



ARTIGO ORIGINAL

## Prevalence of mitochondrial DNA mutations in sporadic patients with nonsyndromic sensorineural hearing loss<sup>☆</sup>

Hua Jiang, Jia Chen, Ying Li, Peng-Fang Lin, Jian-Guo He, Bei-Bei Yang\*

Departamento de Otorrinolaringologia, 2nd Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Zhejiang, China

Recebido em 29 de março de 2015; aceito em 6 de junho de 2015

### KEYWORDS

Mitochondria;  
rRNA;  
tRNA;  
Hearing loss

### Abstract

**Introduction:** Several mitochondrial DNA mutations have been reported to be associated with nonsyndromic hearing loss in several families. However, little is known about the prevalence of these mutations in sporadic patients with nonsyndromic sensorineural hearing loss.

**Objective:** The purpose of our study was to investigate the incidence of these mitochondrial DNA mutations in such population.

**Methods:** A total of 178 sporadic patients with nonsyndromic sensorineural hearing loss were enrolled in this study. Genomic DNA was extracted from the peripheral blood sample. We employed the SNaPshot<sup>®</sup> sequencing method to detect five mitochondrial DNA mutations, including A1555G and A827G in 12S rRNA gene and A7445G, 7472insC, and T7511C in tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> gene. Meanwhile, we used polymerase chain reaction and sequenced the products to screen GJB2 gene mutations in patients carrying mitochondrial DNA mutations.

**Results:** We failed to detect the presence of A1555G mutation in 12S rRNA gene, and of A7445G, 7472insC, T7511C mutations in tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> gene in our population. However, we found that 6 patients (3.37%) were carriers of a homozygous A827G mutation and one of them also carried homozygous GJB2 235delC mutation.

**Conclusion:** Our findings in the present study indicate that even in sporadic patients with nonsyndromic sensorineural hearing loss, mitochondrial DNA mutations might also contribute to the clinical phenotype.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2015.06.006>

\*Como citar este artigo: Jiang H, Chen J, Li Y, Lin P-F, He J-G, Yang B-B. Prevalence of mitochondrial DNA mutations in sporadic patients with nonsyndromic sensorineural hearing loss. Braz J Otorhinolaryngol. 2016;82:391-6.

\* Autor para correspondência.

E-mail: yangbb1959@sina.com (B.-B. Yang).

**PALAVRAS-CHAVE**

Mitocôndrias;  
rRNA;  
tRNA;  
Deficiência auditiva

## Prevalência de mutações no DNA mitocondrial em pacientes esporádicos com deficiência auditiva sensorineural não síndrômica

**Resumo**

**Introdução:** Diversas mutações do DNA mitocondrial tem sido descritas, em diferentes famílias, associadas à deficiência auditiva não síndrômica. No entanto, pouco se sabe sobre a prevalência dessas mutações em pacientes esporádicos com deficiência auditiva sensorineural não síndrômica.

**Objetivo:** A finalidade do nosso estudo foi investigar a incidência dessas mutações no DNA mitocondrial nessa população.

**Método:** No total, 178 pacientes esporádicos com deficiência auditiva sensorineural não síndrômica foram recrutados para participação no estudo. O DNA genômico foi extraído de amostra, de sangue periférico. Utilizamos o método de sequenciamento SNaPshot® para detecção de cinco mutações do DNA mitocondrial: A1555G e A827G no gene 12S rRNA e A7445G, 7472insC e T7511C no gene tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>. Paralelamente, utilizamos a reação de polimerase em cadeia e sequenciamos os produtos para triagem das mutações no gene GJB2 nos pacientes portadores de mutações no DNA mitocondrial.

**Resultados:** Em nossa população, não conseguimos detectar a presença da mutação A1555G no gene 12S rRNA e nem as mutações A7445G, 7472insC e T7511C no gene tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>. Entretanto, constatamos que seis pacientes (3,37%) eram portadores da mutação homocigota A827G; e um deles também portava a mutação homocigota GJB2 235delC.

**Conclusão:** Nossos achados no presente estudo indicam que, mesmo em pacientes esporádicos com deficiência auditiva sensorineural não síndrômica, as mutações do DNA mitocondrial também podem contribuir para o fenótipo clínico.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Introdução**

A deficiência auditiva sensorineural (DASN) é um dos transtornos congênitos mais comuns. Sua incidência é de aproximadamente 1/1.000 neonatos em todo o mundo.<sup>1-3</sup> Mais de metade desses casos tem causa genética, exibindo um padrão hereditário autossômico dominante, autossômico recessivo, ligado a X, ou mitocondrial.<sup>4,5</sup> Até a presente data, mais de 200 mutações pontuais no DNA mitocondrial (mtDNA) foram descritas no banco de dados MITOMAP<sup>6</sup> para tais mutações. Com elas, descobriu-se que várias mutações estavam associadas às deficiências auditiva síndrômica, não síndrômica e induzida por aminoglicosídeo, sobretudo aquelas nos genes 12S rRNA e tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>. A1555G, que se localiza no locus A altamente conservado do 12S rRNA mitocondrial, foi a primeira mutação a ser descrita em associação com DASN. Foi constatado que essa mutação era responsável, tanto pela deficiência auditiva induzida por aminoglicosídeo, como pela deficiência auditiva não síndrômica em diversas famílias no mundo.<sup>7-10</sup> Recentemente, descobriu-se que A827G, uma mutação homoplásmica no gene 12S rRNA do mtDNA, é responsável pela deficiência auditiva não sintomática em todos os membros ligados ao lado materno de uma família chinesa.<sup>11</sup> Também há relatos de que A827G esteja associada tanto à ototoxicidade por aminoglicosídeo como à deficiência auditiva não sintomática em indivíduos esporádicos.<sup>12,13</sup> Além do gene 12S rRNA, o gene mitocondrial tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> está também associado à DASN, e também com a surdez não síndrômica, pois foram identificadas várias mutações, inclusive A7445G,<sup>14,15</sup> 7472insC,<sup>16</sup> e T7511C.<sup>17,18</sup>

Apesar de as mutações do mtDNA estarem associadas em diversas famílias à DASN não síndrômica (conforme mencionado anteriormente), pouco se sabe sobre a incidência delas em pacientes esporádicos com DASN não síndrômica. Em nosso estudo anterior, nos concentramos nas mutações GJB2 e SLC26A4 em pacientes com deficiência auditiva não síndrômica autossômica recessiva (PANAR). Em consequência, verificamos que, embora os genes GJB2 e SLC26A4 sejam os mais comuns em casos de surdez, apenas pequena parte desses pacientes são portadores de mutações patogênicas homocigotas ou heterocigotas compostas.<sup>19</sup> Isso sugere que outros genes para surdez também podem contribuir para o fenótipo clínico. No presente estudo, empregamos um método rápido, o sequenciamento SNaPshot®, para triagem de 178 pacientes esporádicos com DASN não síndrômica, com o objetivo de estimar a prevalência das mutações do mtDNA nessa população. Além disso, para identificação do papel do gene GJB2 no fenótipo de surdez, fizemos a triagem desse gene nos pacientes portadores de mutações no mtDNA.

**Método****Pacientes e amostras**

No total, 178 pacientes esporádicos com DASN não síndrômica participaram da investigação. Esses indivíduos eram oriundos de diversas regiões de nossa província. Cada paciente passou por um exame físico cuidadoso e, em seguida, foi

**Tabela 1** Sequências de *primers* de RCP

Gene	<i>Primers</i> de RCP	Tamanho previsto
<i>12S rRNA</i>		
A1555G	F: 5'-GCATCAAGCACGCAGCAATG-3'	926 bp
A827G	R: 5'-TAGGTTTAGCTCAGAGCGGTCAAGTTA-3'	
<i>tRNA<sup>Ser(UCN)</sup></i>		
A7445G	F: 5'-CCCCCACCTACCACACATTC-3'	524 bp
7472insC T7511C	R: 5'-GGTGTACTCGTAGGTTTCAGTACCATTGG-3'	
<i>GJB2</i>		
Éxon 1	F: 5'-TGGGGAACCTCATGGGGGCTCAAAG-3' R: 5'-AGGTTCTGGCCGGCAGTCC-3'	425 bp
Éxon 2	F: 5'-TCAGAGAAGTCTCCCTGTTCTGTCC-3' R: 5'-TGAGGCCTACAGGGTTTCAA-3'	916 bp

**Tabela 2** Sequências de extensão de *primers*

Gene	Extensão de <i>primers</i>
<i>12S rRNA</i>	
A1555G	R: 5'-TTTTTTTTTTTTTAAACCCTACGCATTTATATAGAGGAG-3'
A827G	R: 5'-TTTTTTTTTTTCACGGGAAACAGCAGTGATTA-3'
<i>tRNA<sup>Ser(UCN)</sup></i>	
A7445G	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATTCGAAGAACCCTATACATAAAATCTAG-3'
7472insC	F: 5'-TTGAAGGAATCGAACCCCCA-3'
T7511C	F: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCATGGCCTCCATGACTT-3'

registrada uma história clínica detalhada. Pacientes com histórico de dominância familiar, de exposição a aminoglicosídeo e de deficiência auditiva sindrômica foram excluídos do estudo. Todos os participantes passaram por um teste audiométrico, consistindo em resposta auditiva do tronco cerebral (RAT), emissões otoacústicas (EOA) e timpanometria. O nível do comprometimento auditivo foi definido como normal (< 26 dB), leve (26-40 dB), moderado (41-70 dB), grave (71-90 dB) e profundo (> 90 dB). Obtivemos amostras de sangue periférico dos pacientes para isolamento do DNA genômico.

Obtivemos consentimento informado dos pacientes adultos e dos pais das crianças participantes. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local (nº de aprovação do Comitê de Ética: 2013-007).

### Sequenciamento com SNaPshot®

Uma mistura final para reação de RCP com 20 µl continha 1× GC Buffer I, 3,0 mM Mg<sup>2+</sup>; 0,3 mM dNTPs, 1U de HotStarTaq polimerase, 10 ng de *template* de DNA, e uma mistura de *primers* com 1 µM contendo dois pares de *primers* para amplificação de cinco regiões de mutação (tabela 1). As condições para RCP foram: 95°C × 2 min; 11 ciclos de 94°C × 20 s, 65°C-0,5°C por ciclo × 40 s, 72°C × 90 s; 24 ciclos de 94°C × 20 s, 59°C × 30 s, 72°C × 90 s; e 72°C × 2 min. Para a purificação dos produtos de RCP, 5U de fosfatase alcalina de

camarão (SAP) (Promega) e 2U de Exonuclease I (Epicentre) foram adicionados a 15 µl de produtos do RCP. A mistura foi incubada a 37°C × 60 min e, em seguida, incubada a 75°C × 15 min.

A extensão de base única (*single base extension*, SBE) foi realizada em uma mistura de reação final de 10 µl, contendo 5 µl de SNaPshot® *Multiplex Kit* (Applied Biosystems), 2 µl de produto de reação RCP multiplex purificado, e 0,8 µM de mistura de extensão de *primers* (tabela 2). O programa da reação consistiu em 96°C × 1min; 28 ciclos de 96°C × 10 s, 52°C × 5 s, 60°C × 30 s; 4°C permanentemente. Em seguida, os produtos de SBE foram purificados com o uso de SAP. Para análise das sequências, os produtos SBE multiplex purificados foram misturados com 0,5 µl de 120 LIZ® *dye Size Standard* (Applied Biosystems) e 9 µl de Hi-Di® (Applied Biosystems) e desnaturados a 95°C × 5 min. Em seguida, os produtos foram sequenciados pelo sequenciador ABI 3730xl DNA. Os dados foram analisados pelo software GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems).

### Detecção da mutação GJB2 pela reação de polimerase em cadeia

Dois éxons de GJB2 foram amplificados pela reação de polimerase em cadeia (PCR, *Polimerase chain reaction*). Os *primers* estão listados na tabela 1. A amplificação da RCP e subsequente purificação foram realizadas conforme descri-

**Tabela 3** Características clínicas e genéticas de seis pacientes portadores da mutação A827G no gene 12S rRNA do mtDNA

Paciente	Gênero	Idade do início (anos)	Nível de deficiência auditiva		A827G no gene 12S rRNA do mtDNA	Mutações em GJB2
			Orelha direita	Orelha esquerda		
#61	Homem	0	Profunda	Profunda	+ / +	235delC/235delC
#105	Mulher	0	Profunda	Profunda	+ / +	WT/WT
#131	Mulher	0	Profunda	Profunda	+ / +	WT/WT
#140	Mulher	0	Profunda	Profunda	+ / +	WT/WT
#197	Mulher	0	Profunda	Profunda	+ / +	WT/WT
#210	Homem	0	Profunda	Profunda	+ / +	WT/WT

ção anterior.<sup>19</sup> Os produtos purificados da PCR foram sequenciados com o uso do método de terminadores de cadeia (didesoxi) em um sequenciador ABI 3730xl DNA (Applied Biosystems) com o *kit* de sequenciamento de ciclos ABI Big-Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems), de acordo com os protocolos do fabricante. Os *primers* foram os mesmos utilizados para a amplificação por PCR.

## Resultados

As amostras em estudo foram compostas por 82 indivíduos do gênero masculino e 96 do gênero feminino. A idade dos participantes variou de nove meses até 37 anos, com uma média de idade de  $5,53 \pm 4,44$  anos. Os resultados dos testes audiométricos revelaram envolvimento coclear em todos os participantes e, além disso, todos sofriam de comprometimento auditivo sensorineural bilateral grave (71-90 dB) a profundo (> 90 dB)

Em nenhum dos 178 pacientes esporádicos com DASN não síndrômica foi possível detectar a presença das mutações A7445G, 7472insC e T7511C no gene tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>. Além disso, não detectamos a mutação A1555G no gene 12S rRNA nessa população. No entanto, a variante A827G no gene 12S rRNA foi observada em seis pacientes, e todos eram portadores de mutação homocigota. Para esclarecimento do papel do gene GJB2 na expressão fenotípica nos indivíduos com mutações do mtDNA, fizemos a triagem das mutações do gene GJB2 nos participantes portadores da mutação A827G. Em consequência, apenas um paciente era portador de mutação patogênica no gene GJB2, que apresentava homocigose para 235delC (tabela 3).

## Discussão

Quase todos os estudos previamente publicados se centraram na associação entre as mutações do mtDNA e a população com deficiência auditiva não síndrômica e/ou induzida por aminoglicosídeo.<sup>12,19</sup> Já foi identificado que várias mutações do mtDNA, por exemplo, A1555G e A827G no gene 12S rRNA, e A7445G, 7472insC e T7511C no gene tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, estão associadas a tais populações.<sup>10,13,14,19,20</sup> Mas, frequentemente, essas mutações não são suficientes para produzir o fenótipo clínico.<sup>14,19</sup> À semelhança de outros estudos, constatamos, em nosso estudo precedente, que, em pacientes com PANAR, cerca de 30-40% deles eram portadores de mutações patogê-

nicas nos genes mais comuns para surdez, mas praticamente 40% eram portadores de mutação heterocigota. Assim, outras mutações gênicas podem, no conjunto, contribuir para o fenótipo. Embora uma associação entre mutações do mtDNA e deficiência auditiva não síndrômica tenha sido identificada em várias famílias, pouco se sabe sobre a prevalência das mutações de mtDNA em pacientes esporádicos com DASN não síndrômica.

Mutações no DNA mitocondrial em genes do tRNA podem causar modificação no tRNA e falhas no seu metabolismo; com isso, a síntese proteica fica comprometida e ocorre redução da síntese do ATP - eventos considerados como os principais fatores patogênicos.<sup>21-25</sup> A mutação A7445G foi originalmente identificada em uma família com surdez não síndrômica.<sup>26</sup> Essa mutação acarreta o defeito de processamento endonucleolítico do terminal 3' na fita L do precursor policistrônico de RNA.<sup>27</sup> Em consequência, a mutação A7445G pode causar uma redução superior a 50% no nível de tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> e decréscimo na síntese de proteína, desempenhando papel determinante no fenótipo respiratório das linhagens de células mutantes.<sup>28,29</sup> A mutação 7472insC foi originalmente descrita por Tiranti et al., sendo provável ela que altere a estrutura da alça T (psi) C na estrutura secundária de folha de trevo de tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>; além disso, ficou comprovado que essa mutação prejudica o processamento de tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, tanto no terminal 5' como no terminal 3', e causa uma queda no nível de equilíbrio de tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>.<sup>16,24,30</sup> Foi determinado que a mutação T7511C está associada à deficiência auditiva não síndrômica em várias famílias de diferentes etnias.<sup>17,18,31</sup> Essa mutação pode afetar o processamento da fita L do precursor de RNA, abrangendo tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> e ND6 mRNA, especificamente, no terminal 5' do tRNA.<sup>23,32</sup> Como resultado, a mutação T7511C provoca redução no nível do gene tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, com comprometimento na síntese proteica mitocondrial.<sup>22,28</sup> Embora tenha sido observado que essas mutações no gene tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> estão associadas a pacientes com deficiência auditiva não síndrômica e/ou induzida por aminoglicosídeo, muitos estudos não conseguiram detectar tais mutações nessas populações. Xing et al. analisaram a caracterização molecular de uma família chinesa com deficiência auditiva induzida por aminoglicosídeo e não síndrômica, mas não detectaram as mutações A7445G, 7472insC e T7511C no gene tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>.<sup>33</sup> Em uma família argentina com deficiência auditiva induzida por aminoglicosídeo, essas mutações também não foram detectadas.<sup>34</sup> Ademais, Li et al. realizaram uma análise molecular em 164 caucasianos sem vínculo de parentesco com deficiência auditiva não síndrômica, e não

conseguiram detectar a presença das mutações A7445G, 7472insC e T7511C no gene tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>.<sup>12</sup> Abreu-Silva et al. também não detectaram essas mutações em 203 pacientes brasileiros não selecionados com deficiência auditiva.<sup>35</sup> Até a presente data, pouco se sabe sobre a incidência dessas mutações no gene tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> em pacientes esporádicos portadores de DASN não síndrômica. No presente estudo, exploramos essas mutações em tal população, mas não foi possível detectar portadores das mutações no gene tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>.

A mutação A1555G gera um par específico de bases GC, o que faz com que a estrutura secundária do 12S rRNA se assemelhe mais de perto com a região correspondente do 16S rRNA de *E. coli* e ligue aminoglicosídeos com grande afinidade.<sup>36</sup> Portanto, os pacientes portadores dessa mutação podem se apresentar com DASN em seguida ao uso de aminoglicosídeos.<sup>13</sup> Entretanto, estudos já publicados identificaram que a mutação A1555G no 12S rRNA está também associada à deficiência auditiva não síndrômica,<sup>9,10</sup> embora sua incidência em indivíduos com essa deficiência seja muito menor do que em casos de deficiência auditiva por aminoglicosídeo. Lu et al. informaram que as incidências da mutação A1555G foram, respectivamente, 1,43 e 10,41%, em uma população pediátrica chinesa com deficiência auditiva não síndrômica e induzida por aminoglicosídeo.<sup>19</sup> Nessa mesma linha, Rydzanicz et al. observaram incidências de 5,5 e 1,6%, respectivamente, nas coortes com deficiência auditiva induzida por aminoglicosídeo ou não síndrômica em uma população polonesa.<sup>37</sup> Em uma população pediátrica caucasiana com deficiência auditiva não síndrômica, a frequência da mutação A1555G foi de 0,6%.<sup>12</sup> Neste estudo, verificamos que nenhum dos participantes era portador da mutação A1555G. Em comparação com relatos anteriores, a incidência dessa mutação em nossa população com DASN não síndrômica é relativamente mais baixa.

A mutação A827G, assim como a A1555G, localiza-se no sítio A do gene 12S rRNA mitocondrial que, em termos evolucionários, é altamente conservado em diferentes espécies.<sup>34</sup> É possível que a alteração da estrutura terciária ou quaternária do 12S rRNA pela mutação A827G possa levar à disfunção mitocondrial e, com isso, a mutação desempenharia um papel na patogênese da deficiência auditiva.<sup>11,34</sup> A patogênese dessa mutação foi identificada em uma família chinesa com deficiência auditiva não síndrômica.<sup>11</sup> Embora a mutação A827G também tenha sido detectada em controles com audição normal,<sup>19</sup> um número maior de estudos a consideram uma mutação patogênica, dependendo da localização e da ausência nos controles nesses estudos.<sup>11-13,34,37</sup> Por outro lado, eles também detectaram uma penetrância incompleta da mutação A827G, sugerindo que apenas a presença da mutação não é suficiente para produzir o fenótipo clínico,<sup>11,34</sup> e que, portanto, alguns indivíduos com audição normal e portadores da mutação A827G podem ter seu quadro atribuído à penetrância incompleta. Em nosso estudo, constatamos que 3,37% (6/178) dos pacientes são portadores da mutação A827G homocigota. Em outra população pediátrica esporádica chinesa com deficiência auditiva não síndrômica, a incidência foi de 4,41%.<sup>13</sup> A incidência da mutação A827G nessa população chinesa parece ser mais alta do que em outros grupos étnicos.<sup>11,37</sup> Como demonstraram estudos anteriores - que a expressão do fenótipo clínico de mutações homoplásmicas associadas à surdez no gene 12S rRNA depende da contribuição de fatores moduladores, como, por exem-

plo, aminoglicosídeos ou genes nucleares modificadores, e que o gene GJB2 é um potencial candidato de gene modificador -,<sup>12,38-40</sup> realizamos uma triagem mutacional do gene GJB2 nos pacientes portadores da mutação A827G. Como resultado, apenas um paciente era portador tanto da mutação A827G do gene 12S rRNA, como da mutação 235delC homocigota do gene GJB2. A inexistência da mutação no gene GJB2 em alguns indivíduos sugere que outros genes modificadores nucleares e outros fatores ambientais podem contribuir para o fenótipo clínico nesses pacientes.

## Conclusão

No presente estudo, realizamos a triagem de mutações de mtDNA em pacientes esporádicos com DASN não síndrômica e encontramos um total de seis (3,37%) portadores de mutações homocigotas de mtDNA. Nossos achados sugerem que pacientes esporádicos com DASN não síndrômica também são portadores de mutações de mtDNA, e que essas mutações podem contribuir para o fenótipo clínico. Novos estudos envolvendo a triagem das mutações no mtDNA seriam de grande utilidade para melhor compreensão da prevalência e do papel das mutações de mtDNA em pacientes esporádicos com DASN não síndrômica.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Agradecimentos

Esse estudo foi financiado por bolsas do Departamento de Saúde Pública (nº 2011ZDA012) e pelo Departamento de Ciência e Tecnologia (nº 2014C37036).

## Referências

1. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;630:16-31.
2. Wang QJ, Zhao YL, Rao SQ, Guo YF, He Y, Lan L, et al. Newborn hearing concurrent gene screening can improve care for hearing loss: a study on 14,913 Chinese newborns. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011;75:535-42.
3. Dai P, Liu X, Yu F, Zhu Q, Yuan Y, Yang S, et al. Molecular etiology of patients with nonsyndromic hearing loss from deaf-mute schools in 18 provinces of China. *Zhonghua Er Ke Xue Za Zhi.* 2006;4:1-5.
4. Bayazit YA, Yilmaz M. An overview of hereditary hearing loss. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2006;68:57-63.
5. Morton CC. Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. *Hum Mol Genet.* 2002;11:1229-40.
6. *The mitochondrial DNA mutation database.* <http://www.mitomap.org/> [acessado em 20 de julho de 2014].
7. Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Bu X, Oztas S. Mitochondrial ribosomal RNA gene mutation in a patient with sporadic aminoglycoside ototoxicity. *Am J Otolaryngol.* 1993;14:399-403.
8. Pandya A, Xia X, Radnaabazar J, Batsuuri J, Dangaansuren B, Fischel-Ghodsian N, et al. Mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in two families from Mongolia with matrilineal aminoglycoside ototoxicity. *J Med Genet.* 1997;34:169-72.

9. del Castillo FJ, Rodríguez-Ballesteros M, Martín Y, Arellano B, Gallo-Terán J, Morales-Angulo C, et al. Heteroplasmy for the 1555A>G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in six Spanish families with non-syndromic hearing loss. *J Med Genet.* 2003;40:632-6.
10. Lu J, Qian Y, Li Z, Yang A, Zhu Y, Li R, et al. Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the deafness-associated 12S rRNA 1555A>G mutation. *Mitochondrion.* 2010;10:69-81.
11. Xing G, Chen Z, Wei Q, Tian H, Li X, Zhou A, et al. Maternally inherited non-syndromic hearing loss associated with mitochondrial 12S rRNA A827G mutation in a Chinese family. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344:1253-7.
12. Li R, Greinwald JH Jr, Yang L, Choo DI, Wenstrup RJ, Guan MX. Molecular analysis of the mitochondrial 12S rRNA and tRNA<sup>Ser</sup>(UCN) genes in paediatric subjects with non-syndromic hearing loss. *J Med Genet.* 2004;41:615-20.
13. Li Z, Li R, Chen J, Liao Z, Zhu Y, Qian Y, et al. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Hum Genet.* 2005;117:9-15.
14. Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Fournier P, Stewart IA, Maw M. Mitochondrial mutation associated with nonsyndromic deafness. *Am J Otolaryngol.* 1995;16:403-8.
15. Hutchin TP, Lench NJ, Arbuzova S, Markham AF, Mueller RF. Maternally inherited hearing impairment in a family with the mitochondrial DNA A7445G mutation. *Eur J Hum Genet.* 2001;9:56-8.
16. Tiranti V, Chariot P, Carella F, Toscano A, Soliveri P, Girlanda P, et al. Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNA<sup>Ser</sup>(UCN) gene. *Hum Mol Genet.* 1995;4:1421-7.
17. Sue CM, Tanji K, Hadjigeorgiou G, Andreu AL, Nishino I, Krishna S, et al. Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA<sup>Ser</sup>(UCN) gene. *Neurology.* 1999;52:1905-8.
18. Ishikawa K, Tamagawa Y, Takahashi K, Kimura H, Kusakari J, Hara A, et al. Nonsyndromic hearing loss caused by a mitochondrial T7511C mutation. *Laryngoscope.* 2002;112:1494-9.
19. Lu J, Li Z, Zhu Y, Yang A, Li R, Zheng J, et al. Mitochondrial 12S rRNA variants in 1642 Han Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss. *Mitochondrion.* 2010;10:380-90.
20. Ding Y, Leng J, Fan F, Xia B, Xu P. The role of mitochondrial DNA mutations in hearing loss. *Biochem Genet.* 2013;51:588-602.
21. McKenzie M, Liolitsa D, Hanna MG. Mitochondrial disease: mutations and mechanisms. *Neurochem Res.* 2004;29:589-600.
22. Li X, Fischel-Ghodsian N, Schwartz F, Yan Q, Friedman RA, Guan MX. Biochemical characterization of the mitochondrial tRNA<sup>Ser</sup>(UCN) T7511C mutation associated with nonsyndromic deafness. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:867-77.
23. Li X, Zhang LS, Fischel-Ghodsian N, Guan MX. Biochemical characterization of the deafness-associated mitochondrial tRNA<sup>Ser</sup>(UCN) A7445G mutation in osteosarcoma cell cybrids. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328:491-8.
24. Toompuu M, Levinger LL, Nadal A, Gomez J, Jacobs HT. The 7472 insC mtDNA mutation impairs 5' and 3' processing of tRNA<sup>Ser</sup>(UCN). *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;322:803-13.
25. Tang X, Li R, Zheng J, Cai Q, Zhang T, Gong S, et al. Maternally inherited hearing loss is associated with the novel mitochondrial tRNA<sup>Ser</sup>(UCN) 7505T>C mutation in a Han Chinese family. *Mol Genet Metab.* 2010;100:57-64.
26. Reid FM, Vernham GA, Jacobs HT. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Hum Mutat.* 1994;3:243-7.
27. Levinger L, Jacobs O, James M. In vitro 3'-end endonucleolytic processing defect in a human mitochondrial tRNA<sup>Ser</sup>(UCN) precursor with the U7445C substitution, which causes non-syndromic deafness. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:4334-40.
28. Guan MX, Enriquez JA, Fischel-Ghodsian N, Puranam RS, Lin CP, Maw MA, et al. The deafness-associated mitochondrial DNA mutation at position 7445, which affects tRNA<sup>Ser</sup>(UCN) precursor processing, has long-range effects on NADH dehydrogenase subunit ND6 gene expression. *Mol Cell Biol.* 1998;18:5868-79.
29. Reid FM, Rovio A, Holt IJ, Jacobs HT. Molecular phenotype of a human lymphoblastoid cell-line homoplasmic for the np 7445 deafness-associated mitochondrial mutation. *Hum Mol Genet.* 1997;6:443-9.
30. Toompuu M, Tiranti V, Zeviani M, Jacobs HT. Molecular phenotype of the np 7472 deafness-associated mitochondrial mutation in osteosarcoma cell cybrids. *Hum Mol Genet.* 1999;8:2275-83.
31. Chapiro E, Feldmann D, Denoyelle F, Sternberg D, Jardel C, Eliot MM, et al. Two large French pedigrees with non syndromic sensorineural deafness and the mitochondrial DNA T7511C mutation: evidence for a modulatory factor. *Eur J Hum Genet.* 2002;10:851-6.
32. Puranam RS, Attardi G. The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. *Mol Cell Biol.* 2001;21:548-61.
33. Xing G, Chen Z, Wei Q, Tian H, Li X, Zhou A, et al. Mitochondrial 12S rRNA A827G mutation is involved in the genetic susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346:1131-5.
34. Chaig MR, Zernotti ME, Soria NW, Romero OF, Romero MF, Gegez NM. A mutation in mitochondrial 12S rRNA, A827G, in Argentinean family with hearing loss after aminoglycoside treatment. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;368:631-6.
35. Abreu-Silva RS, Lezirovitz K, Braga MC, Spinelli M, Pirana S, Della-Rosa VA, et al. Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNA<sup>Ser</sup>(UCN) mitochondrial mutations in hearing-impaired Brazilian patients. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39:219-26.
36. Hamasaki K, Rando RR. Specific binding of aminoglycosides to a human rRNA construct based on a DNA polymorphism which causes aminoglycoside-induced deafness. *Biochemistry.* 1997;36:12323-8.
37. Rydzanicz M, Wróbel M, Pollak A, Gawecki W, Brauze D, Kostrzewska-Poczekaj M, et al. Mutation analysis of mitochondrial 12S rRNA gene in Polish patients with non-syndromic and aminoglycoside-induced hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;395:116-21.
38. Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet.* 1993;4:289-94.
39. Li R, Xing G, Yan M, Cao X, Liu XZ, Bu X, et al. Cosegregation of C-insertion at position 961 with the A1555G mutation of the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family with maternally inherited hearing loss. *Am J Med Genet A.* 2004;124A:113-7.
40. Friedman TB, Griffith AJ. Human nonsyndromic sensorineural deafness. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2003;4:341-402.