway LC: Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hear Res* 130(1-2):94-107 (1999).
91. Nemoto M, Morita Y, Mishima Y, *et al.*: Ahl3, a third locus on mouse chromosome 17 affecting age-related hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun* 26; 324(4):1283-8 (2004).
92. Riazuddin S, Castelein CM, Ahmed ZM, *et al.*: Dominant modifier DFNM1 suppresses recessive deafness DFNB26. *Nat Genet* 26(4):431-4 (2000).
93. Karlsson KK, Harris JR, Svartengren M: Description and primary results from an audiometric study of male twins. *Ear Hear* 18(2):114-20 (1997).
94. Gates GA, Couropmitree NN, Myers RH: Genetic associations in age-related hearing thresholds. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg* 125(6):654-9 (1999).
95. Christensen K, Frederiksen H, Hoffman HJ: Genetic and environmental influences on self-reported reduced hearing in the old and oldest old. *J Am Geriatr Soc* 49:1512-1517 (2001).
96. Picciotti P, Torsello A, Wolf FI, *et al.*: Age-dependent modifications of expression level of VEGF and its receptors in the inner ear. *Exp Gerontol* 39(8):1253-8 (2004).
97. Ruel J, Emery S, Nouvian R, *et al.*: Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice. *Am J Hum Genet* 83(2):278-92 (2008).
98. Liu XZ, Yan D: Ageing and hearing loss. *J Pathol* 211(2):188-97 (2007).
99. Bao J, Lei D, Du Y, *et al.*: Requirement of nicotinic acetylcholine receptor subunit beta2 in the maintenance of spiral ganglion neurons during aging. *J Neurosci* 23; 25(12):3041-5 (2005).
100. Seidman MD, Khan MJ, Tang WX, *et al.*: Influence of lecithin on mitochondrial DNA and age-related hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 127(3):138-44 (2002).
101. Lautermann J, Crann SA, McLaren J, *et al.*: Glutathione-dependent antioxidant systems in the mammalian inner ear: effects of aging, ototoxic drugs and noise. *Hear Res* 114(1-2):75-82 (1997).
102. Coling DE, Yu KC, Somand D, *et al.*: Effect of SOD1 overexpression on age- and noise-related hearing loss. *Free Radic Biol Med* 1; 34(7):873-80 (2003).
103. Seidman MD.:Effects of dietary restriction and antioxidants on presbycusis. *Laryngoscope* 110(5 Pt 1):727-38 (2000).
104. Willott JF, Erway LC, Archer JR, *et al.*: Genetics of age-related hearing loss in mice. II. Strain differences and effects of caloric restriction on cochlear pathology and evoked response thresholds. *Hear Res* 88(1-2):143-55 (1995).
105. Dai P, Yang W, Jiang S, *et al.*: Correlation of cochlear blood supply with mitochondrial DNA common deletion in presbycusis. *Acta Otolaryngol* 124(2):130-6 (2004).
106. Fischel-Ghodsian N, Bykhovskaya Y, Taylor K, *et al.*: Temporal bone analysis of patients with presbycusis reveals high frequency of mitochondrial mutations. *Hear Res* 110(1-2):147-54 (1997).
107. Fischel-Ghodsian N: Mitochondrial deafness. *Ear Hear* 24(4):303-13 (2003).
108. Snoeckx R, Van Camp G: Nonsyndromic hearing loss: cracking the cochlear code. In: Martini A, Stephens D, Read A (Eds.) *Genes, Hearing and Deafness. From molecular biology to clinical practice.* Informa Healthcare Ltd, London, UK; 2007: pp: 63-78.
109. Kanzaki S, Beyer L, Karolyi IJ, *et al.*: Transgene correction maintains normal cochlear structure and function in 6-month-old Myo15a mutant mice. *Hear Res* 214(1-2):37-44 (2006).
110. Raphael Y, Kim YH, Osumi Y, *et al.*: Non-sensory cells in the deafened organ of Corti: approaches for repair. *Int J Dev Biol* 51(6-7):649-54 (2007).
111. Vlastarakos PV, Nikolopoulos TP, Tavoulari E, *et al.*: Novel approaches to treating sensorineural hearing loss. *Auditory genetics and necessary factors for stem cell transplant.* *Med Sci Monit* 14(8):RA114-25 (2008).