



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Magali Aparecida Orate Menezes da Silva

Abordagem Molecular da Neuropatia Auditiva

São José do Rio Preto
2015

Magali Aparecida Orate Menezes da Silva

Abordagem Molecular da Neuropatia Auditiva

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de São José do Rio Preto para obtenção do
Título de Doutor no Curso de Pós-graduação
em Ciências da Saúde, Eixo Temático:
Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. José Victor Maniglia

Coorientador(a): Profa. Dra. Vânia Belintani Piatto

São José do Rio Preto

2015

Silva, Magali Aparecida Menezes

Abordagem molecular da Neuropatia Auditiva./ Magali Aparecida Menezes da Silva.

São José do Rio Preto, 2015

79 p.

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. José Victor Maniglia

Coorientadora: Profa. Dra. Vânia Belintani Piatto

1. Deficiência Auditiva; 2. Células Ciliadas Auditivas; 3. Nervo Coclear

Magali Aparecida Orate Menezes da Silva

Abordagem Molecular da Neuropatia Auditiva

Banca Examinadora

Tese para Obtenção do Grau de Doutor

Presidente e Orientador: Prof. Dr. José Victor Maniglia

2º Examinador: Jair Cortez Montovani

3º Examinador: Daniela Polo Camargo da Silva

4º Examinador: Érika Cristina Pavarino

5º Examinador: Marta Alves da Silva Arroyo

Suplentes: Cinara de Cassia Brandão de Mattos

Ana Regina Chinelato Fernandes

São José do Rio Preto, 02/07/2015

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimento Especial.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Epígrafe.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Quadros e Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	x
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações Gerais.....	2
1.2 Deficiências Auditivas Hereditárias Não-Sindrômicas.....	3
1.2.1. Histofisiologia Coclear e Expressão Gênica.....	4
1.3 Nomenclatura.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1 Neuropatia auditiva e gene <i>OTOF</i>	12
2.1.1 Fisiopatologia da Neuropatia Auditiva.....	13
2.1.2 Genética Molecular da Neuropatia Auditiva.....	15
3 OBJETIVOS.....	24
4 CASUÍSTICA E MÉTODO.....	26
4.1 Investigação Oto-audiológica.....	28
4.2 Investigação molecular.....	31
4.2.1 Extração de <i>DNA</i> genômico.....	31

4.2.2	Investigação das mutações no gene <i>OTOF</i>	32
4.2.2.1	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>PCR</i>).....	32
4.2.2.2	Análise de restrição (Técnica da <i>RFLP</i>) dos fragmentos...	36
4.3	Análise Estatística.....	39
5	RESULTADOS.....	40
5.1	Extração do <i>DNA</i> genômico.....	42
5.2	Técnica da <i>PCR</i>	43
5.3	Técnica da <i>RFLP</i> (Digestão Enzimática) de cada fragmento amplificado do gene <i>OTOF</i>	46
6	DISCUSSÃO.....	56
7	CONCLUSÕES.....	66
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
	ANEXOS.....	78

Aos **pacientes** e familiares que sem o consentimento e cooperação este estudo não seria possível. Esta contribuição é extremamente importante para permitir a continuidade das pesquisas científicas a fim de proporcionar um futuro melhor.

**"Teu Pai, que vê em segredo,
te recompensará..."**

(Mateus 6:4)

Ao meu orientador **Prof. Dr. José Victor Maniglia**, agradeço o carinho, o apoio, a dedicação e, principalmente, a confiança em mim e em meu trabalho!

“O Senhor te guiará continuamente...

e serás como um jardim regado...”

(Isaías 58:11)

- ✓ Aos meus pais queridos **Oreste** e **Nair**, pelo exemplo de amor, trabalho e confiança com que me ensinaram a caminhar pela vida.
- ✓ Às minhas filhas amadas **Mariana** e **Gabriela**, meus maiores estímulos, assim como pelos momentos em que estive ausente delas.
- ✓ Ao meu amado esposo **Adinaldo** (*in memoriam*) meu grande companheiro que sempre me incentivou e apoiou em todos os momentos e, mesmo agora, sei que continua estimulando e caminhando comigo, meu eterno amor e admiração.
- ✓ À **minha família** pela confiança e carinho de sempre.
- ✓ À minha coorientadora **Profa. Dra. Vânia Belintani Piatto** pela paciência, dedicação, assim como pelos preciosos ensinamentos essenciais para a realização deste estudo, minha eterna gratidão e admiração.
- ✓ À **Faculdade de Medicina** e ao **Hospital de Base de São José do Rio Preto**, nas pessoas de seus diretores, pela oportunidade que tive para a realização deste trabalho.
- ✓ À **Pós-Graduação** da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, na pessoa de seu coordenador e demais colaboradores.

- ✓ Aos **pacientes** e familiares que por meio do consentimento e cooperação possibilitaram a execução deste estudo.
- ✓ Aos **funcionários da biblioteca** da FAMERP, pela boa vontade no auxílio às pesquisas bibliográficas.
- ✓ Às **amigas do Serviço de Fonoaudiologia** do Hospital de Base de São José do Rio Preto pelo apoio recebido.
- ✓ Aos **meus amigos** pelo incentivo e estímulo.
- ✓ À **todas as pessoas** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta investigação.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

“Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove”

Cora Coralina

Figura 1.	Esquema modificado da célula sensorial auditiva. Os estereocílios associam-se por meio de ligações em suas extremidades ("tip links"). A. Os dois estereocílios não sofreram deslocamento (deflexão): o poro está fechado. B. Um deslocamento (deflexão) abre o poro: íons K^+ e Ca^{++} podem entrar na célula.....	5
Figura 2.	Esquema modificado de estereocílio no pólo apical de uma célula sensorial auditiva: abertura do canal de transdução pela tensão do nó apical. A. Esquema geral. B. Arquitetura molecular.....	6
Figura 3.	Esquema modificado do arranjo dos estereocílios no pólo apical de uma célula sensorial auditiva.....	7
Figura 4.	Esquema modificado de um canal iônico: abertura controlada pela tensão. Uma molécula transmembrana delimita um canal hidrófilo. O canal possui um diâmetro muito reduzido em um único ponto, "o filtro cônico" seletivo.....	8
Figura 5.	Esquema modificado de canal iônico de uma célula sensorial auditiva, em específico. Abertura controlada pela tensão do nó apical ("tip link") - "gating-spring model" (teoria do portão em mola).....	8
Figura 6.	Esquema modificado do cromossomo 2 humano com a localização do gene <i>OTOF</i> assinalada - 2p23-p22, que codifica a proteína otoferlina...	16
Figura 7.	Figura modificada das células ciliadas cocleares - interna (CCI) e externa (CCE), mostrando a localização basolateral da proteína otoferlina na CCI e sua relação com os canais de Ca^{+2}	17

- Figura 8.** Figura modificada das proteínas da família de genes de mamíferos relacionadas ao gene *Caernohabditis elegans factor FER-1*. A isoforma longa da otoferlina possui seis domínios C2 e a curta, três domínios C2. Os domínios identificados com asterisco são os que se ligam ao Ca^{+2} 18
- Figura 9.** Estrutura genômica do gene *OTOF*. Os exons em azul (1-19) são exclusivos das isoformas longas..... 18
- Figura 10.** Fotografia do *DNA* genômico das amostras identificadas de 1 a 12, em gel de agarose 1%. M- marcador 100 pb (Ladder®)..... 43
- Figura 11.** Fotografia do produto da PCR - fragmento de 258 pb amplificado do exon 18 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 8 - amostras do estudo. M- marcador 100 pb (Ladder®)..... 43
- Figura 12.** Fotografia do produto da PCR - fragmento de 490 pb amplificado do intron 8 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 6 - amostras do estudo. M- marcador 100 pb (Ladder®)..... 44
- Figura 13.** Fotografia do produto da PCR - fragmento de 390 pb amplificado do exon 22 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 7 - amostras do estudo. M- marcador 100 pb (Ladder®)..... 44
- Figura 14.** Fotografia do produto da PCR - fragmento de 322 pb amplificado do exon 44 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 7 - amostras do estudo. M- marcador 100 pb (Ladder®)..... 45
- Figura 15.** Fotografia do produto da PCR - fragmento de 307 pb amplificado do exon 26 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 4 - amostras do estudo. M - marcador 100 pb (Ladder®)..... 45

- Figura 16.** Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmento de 258 pb do exon 18 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 10 – genótipos das amostras do estudo: TT (homozigoto selvagem). M- marcador 100 pb (Ladder®)..... 46
- Figura 17.** Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmentos de 490, 341 e 149 pb do intron 8 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 e 4 – genótipos das amostras do estudo: AA (homozigoto selvagem). Colunas 2, 3, 5 e 6 – genótipos das amostras do estudo: AG (heterozigoto). M- marcador 100 pb (Ladder®)..... 47
- Figura 18.** Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmento de 390 pb do exon 22 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 4 - genótipos das amostras do estudo: CC (homozigoto selvagem). M- marcador 100 pb (Ladder®)..... 47
- Figura 19.** Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmentos de 322, 213 e 109 pb do exon 44 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1, 2, 5, 6 e 7 – genótipos das amostras do estudo: CG (heterozigoto). Colunas 3, 4 8, 9 e 10 – genótipos das amostras do estudo: CC (homozigoto selvagem). M-marcador 100 pb (Ladder®)..... 48
- Figura 20.** Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmento de 307 pb do exon 26 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 4 – genótipos das amostras do estudo: TT (homozigoto selvagem). M - marcador 100 pb (Ladder®)..... 48

Lista de Quadros e Tabelas

Tabela 1.	Síntese da Classificação da Deficiência Auditiva segundo a Organização Mundial de Saúde.....	30
Quadro 1.	Sequência dos <i>primers</i> para <i>PCR</i> do exon 18 do gene <i>OTOF</i>	32
Quadro 2.	Sequência dos <i>primers</i> para <i>PCR</i> do intron 8 do gene <i>OTOF</i>	33
Quadro 3.	Sequência dos <i>primers</i> para <i>PCR</i> do exon 22 do gene <i>OTOF</i>	33
Quadro 4.	Sequência dos <i>primers</i> para <i>PCR</i> do exon 44 do gene <i>OTOF</i>	34
Quadro 5.	Sequência dos <i>primers</i> para <i>PCR</i> do exon 26 do gene <i>OTOF</i>	35
Tabela 2.	Distribuição das variáveis demográficas dos casos índice do Grupo NPT, pacientes do Grupo DASN e indivíduos do Grupo Controle.....	42
Tabela 3.	Distribuição, em porcentagens, dos genótipos encontrados nos três grupos avaliados para as cinco mutações no gene <i>OTOF</i>	49
Tabela 4.	Apresentação dos genótipos encontrados nos casos índice do Grupo NPT dentre as cinco mutações analisadas no gene <i>OTOF</i>	51
Tabela 5.	Relação genotípica entre casos índice do Grupo NPT e Grupo DASN, respectivamente, para as mutações no Intron 8 e Exon 44 do gene <i>OTOF</i> .	52
Tabela 6.	Relação genotípica entre casos índice do Grupo NPT e Grupo Controle (GC), respectivamente, para as mutações no Intron 8 e Exon 44 do gene <i>OTOF</i>	53
Tabela 7.	Apresentação do grau de perda auditiva e os genótipos encontrados no Intron 8 e Exon 44 do gene <i>OTOF</i> , nos casos índice do Grupo NPT.....	54
Tabela 8.	Distribuição, em porcentagens, dos graus de perda auditiva em relação à presença ou ausência de mutação no gene <i>OTOF</i> , nos casos índice do Grupo NPT.....	55

Lista de Abreviaturas e Siglas

<i>μg</i>	- Micrograma
<i>μL</i>	- Microlitros
<i>A</i>	- Adenina
<i>Ala</i>	- Alanine
<i>Arg</i>	- Arginine
<i>Bfal</i>	- <i>Bacteroides fragilis I</i>
<i>BGIII</i>	- <i>Bacillus globigii II</i>
<i>C</i>	- Citosina
<i>Ca⁺⁺</i>	- Cálcio
<i>CCE</i>	- Células Ciliadas Externas
<i>CCI</i>	- Células Ciliadas Internas
<i>DASN</i>	- Deficiência Auditiva Sensorioneural
<i>dATP</i>	- Desoxinucleotídeo Trifosfato Adenina
<i>dB</i>	- Decibel
<i>dCTP</i>	- Desoxinucleotídeo Trifosfato Citosina
<i>DdeI</i>	- <i>Desulfovibrio desulfuricans I</i>
<i>del</i>	- Deleção
<i>DFN</i>	- Deafness
<i>DFNA</i>	- Deafness, Autosomal Recessive A
<i>DFNB</i>	- Deafness, Autosomal Recessive B
<i>DFNB9</i>	- Deafness, Autosomal Recessive 9
<i>dGTP</i>	- Desoxinucleotídeo Trifosfato Guanina
<i>DIAPH1</i>	- Diaphanous, Drosophila, Homolog Of, 1
<i>DNA</i>	- Ácido Desoxirribonucleico

<i>dNTPs</i>	- Desoxinucleotídeos Trifosfato
<i>DP</i>	- Desvio Padrão
<i>DYSF</i>	- Dysferlin
<i>EDTA</i>	- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
<i>EOAs</i>	- Emissões Otoacústicas Evocadas
<i>EX18</i>	- Exon 18
<i>F</i>	- Forward
<i>Faul</i>	- <i>Flavobacterium aquaticum</i>
<i>FER-1</i>	- Caenorhabditis Elegans Ferlin 1
<i>G</i>	- Guanina
<i>GC</i>	- Grupo Controle
<i>GJB2</i>	- Gap Junction Protein, Beta-2
<i>GJB6</i>	- Gap Junction Protein, Beta-6
<i>GLN</i>	- Glutamine
<i>Hz</i>	- Hertz
<i>Ile</i>	- Isoleucine
<i>IVS</i>	- Intervening Sequences or Intron
<i>K⁺</i>	- Potássio
<i>KCl</i>	- Cloreto de Potássio
<i>KCNE1</i>	- Potassium Channel, Voltage-Gated, Isk-Related Subfamily, Member 1
<i>KCNQ4</i>	- Potassium Channel, Voltage-Gated, Subfamily Q, Member 4
<i>KVLQT1</i>	- Potassium Channel, Voltage-Gated, Kqt-Like Subfamily, Member 1
<i>Leu</i>	- Leucine
<i>M</i>	- Média
<i>MC</i>	- Microfonismo Coclear
<i>MgCl2</i>	- Cloreto De Magnésio

<i>ml</i>	- Mililitros
<i>ms</i>	- Milissegundos
<i>MspI</i>	- <i>Moraxella species I</i>
<i>MYO15</i>	- Myosin, Unconventional, Family XV
<i>MYO6</i>	- Myosin, Unconventional, Family VII
<i>MYO7A</i>	- Myosin, Unconventional, Family VII, Member A
<i>MYOF</i>	- Myoferlin
<i>NCBI</i>	- National Center for Biotechnology Information
<i>ng</i>	- Nanogramas
<i>NPT</i>	- Neuropatia
<i>OMS</i>	- Organização Mundial de Saúde
<i>ORL</i>	- Otorrinolaringologia
<i>OTOF</i>	- Otoferlin
<i>pb</i>	- Pares de Bases
<i>PCR</i>	- Polimerase Chain Reaction = Reação em Cadeia da Polimerase
<i>PEATE</i>	- Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico
<i>pmoles</i>	- Picomoles
<i>PRO</i>	- Proline
<i>R</i>	- Reverse
<i>RFLP</i>	- Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição)
<i>Taq DNA polimerase</i>	- Enzima Polimerase do DNA <i>Thermus Quaticus</i>
<i>T</i>	- Tiamina
<i>TBE</i>	- Tris-Borato-Edta
<i>Thr</i>	- Treonine

<i>TM</i>	- Transmembrana
<i>Tris-HCl</i>	- Tris-Ácido Clorídrico
<i>Tyr</i>	- Tyrosine
<i>U</i>	- Unidade
<i>UTI</i>	- Unidade de Tratamento Intensivo

Introdução: Mutações no gene da otoferlina (OTOF) são responsáveis pela Neuropatia Auditiva. **Objetivo:** Investigar a prevalência de mutações no gene OTOF em pacientes com e sem Neuropatia Auditiva. **Casuística e Método:** Estudo original em corte transversal no qual foram avaliados 16 casos índice com Neuropatia Auditiva, 13 pacientes com deficiência auditiva sensorineural (DASN) e 20 indivíduos ouvintes. DNA foi extraído de leucócitos do sangue periférico e regiões do gene OTOF foram analisadas pela técnica *PCR-RFLP*. **Resultados:** Dos 16 casos índice, 9 (56%) são do gênero feminino e 7 (44%) do masculino. Dos 13 pacientes com DASN, 7 (54%) são masculinos e 6 (46%) femininos. Dos 20 ouvintes, 13 (65%) são masculinos e 7 (35%) femininos. Treze (81%) casos índice apresentam o genótipo selvagem (AA) e 3 (19%), o genótipo heterozigoto AG para a mutação IVS8-2A-G (intron 8). A mutação 5473C-G (exon 44) foi encontrada em heterozigose (CG) em 7 (44%) dos casos índice e 9 (56%) apresentam o genótipo selvagem (CC). Destes mutantes, dois (25%) são heterozigotos compostos para as mutações encontradas no intron 8 e exon 44. Os pacientes com DASN e os ouvintes não apresentam mutações (100%). **Conclusão:** Existem diferenças, ao nível molecular, em pacientes com e sem Neuropatia Auditiva.

Palavras-chave: 1. Deficiência Auditiva; 2. Células Ciliadas Auditivas; 3. Nervo Coclear

Introduction: Mutations in the otoferlin gene (OTOF) can account for Auditory Neuropathy. **Objective:** To investigate the prevalence of mutations in OTOF gene in patients with and without Auditory Neuropathy. **Casuistic and Methods:** This original cross-sectional study evaluated 16 index cases with auditory neuropathy; 13 patients with sensorineural hearing loss and 20 normal-hearing subjects. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes, and the *OTOF* gene sites were amplified by *PCR-RFLP*. **Results:** Out of the 16 index cases, 9 (56%) are female and 7 (44%) are male. Out of the 13 deaf patients, 7 (54%) are male and 6 (46%) female. Among the 20 listeners, 13 (65%) are male and 7 (35%) female. Thirteen (81%) index cases had wild-type genotype (AA) and 3 (19%), had the heterozygous AG genotype for IVS8-2A-G (intron 8) mutation. The 5473C-G (exon 44) mutation was found in a heterozygous state (CG) in 7 (44%) index cases and 9 (56%) had the wild-type allele (CC). Of these mutants, two (25%) are compound heterozygote for the mutations found in intron 8 and exon 44. All patients (100%) with hearing loss and listeners do not have mutations. **Conclusion:** Differences at the molecular level are found in patients with and without Auditory Neuropathy.

Key-words: 1. Hair Cells, Auditory 2. Hearing loss; 3. Cochlear Nerve

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

A reação aos sons é o primeiro sinal na criança de que ela está com sua capacidade auditiva preservada. Devido a demora na fala, a ausência de reação aos sons ou algum outro distúrbio os pais são os primeiros a suspeitar da deficiência auditiva em cerca de 60% dos casos o que difere, significativamente, dos 32% encontrados pelos profissionais. Nos países desenvolvidos, sabe-se que de cada 750 nascimentos, uma criança tem a possibilidade de apresentar deficiência auditiva do tipo sensorineural. E, estima-se que, uma em cada 1000 crianças seja afetada por deficiência auditiva grave ao nascer ou até o término do período pré-lingual. Também, uma em cada 1000 crianças torna-se deficiente auditiva antes de alcançar a idade adulta, entre 30 e 50 anos, 0,3% da população manifesta perda auditiva acima de 65 decibéis (dB) e 2,3% da população a manifesta entre 60 e 70 anos de idade. A prevalência continua a aumentar e alcança índices de 50% em octogenários.⁽¹⁻²⁾

Apesar desse aumento da prevalência e da importância da perda auditiva em idosos, os estudos são realizados, em sua maioria, nas formas de deficiência auditiva pré-lingual, não apenas pela maior gravidade do quadro, mas também pela maior facilidade diagnóstica, permitindo assim, intervenção precoce.⁽³⁻⁴⁾ Aproximadamente 60% das causas de deficiência auditiva pré-lingual, nos países desenvolvidos, podem ser atribuídas a fatores genéticos. Os 40% restantes estão entre as mais diversas etiologias.⁽⁵⁾ No Brasil, os fatores ambientais (67%) estão entre as principais etiologias da deficiência auditiva, com predomínio dos casos de rubéola congênita e anóxia

neonatal (33,5%), seguindo-se aqueles de etiologia indefinida (18,5%) e os de herança autossômica recessiva (15%).⁽⁶⁾

A deficiência auditiva hereditária pode ser classificada em *sindrômica* ou *não-sindrômica*. As formas ditas *sindrômicas* constituem, aproximadamente, 30% dos casos de deficiência auditiva hereditária. Um grande número de síndromes já foi descrito, nas quais a deficiência auditiva é uma das anomalias associadas. Em uma considerável proporção delas, ocorrem defeitos na formação embriológica da orelha e, aproximadamente, 60 genes, relacionados a essas síndromes, já foram mapeados no genoma humano sendo que, mais da metade deles já foram clonados. Em contraste, as formas *não-sindrômicas* são as mais prevalentes na população com deficiência auditiva hereditária, constituindo um total de, aproximadamente, 70% dos casos.⁽⁷⁾

Existem quatro formas identificáveis de padrão de herança para a deficiência auditiva: autossômica recessiva, autossômica dominante, ligada ao cromossomo X e mitocondrial. Cerca de 75% a 85% dos casos de deficiência auditiva pré-lingual não-sindrômica manifestam-se como formas autossômicas recessivas. Formas autossômicas dominantes correspondem a cerca de 15% a 25% dos casos e 1% a 3% são heranças mendelianas ligadas ao cromossomo X. Também são descritas formas herdadas exclusivamente da mãe, correspondendo à herança mitocondrial, associadas ou não à herança autossômica dominante, em cerca de 1% dos casos.⁽⁷⁾

1.2 Deficiências Auditivas Hereditárias Não-sindrômicas

Para a compreensão das consequências de mutações nos genes que regulam o processo da audição, há a necessidade da interação entre a fisiologia coclear normal e o

local de expressão de alguns desses genes na cóclea permitindo, além do diagnóstico etiológico, o diagnóstico histopatológico das deficiências auditivas hereditárias. ⁽⁸⁻⁹⁾

1.2.1 Histofisiologia Coclear e Expressão Gênica

Após estímulo sonoro, a energia mecânica do som é convertida em sinal elétrico (transdução mecanoelétrica) nas células ciliadas da cóclea. As células ciliadas internas são receptores puros que transmitem os sinais elétricos ao nervo coclear e ao córtex auditivo. As células ciliadas externas tem ambos os elementos, sensitivo e motor, que contribuem para a sensibilidade e seletividade da frequência, pela amplificação da recepção do som, sofrendo contrações e relaxamentos quando acusticamente estimuladas. Essas mudanças em seu comprimento são produzidas pela ação coordenada de muitas moléculas motoras ao longo da membrana plasmática e do citoesqueleto o qual é constituído, basicamente, por filamentos de actina e outras proteínas similares como tropomiosina, prestina, vilina. ⁽¹⁰⁾

Na superfície apical das células ciliadas, projetam-se microvilosidades especializadas, os estereocílios, dispostos em fileiras de diferentes tamanhos. Estruturalmente, os estereocílios consistem de um eixo formado por feixe de fibras de actina, unidas umas às outras por moléculas de fimbrina. As moléculas de miosinas estão associadas às proteínas integrais de membrana de ligação da miosina e, quando há deflexão dos estereocílios, ocorre a formação de complexos actina-miosina, pelo acoplamento da cabeça protéica da miosina no eixo da actina, permitindo o deslizamento da actina sobre a miosina desenvolvendo, assim, uma força de tensão. Os estereocílios se mantem rígidos por estarem inseridos em uma rede de filamentos cruzados de actina, que constituem a placa cuticular na superfície apical da célula. As

proteínas miosinas, denominadas proteínas motoras não-convencionais miosinas, são geneticamente reguladas pelos genes *MYO7A*, *MYO15*, *MYO6* e os filamentos de actina da placa cuticular, pelo gene *DIAPH1*.¹⁰ (Figuras 1, 2 e 3).⁽⁸⁻⁹⁾

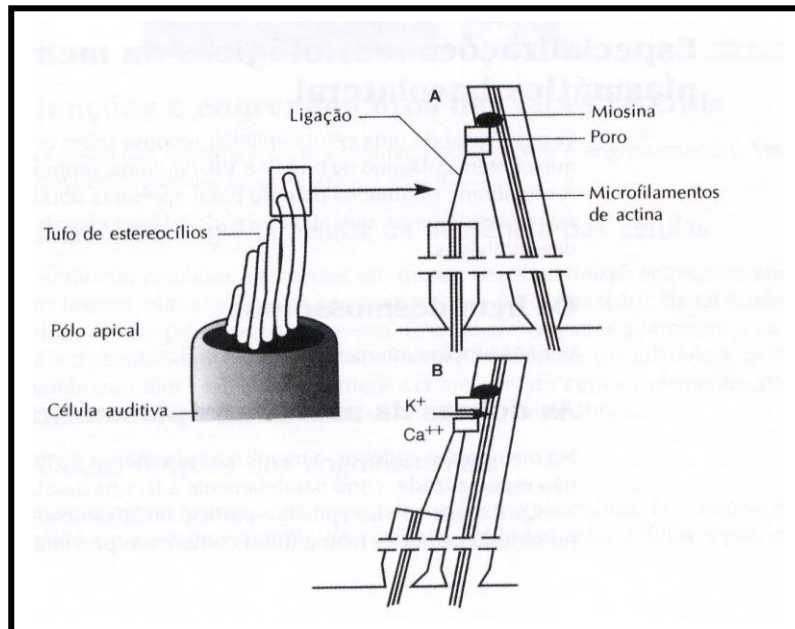


Figura 1. Esquema modificado da célula sensorial auditiva. Os estereocílios associam-se por meio de ligações em suas extremidades ("tip links").

A. Os dois estereocílios não sofreram deslocamento (deflexão): o poro está fechado.

B. Um deslocamento (deflexão) abre o poro: íons K^+ e Ca^{++} podem entrar na célula.⁽⁸⁾

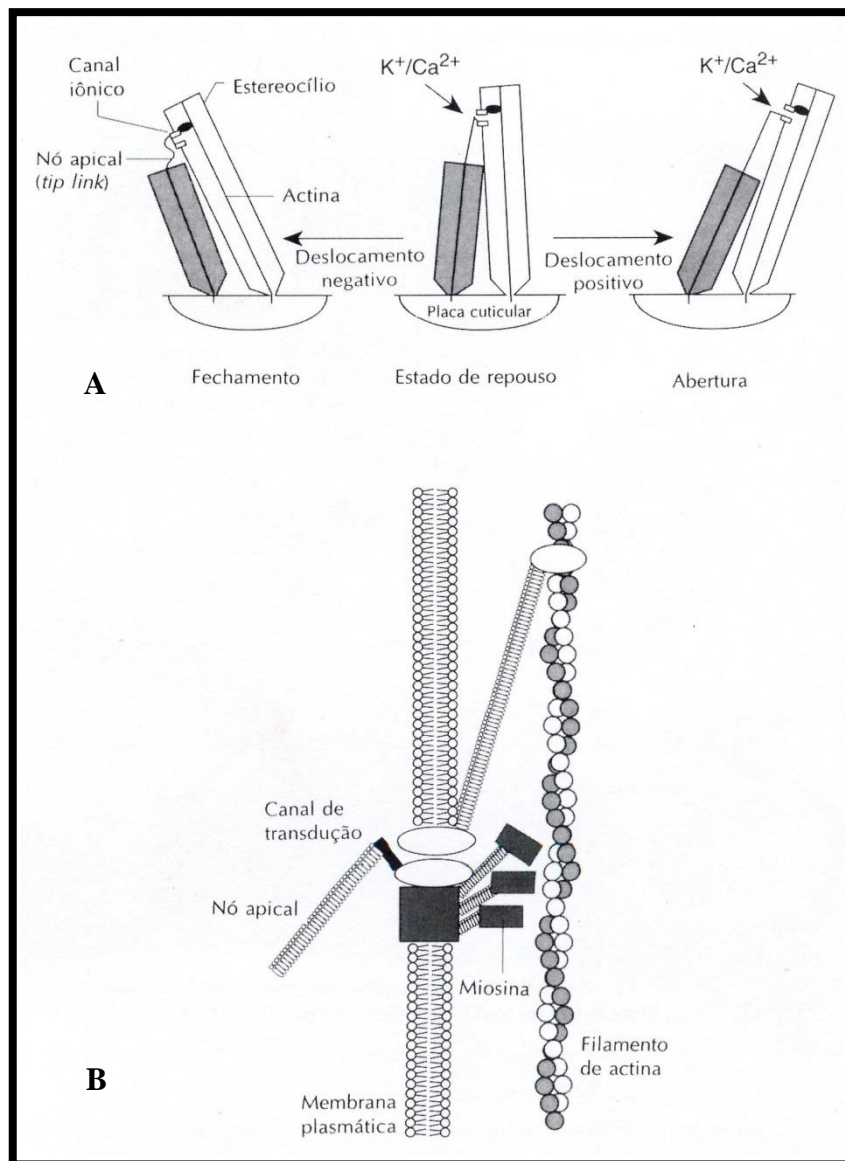


Figura 2. Esquema modificado de estereocílio no pólo apical de uma célula sensorial auditiva: abertura do canal de transdução pela tensão do nó apical. ⁽⁹⁾

A. Esquema geral. **B.** Arquitetura molecular.

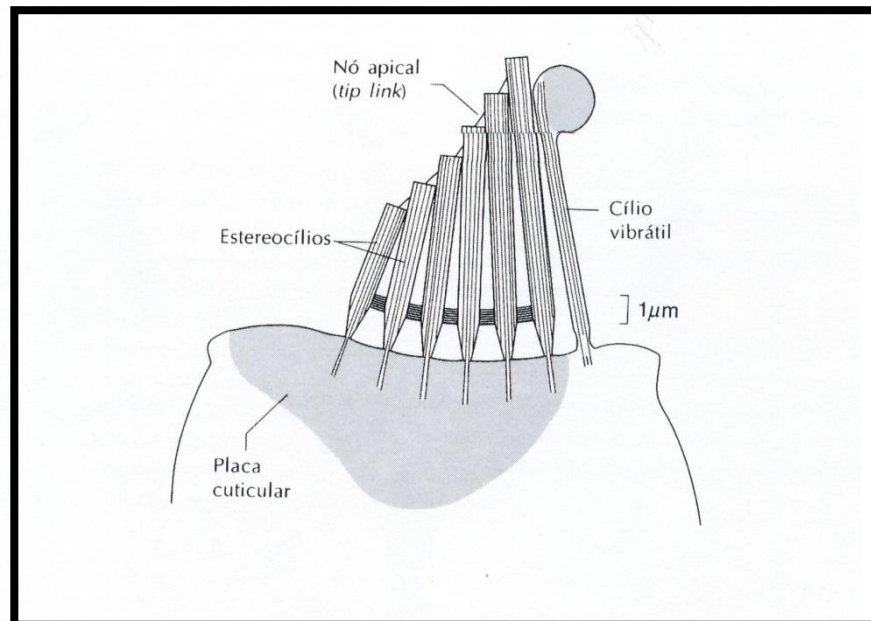


Figura 3. Esquema modificado do arranjo dos estereocílios no pólo apical de uma célula sensorial auditiva.⁽⁹⁾

As forças mecânicas da onda sonora se transmitem pela membrana basilar produzindo um movimento na endolinfa, que circunda as células ciliadas e a membrana tectória, causando uma deflexão dos estereocílios pelo estiramento dos filamentos protéicos de conexão ("tip links"), situados entre eles, os quais provavelmente atuam como um portão, para a abertura dos canais iônicos, permitindo a passagem de potássio. Os canais iônicos são constituídos por proteínas transmembranas formando uma espécie de poro, ou mais precisamente, um canal hidrófilo que transporta íons de uma maneira específica e seletiva. Cadeias hidrófilas de aminoácidos limitam a periferia do canal, enquanto as cadeias denominadas hidrófobas estão em contato com a dupla camada lipídica da membrana plasmática. Esses canais, nos estereocílios, tem sua abertura controlada pela tensão, pois do lado citoplasmático seu fechamento e abertura dependem de agrupamentos protéicos (que agem como uma porta), estando unidos aos

ligamentos de conexão ("tip links") existentes entre os estereocílios. Os canais iônicos se abrem durante a deflexão dos estereocílios, permitindo então, o influxo de potássio. O tempo extremamente curto de abertura desses canais (alguns milissegundos) permite o influxo rápido e finamente regulado⁽¹⁰⁾ (Figuras 4, 5).⁽⁸⁻⁹⁾

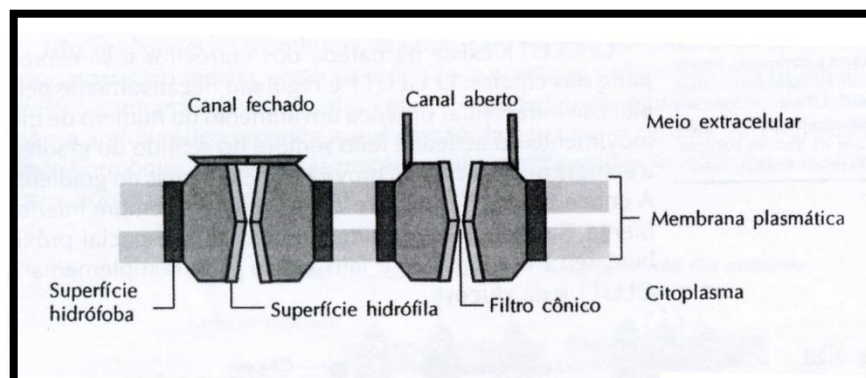


Figura 4. Esquema modificado de um canal iônico: abertura controlada pela tensão. Uma molécula transmembrana delimita um canal hidrófilo. O canal possui um diâmetro muito reduzido em um único ponto, "o filtro cônico" seletivo.⁽⁸⁾

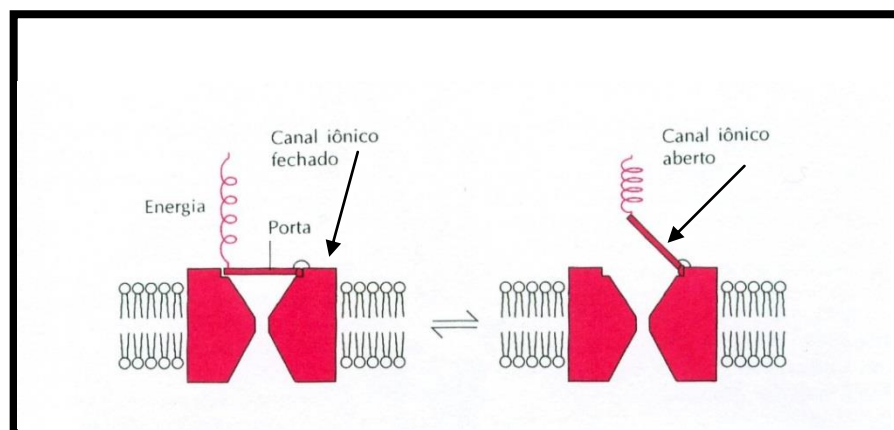


Figura 5. Esquema modificado de canal iônico de uma célula sensorial auditiva, em específico. Abertura controlada pela tensão do nó apical ("tip link") - "gating-spring model" (teoria do portão em mola).⁽⁹⁾

Portanto, esse influxo de potássio, da endolinfa para o interior das células ciliadas, resulta em uma mudança no potencial de ação da membrana que é proporcional à intensidade do estímulo sonoro. A despolarização das células ciliadas ativa também os canais de cálcio, situados na superfície basolateral da membrana, que são sensíveis às alterações de voltagem, e o subsequente influxo de cálcio provoca liberação de vesículas, contendo neurotransmissores, como o glutamato, que ativam os terminais sinápticos do nervo coclear.⁽¹⁰⁾ A proteína otoferlina, codificada pelo gene *OTOF*, regula a fusão das vesículas sinápticas, na membrana plasmática, para liberação dos neurotransmissores.⁽¹¹⁻¹²⁾

Dessa forma, após o estímulo sonoro, as células ciliadas ficam hiperpolarizadas, com alta concentração de potássio intracelular. Para que nova excitação das células seja possível, as mesmas tem que ser repolarizadas e isso ocorre pela remoção do potássio do interior do citoplasma para as células de sustentação da cóclea, através de canais de potássio, situados na superfície basolateral das células ciliadas, regulados pelo gene *KCNQ4*.⁽¹³⁾ Os íons potássio se difundem então, passivamente, pelas células de sustentação, pelos fibrócitos do ligamento espiral até a estria vascular e pelos fibrócitos do limbo espiral até as células interdentes, por meio de comunicações intercelulares especializadas, as junções comunicantes ou "gap junctions", reguladas pelos genes da *Conexina*.⁽¹⁴⁻¹⁵⁾ Nas células da estria vascular também existem canais de potássio, regulados pelos genes *KVLQT1* e *KCNE1* e, quando os íons potássio atingem essas células, são ativamente liberados, por esses canais, de volta para a endolinfa.⁽¹⁶⁾

1.3 Nomenclatura

Convencionou-se denominar as diferentes localizações cromossômicas dos genes mutantes, das formas não-sindrômicas de deficiência auditiva genética, com a sigla DFN (proveniente do inglês "deafness") acrescida ou não das letras A e B, significando forma de transmissão autossômica dominante (DFNA) e recessiva (DFNB), respectivamente. Quando se denominar DFN isoladamente, trata-se de deficiência auditiva de transmissão ligada ao cromossomo X. Após as letras, há um número inteiro, indicando a ordem da descoberta do gene.⁽⁷⁾ Sendo assim, mutações em qualquer um desses genes podem causar deficiência auditiva indicando que, o perfeito balanço iônico das células sensoriais é essencial para a manutenção permanente de sua função, a audição.⁽¹⁰⁾

Depois das mutações no gene *GJB2* e *GJB6*, que são responsáveis por cerca de 80% das deficiências auditivas não-sindrômicas autossômicas recessivas, as mutações no gene *OTOF* são as mais frequentes das causas genéticas de surdez em crianças. Esse tipo de deficiência auditiva é mais complicado na medida em que, numa fase inicial pode apresentar-se como uma neuropatia auditiva não sendo detectada por triagem auditiva neonatal baseada no teste de emissões otoacústicas.⁽¹⁷⁾

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neuropatia auditiva e gene *OTOF*

O termo "neuropatia auditiva" foi primeiramente descrito em 1996 e,⁽¹⁸⁾ nesse mesmo ano, foi descrita uma família libanesa com surdez de caráter recessivo com alterações audiológicas compatíveis à neuropatia auditiva.⁽¹¹⁾ A neuropatia auditiva/dissincronia auditiva é um tipo único de deficiência auditiva diagnosticada quando timpanogramas são normais, audiogramas estão alterados, reflexos acústicos e respostas auditivas de tronco encefálico estão ausentes ou gravemente anormais, mas a função das células ciliadas externas é normal, evidenciada pela presença de emissões otoacústicas e/ou microfonia coclear. Os resultados desses exames indicam que a via auditiva acima e incluindo as células ciliadas externas é funcionante, mas o sinal auditivo não é transmitido para o cérebro, sugerindo que a lesão deve estar localizada ou nas células ciliadas internas ou nas sinapses dessas células com as fibras dos nervos aferentes ou no próprio nervo auditivo. Pacientes com essa desordem apresentam variações nos graus de deficiência auditiva identificada pela audiometria de tom puro, além de ter grave prejuízo na compreensão da fala desproporcional ao grau de perda auditiva.⁽¹⁷⁾

Em 2003, foi definido o termo "neuropatia auditiva não-sindrômica recessiva" devido não apenas às características audiológicas, mas também às descobertas genéticas relacionadas a mutações no gene *OTOF* que foram associadas a esse tipo de surdez, sendo identificada como DFNB9.^(12,19-21) Até recentemente, era comum os médicos considerarem a neuropatia auditiva uma doença rara, com pouca chance de ser encontrada na prática clínica. Entretanto, recentes evidências sustentam o oposto - a

doença é muito mais frequente do que anteriormente se acreditava, perfazendo cerca de 8% de novos casos diagnosticados em crianças com surdez por ano. Como os conhecimentos dessa doença são relativamente recentes, muitos casos podem ter sido subestimados ou não diagnosticados no passado.⁽²²⁻²⁴⁾

A prevalência da neuropatia auditiva é estimada em crianças de alto risco para a deficiência auditiva em uma faixa de 0,23% a 0,94%, enquanto que uma prevalência acima de 1,9% foi encontrada em um estudo em UTI neonatal. Entre as crianças com diagnóstico confirmado de perda definitiva de audição, a prevalência alcança índices de 7% ou mesmo de até 19%.⁽²⁵⁻²⁸⁾ Em relação à idade de início dos sintomas, a neuropatia auditiva é caracterizada em dois grupos distintos: uma forma de início precoce, tipicamente associada a alguma intercorrência neonatal ou mecanismo genético, e uma forma de início tardio a qual é, geralmente, acompanhada por neuropatia generalizada. Entretanto, em somente 25% dos casos de neuropatia auditiva os sintomas surgem após os 10 anos de idade, enquanto que as neuropatias generalizadas estão presentes em cerca de 80% dos pacientes que apresentam início dos sintomas após os 15 anos.^(26,29)

2.1.1 Fisiopatologia da Neuropatia Auditiva

Embora as lesões subjacentes e os mecanismos fisiopatológicos na neuropatia auditiva sejam pontos-chave para sua compreensão e tratamento, as evidências relatadas ainda não são claras e, em alguns casos, confusas. Recentes dados, em relação às pesquisas clínicas e eletrofisiológicas, sustentam a hipótese que a neuropatia auditiva não é uma única doença, mas um espectro de doenças que afetam a via auditiva.^(23,30)

Há estreita relação entre a neuropatia auditiva e fatores de risco neonatais para a deficiência auditiva, tais como a prematuridade, hiperbilirrubinemia,

hipercolesterolemia, hipóxia, isquemia neural e imaturidade do sistema nervoso central, separadamente ou em combinação, junto a baixo peso ao nascimento e condições idiopáticas.⁽³¹⁻³²⁾ A administração de certos antibióticos e diuréticos em UTI neonatal tem sido implicados no desenvolvimento do perfil da neuropatia auditiva.⁽³¹⁾ A hiperbilirrubinemia e a hipóxia parecem prevalecer entre os fatores de risco. Mais de 50% dos casos de neuropatia auditiva de início precoce, relatados na literatura, tem uma história médica que inclui um ou ambos desses fatores.^(26,33-35)

A neurotoxicidade da bilirrubina resulta do efeito deletério da exposição prolongada do sistema auditivo pela excessiva fração não-conjugada da bilirrubina, em diferentes estágios do neurodesenvolvimento. A bilirrubina lesa, seletivamente, o núcleo coclear no tronco encefálico, podendo também lesar o nervo auditivo e o gânglio espiral que contém os corpos celulares dos neurônios auditivos primários. Como resultado, a escassez de neurônios de grande calibre abala a codificação temporal da informação auditiva, a qual é pré-requisito para a sincronia neural.⁽³⁶⁻³⁸⁾

Em adição, experimentos em animais tem demonstrado que, em contraste aos efeitos da anóxia aguda, na qual todos os aspectos da função coclear parecem estar simultaneamente perdidos, a suscetibilidade dos sistemas das células ciliadas externas e internas para a hipóxia a médio ou longo prazo parece diferir. Assim, a unidade funcional das células ciliadas internas/sistema coclear aferente é vulnerável à hipóxia a longo e médio prazo, enquanto que a função das células ciliadas externas mostra pouca ou nenhuma alteração (consistente com o padrão da neuropatia auditiva).⁽³⁹⁾ Em alguns casos, a neuropatia auditiva é apenas um entre vários sinais clínicos resultantes de doenças sistêmicas neurodegenerativas, como a neuropatia periférica Charcot-Marie Tooth, a ataxia de Friedreich e doenças mitocondriais.^(29,40)

Embora os fatores de risco anteriormente descritos estejam presentes em um grande número de casos, em outros, a neuropatia auditiva pode se apresentar como uma entidade isolada dentro das desordens não-sindrômicas hereditárias as quais também são responsáveis pela ruptura do complexo funcional entre as células ciliadas e os neurônios do gânglio espiral, a qual está manifesta na neuropatia auditiva. O padrão de herança nessas doenças genéticas é heterogêneo, sendo predominantemente autossômico recessivo.^(21,34,41) Também tem sido descritos padrões de herança ligados ao X e autossômico dominante, associados a sintomas de início tardio.⁽⁴²⁻⁴³⁾ Assim, o subtipo de deficiência auditiva pré-lingual DFNB9 (forma de herança autossômica recessiva) mostra o padrão totalmente típico da neuropatia auditiva, caracterizado pela ausência de ondas do potencial evocado auditivo de tronco encefálico e presença de registros de emissões otoacústicas.^(21,41,44)

2.1.2 Genética Molecular da Neuropatia Auditiva

O gene *OTOF*, identificado em 1999, está localizado no cromossomo 2, *locus* 2p23-p22 (Figura 6),⁽⁴⁵⁾ sendo um dos 52 genes conhecidos por estar envolvido na deficiência auditiva pré-lingual não sindrômica recessiva. Contém 48 exons e codifica a proteína otoferlina.⁽¹¹⁻¹²⁾ É membro de uma família de genes de mamíferos relacionada ao gene *Caenorhabditis elegans factor FER-1*.⁽⁴⁶⁾ Essa família também inclui os genes *DYSF*⁽⁴⁷⁻⁴⁸⁾ e *MYOF*⁽⁴⁹⁾ os quais codificam, respectivamente, as proteínas disferlina (2080 aminoácidos) e a mioferlina (2061 aminoácidos). Ambas são proteínas citosólicas ancoradas à membrana que contem seis domínios C2, quatro dos quais se ligam ao Ca^{+2} .⁽⁵⁰⁾ Na orelha interna, o gene *OTOF* é principalmente expresso, pela proteína

otoferlina, nas células ciliadas internas cocleares e nas células ciliadas stubulares Tipo I.^(12,51)

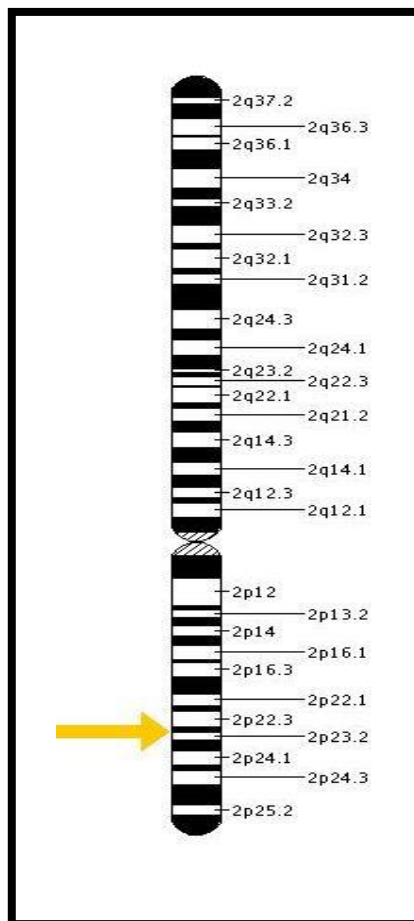


Figura 6. Esquema modificado do cromossomo 2 humano com a localização do gene *OTOF* assinalada - 2p23-p22, que codifica a proteína otoferlina.⁽⁴⁵⁾

A proteína otoferlina, portanto, também pertence à família de proteínas citosólicas C-terminal ancoradas à membrana, contendo seis repetições de um módulo estrutural que se liga ao Ca^{+2} (domínio C2) e está potencialmente envolvida na fusão das vesículas sinápticas à membrana celular e ao tráfego da membrana que é ativado pelo aumento da concentração local de Ca^{+2} (Figura 7).^(12,51-52) Apresenta um domínio transmembrana (TM) C-terminal e seis fragmentos com homologia ao domínio C2

(C2A-F). Como a disferlina e a mioferlina, somente os quatro últimos domínios C2 (C2C-F) se ligam ao Ca^{+2} .⁽¹²⁾ Há evidências de duas classes de isoformas da proteína otoferlina: a longa, com seis domínios C2 (C2A-F) e um domínio TM C-terminal (1997 aminoácidos) e a curta, contendo somente os últimos três domínios C2 (C2D-F) e um domínio TM (1230 aminoácidos) (Figura 8).⁽⁵³⁾ Os primeiros 19 exons do gene *OTOF* são exclusivos das isoformas longas⁽⁵¹⁾ (Figura 9).⁽⁵⁴⁾

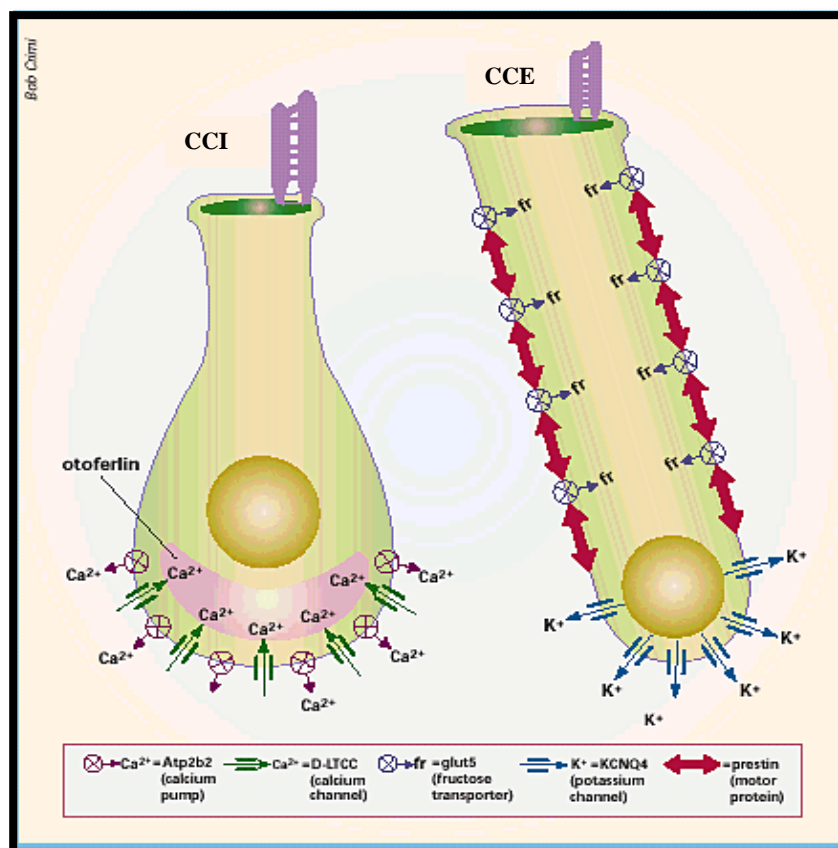


Figura 7. Figura modificada das células ciliadas cocleares - interna (CCI) e externa (CCE), mostrando a localização basolateral da proteína otoferlina na CCI e sua relação com os canais de Ca^{+2} .⁽⁵²⁾

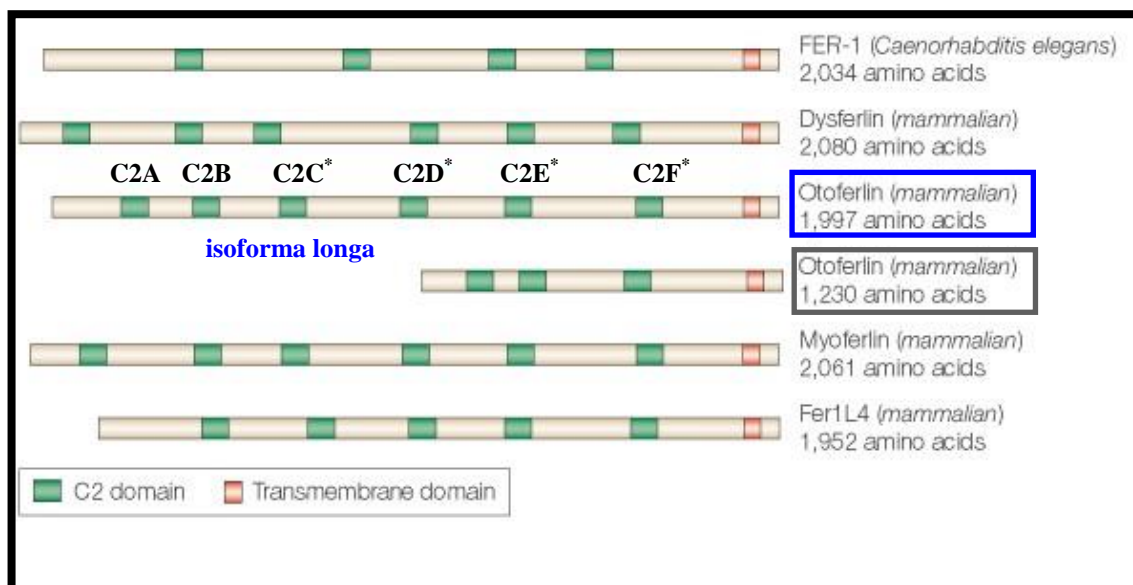


Figura 8. Figura modificada das proteínas da família de genes de mamíferos relacionadas ao gene *Caenorhabditis elegans factor FER-1*. A isoforma longa da otoferlina possui seis domínios C2 e a curta, três domínios C2. Os domínios identificados com asterisco são os que se ligam ao Ca^{+2} .⁽⁵³⁾

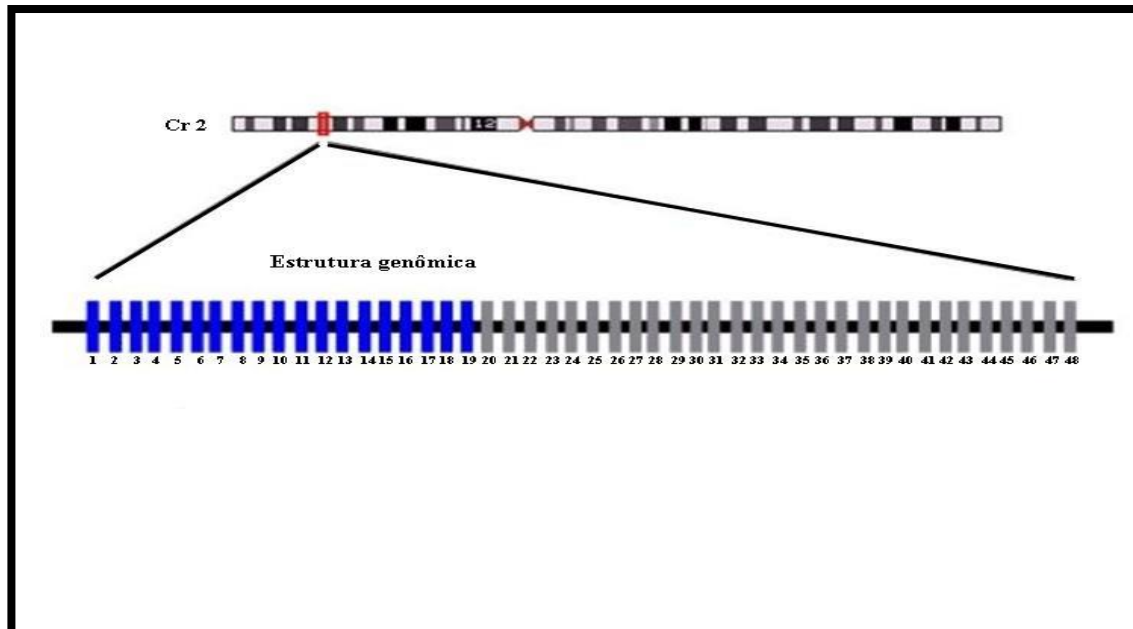


Figura 9. Estrutura genômica do gene OTOF. Os exons em azul (1-19) são exclusivos das isoformas longas.⁽⁵⁴⁾

A dificuldade no influxo de Ca^{+2} nas sinapses auditivas, por alterações na proteína otoferlina, prejudica o tráfego desse íon pela membrana e a consequente fusão das vesículas sinápticas à membrana celular, desencadeando um bloqueio completo da liberação dos neurotransmissores sinápticos das células ciliadas internas cocleares para a fibra neural aferente, além da redução no número dos neurônios do gânglio espiral, enquanto que as células ciladas externas preservam sua morfologia, sendo essa, portanto a patogênese molecular da neuropatia auditiva. Esse processo resulta na ausência de respostas auditivas do tronco encefálico, enquanto que as mais altas frequências por produto de distorção das emissões otoacústicas são produzidas, de uma maneira semelhante à observada na neuropatia auditiva.⁽⁵⁵⁾ Entretanto, embora essa forma de defeito sináptico possa explicar o fenótipo observado na neuropatia auditiva, em certos casos parece que a deficiência nas zonas ativas pré-sinápticas das células ciliadas internas (projeções densas) pode ser mais crítica na redução da exocitose rápida das vesículas sinápticas e na ativação do sincronismo sináptico dos neurônios do gânglio espiral, minimizando assim a produção neural, apesar da função aparentemente intacta das células ciliadas externas.⁽⁵⁶⁾

A partir de 1999, foram publicados estudos moleculares que permitiram a identificação de mutações no gene *OTOF* e associá-las à neuropatia auditiva não-sindrômica autossômica recessiva.^(12,20,21,41,51,57-59) Em 2005, foi proposto que a neuropatia auditiva é a única manifestação fenotípica de mutações no gene *OTOF*.⁽⁵⁹⁾ Nesse ano, então, foi identificada a primeira mutação no gene *OTOF* em indivíduos com deficiência auditiva de quatro famílias consanguíneas libanesas, sem parentesco e de áreas geográficas diferentes, os quais apresentam, em homozigose, uma transversão T-A na posição 2416 no exon 18, causando a substituição do aminoácido tirosina por

um prematuro *stop codon* (códon terminal) no códon 730 da cadeia peptídica (Tyr730Ter/Y730X). Essa mutação *nonsense* ocasiona uma proteína truncada não sendo, portanto, produzida a cadeia peptídica completa. A mutação não foi identificada nos 106 indivíduos ouvintes libaneses avaliados.⁽¹²⁾

Em uma família de casamento consanguíneo, no sudoeste da Índia, em 2000, a surdez em três irmãos foi devido a transição A-G, em homozigose, na junção do íntron 8 com o exon 9 do gene *OTOF* (IVS8-2A-G) (*IVS - intervening sequences or intron*). A mesma substituição foi encontrada em heterozigose nos pais e nos irmãos não afetados. Essa mutação *nonsense* afeta o invariante dinucleotídeo AG do sítio de *splice* receptor ocasionando um *splicing* aberrante, tal como o skipping de 55 pb do exon 9, criando um prematuro *stop codon* no exon 10. Nos 109 indivíduos ouvintes do grupo controle, a mutação não foi identificada.⁽⁵¹⁾

A surdez DFNB9 foi encontrada, também em 2000, em uma família endogâmica islâmica no Oriente Médio devido a transição G-A, em homozigose, na posição +1 do primeiro nucleotídeo intrônico no sítio de *splice* doador do exon 5. A mutação *IVS5* +1G-A resulta em um *frameshift*.⁽⁵⁷⁾

Em 2002, entre 28 famílias espanholas sem parentesco com surdez sensorineural não-sindrômica sendo que, em seis delas, os pais eram consanguíneos, foi identificada uma família com uma mutação *nonsense* no gene *OTOF*: uma transição 2485C-T no exon 22, resultando na substituição do aminoácido glutamina por um prematuro *stop codon* (Gln829Ter/Q829X). Os pais eram portadores da mutação e seus dois filhos afetados eram homozigotos. A mutação não estava presente em 200 espanhóis ouvintes do grupo controle. A análise genética dos outros 269 pacientes com deficiência auditiva revelou mais 11 casos (8 esporádicos e 3 familiar) com a mutação

Q829X. Uma dessas famílias tinha um caso heterozigoto composto para as mutações Q829X e P1825A. Foi determinado, portanto, que a mutação Q829X é responsável por 4,4% dos casos de surdez recessiva familiar ou esporádica na população espanhola analisada.⁽²⁰⁾ A mutação P1825A foi a primeira mutação *missense* identificada no gene *OTOF*. Ocorre devido a transversão 5473C-G no exon 44, resultando na substituição do aminoácido prolina pela alanina na posição 1825 da cadeia peptídica (Pro1825Ala). Isso altera o resíduo conservado no sexto domínio C2F da isoforma longa, o qual tem capacidade de ligação com o Ca^{+2} no gene selvagem.⁽²⁰⁾

Duas outras mutações foram descritas, em 2002, em uma família consanguínea do leste da Turquia na qual os membros afetados tinham surdez pré-lingual profunda: a transversão 1514C-A e a transição 1589T-C resultando, respectivamente, na substituição da prolina pela glutamina na posição 490 da cadeia peptídica (Pro490Gln) e da isoleucina por treonina na posição 515 (Ile515Thr) no exon 15 do gene *OTOF*. Compatível com o modo de herança autossômico recessivo, todos os membros afetados são homozigotos e seus pais heterozigotos para ambas as mutações. Além disso, a mutação estava ausente em 180 cromossomos dos 70 indivíduos turcos não afetados e nos 20 não afetados da Europa Central.⁽⁵⁸⁾

Em três famílias com neuropatia auditiva não-sindrômica recessiva caracterizada por surdez e função normal das células ciliadas, foram identificadas mutações em heterozigose composta no gene *OTOF*. Uma deleção de um par de bases (pb) (1778G) no exon 16, levando a um *stop codon (frameshift)* e a mutação *missense* devido a transição 6141G-A, resultando na substituição do aminoácido arginina pela glutamina na posição 2 da cadeia peptídica (Arg2Gln) do exon 48, na primeira família. Na segunda família foi identificada em heterozigose a transversão G-C no sítio de *splice* doador do

intron 39 (*IVS39*, +1G-C) resultando em uma proteína truncada e, a mutação *missense*, devido a transversão 6285C -C, resultando na substituição do aminoácido prolina pela arginina na posição 50 da cadeia peptídica (Pro50Arg), também do exon 48, na terceira família.⁽²¹⁾

Em três irmãos turcos com neuropatia auditiva não-sindrômica recessiva foi identificada, em 2005, a transição 3032T-C, em homozigose, no exon 26 do gene *OTOF*, resultando na substituição da leucina por prolina na posição 1011 da cadeia peptídica, no quarto domínio C2 (Leu1011Pro). Os pais consanguíneos eram heterozigotos para a mutação.⁽⁵⁹⁾

A transição 1589T-C (Ile515Thr) no gene *OTOF* foi também associada, em 2006, à neuropatia auditiva sensível à temperatura. Em uma família, uma filha tinha audiometria de tronco encefálico anormal, emissões otoacústicas presentes e audição relativamente normal até a criança apresentar-se febril, quando as otoemissões permaneciam normais e a audiometria de tronco encefálico apresentava anormalidade, com ondas I-III não identificáveis e latência atrasada do complexo de ondas IV-V, para uma resposta totalmente ausente. A quantidade de perda na audição era dependente do grau de febre. Surdez de grau leve a moderado estava presente quando ela apresentava temperatura de 37,8°C e atingia grau profundo quando alcançava 38,1°C. O seu irmão, que também era portador da mutação, apresentava deficiência auditiva de padrão semelhante quando febril. O pai era heterozigoto, mas a mutação não foi identificada na mãe.⁽¹⁷⁾

No Brasil, até o presente momento, foram publicados somente três estudos. Em 2005, foi descrito o primeiro caso de neuropatia auditiva relacionada a mutação no gene *OTOF*, pela identificação da deleção de 16 pb no exon 15 (1552-1567del16), a qual

acarreta um *stop codon* (*frameshift*), produzindo o encurtamento da cadeia peptídica.⁽⁶⁰⁾ Em 2007, foi realizado estudo retrospectivo, do período de 1998 a 2006, sobre a análise molecular, de diversos genes, em 645 pacientes com deficiência auditiva sensorineural, mas não neuropatia auditiva, e sem parentesco. A mutação Q829X, única avaliada no gene *OTOF*, não foi encontrada nos pacientes.⁽⁶¹⁾ Novas mutações no gene *OTOF* foram identificadas, em 2009, em pacientes com neuropatia auditiva e padrão sugestivo de herança de autossômica recessiva perfazendo a prevalência de 7,7%, mas nos pacientes com surdez não-sindrômica sem neuropatia auditiva não foram encontradas mutações.⁽⁶²⁾

3 OBJETIVOS

Determinar a prevalência das mutações no gene *OTOF*, com os testes da Reação em Cadeia da Polimerase/Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (*Polimerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism - PCR/RFLP*), em amostra de pacientes com e sem diagnóstico audiológico de neuropatia auditiva:

- a) 2416T-A (Y730X) no exon 18.
- b) *IVS8-2-A-G* no intron8/exon9.
- c) 2485C-T (Q829X) no exon 22.
- d) 5473C-G (Pro1825Ala) no exon 44.
- e) 3032T-C (Leu1011Pro) no exon 26.

4 CASUÍSTICA E MÉTODO

4. CASUÍSTICA E MÉTODO

De acordo com as Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, o presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (CEP-FAMERP, Parecer nº 44/2010) (Anexo 1).

No período de 01/04/2010 a 30/07/2011, foi realizado estudo em corte transversal no qual, dentre 1230 casos de deficiência auditiva sensorineural não sindrômica, foram selecionados 16 pacientes, de ambos os gêneros, com neuropatia auditiva, os quais foram denominados de casos índice e, quando possível e autorizado, foi realizada a avaliação audiológica e molecular em alguns dos familiares. Destes, cinco eram provenientes do Ambulatório de Fonoaudiologia do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina de Botucatu sendo, os onze restantes, provenientes do Ambulatório de ORL da FAMERP. Este grupo foi denominado Grupo NPT (Neuropatia) e, para a seleção, foram considerados os seguintes critérios:

Critérios de inclusão:

- 1) exame otoscópico sem alterações.
- 2) diagnóstico de deficiência aditiva sensorineural pela audiometria tonal convencional.
- 3) reflexos acústicos contralateral e ipsilateral ausentes bilateralmente.
- 4) presença de emissões otoacústicas evocadas transientes (EOAs) e/ou microfonismo coclear na pesquisa de potenciais evocados auditivos de tronco encefálico (PEATE).
- 5) ausência de ondas do PEATE ou alteração grave da morfologia das mesmas.

6) normalidade aos exames de ressonância nuclear magnética para perda sensorineural ou tomografia computadorizada de crânio para perda condutiva.

7) ausência dos fatores de risco: infecções materno-fetais, complicações perinatais ou neonatais como meningites, uso de drogas ototóxicas, trauma acústico, sinais sugestivos de formas sindrômicas de deficiência auditiva (especialmente dismorfismo crânio-facial, alterações tegumentares, anomalias de origem branquial, cardíaca, tireoidianas, distúrbios da visão, etc.) ou de neuropatias periféricas.

Critérios de exclusão:

- 1) alterações à otoscopia.
- 2) diagnóstico de perda auditiva condutiva ou mista.
- 3) normalidade no PEATE
- 4) alterações retrococleares diagnosticadas pela ressonância nuclear magnética, por afetarem as respostas do PEATE.
- 5) presença dos fatores de risco ou de neuropatias periféricas
- 6) idade maior que 65 anos, para exclusão de presbiacusia concomitante.

4.1 Investigação Oto-audiológica

Todos os pacientes foram submetidos à completa anamnese e exame otológico para determinar as condições do conduto auditivo externo e da membrana timpânica, pela otoscopia convencional, à avaliação audiológica básica composta pela imitanciometria, audiometria tonal convencional e eletrofisiológica que consiste na audiometria de tronco do encéfalo, além da tomografia de crânio, com avaliação de mastóide e orelha e ressonância magnética.

Para o registro das emissões otoacústicas evocadas (EOAs) por transiente foram testadas as frequências de 700 a 8.000 Hz e a intensidade do estímulo utilizado foi de L1 65 dB e L2 de 55 dB, mantidas fixas, sendo a razão entre as frequências de 1,22 ($F2/F1 = 1,22$). A presença de resposta foi considerada quando a relação sinal/ruído nas frequências foi de 6 dB, reprodutibilidade maior ou igual a 70% e estabilidade maior ou igual a 75%.

No PEATE, o estímulo utilizado foi o click monoaural na intensidade de 90 dB inicialmente, por pelo menos duas vezes, para a confirmação da superposição das ondas. O espectro de frequência do estímulo foi entre 2000 Hz e 4.000 Hz, com duração individual de 100 microssegundos, polaridade condensada e rarefeita e frequência de apresentação dos cliques de 27,7 estímulos por segundo, com janela de 20 ms. Caracterizando a ausência de formação das ondas no PEATE com estímulo de até 90 dB, ou alteração grave da morfologia das ondas do PEATE consistindo em baixa amplitude da onda V, somente com intensidade de 90 dB.

Durante a realização do PEATE, foi feito o registro do microfonismo coclear (MC), utilizando-se cliques com polaridades invertidas (condensada e rarefeita). Com a presença do MC, inicialmente na intensidade de 90 dB, foi, então, pesquisada a intensidade, decrescendo-se de 20 em 20 até o nível mínimo de intensidade que o potencial pudesse ser verificado. As latências absolutas das ondas I, III e V foram mensuradas, mas apresentaram variabilidade de resultados devido à alteração da morfologia, amplitude e latência das mesmas, mas suas medidas não fazem parte do objetivo desse trabalho. Os exames de PEATE e EOAs foram realizados utilizando-se sedativos, conforme necessário.

Também foram selecionados, do presente Ambulatório, 13 pacientes, de ambos os gêneros, já com diagnóstico de deficiência auditiva sensorineural não-sindrômica cujos exames audiológicos não correspondem ao quadro clínico de neuropatia auditiva e que haviam sido submetidos à análise molecular dos genes da *Conexina 26* e *GJB6* em pesquisa anterior e não apresentam, respectivamente, as mutações 35 delG e Δ (GJB6-D13S1830) analisadas à época, sendo denominados de Grupo DASN (Deficiência Auditiva Sensorineural).

De acordo com o limiar auditivo obtido pela audiometria tonal convencional, os casos índice do Grupo NPT e os pacientes do Grupo DASN foram enquadrados na Classificação da Deficiência Auditiva da OMS (Tabela 1).⁽⁶³⁾

Tabela 1. Síntese da Classificação da Deficiência Auditiva segundo a Organização Mundial de Saúde.⁽⁶³⁾

Grau	Perda Auditiva (dB)*
Audição Normal	0 a 25 ¹
Deficiência Auditiva Leve	26 a 40
Deficiência Auditiva Moderada	41 a 60
Deficiência Auditiva Grave	61 a 80
Deficiência Auditiva muito Grave, incluindo Surdez	81 ou mais

*Considera-se a média do limiar auditivo por via aérea nas frequências de 500, 1000 e 2000 Hertz (Hz).

¹Até 20 decibéis (dB) também pode ser considerado como normal.

Como Grupo Controle (Grupo GC), foram selecionados 20 indivíduos, de ambos os gêneros, sem queixas auditivas, com exame otoscópico normal e sem qualquer parentesco com os pacientes dos Grupos NPT e DASN.

Após a identificação, realização de exame complementar, caso estivesse faltante, e registro dos dados, os pacientes dos Grupos NPT e DASN e os do Grupo Controle

foram submetidos à coleta de sangue venoso periférico para a realização da investigação molecular.

Os casos índice, pacientes e controles são da mesma origem racial, idade menor ou igual a 65 anos, sem casamento consanguíneo e da mesma área geográfica - Estado de São Paulo.

A fim de melhor caracterização demográfica a faixa etária foi classificada de acordo com as fases de crescimento: lactente (1 mês a 1 ano), infância (2 a 10 anos), adolescência (11 a 17 anos), adulto jovem (18 a 40 anos), adulto (41 a 65 anos) e idoso (> 65 anos).⁽⁶⁴⁻⁶⁵⁾

Todos os procedimentos descritos foram realizados somente após concordância e assinatura, pelos participantes da pesquisa e/ou responsáveis dos mesmos, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo CEP-FAMERP.

4.2 Investigação molecular:

4.2.1 Extração de DNA genômico:

O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue estocadas usando-se o Kit de extração *GE Illustra - Blood Genomicprep Mini Spin Kit™ (GE Healthcare UK Limited)*, de acordo com o protocolo do fabricante, e o procedimento realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Imunomorfologia (LAEPI) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (FAMERP).

4.2.2 Investigação das mutações no gene *OTOF*:

Todas as cinco mutações são identificadas pelas suas posições no *Gene Bank NCBI RefSeqGene: NG_009937.1*.

4.2.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*):

a) Amplificação do exon 18 do gene *OTOF* pelo teste da Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*):

Para se detectar a mutação 2416T-A, o fragmento do *DNA* genômico, que abrange a região da mutação no exon 18 do gene *OTOF*, foi amplificado pelo teste da *PCR*. Para esta reação, foi utilizado um par de iniciadores ou *primers*, que são oligonucleotídeos sintéticos, identificados como *OTOF-EX18(F)* e *OTOF-EX18(R)*.⁽¹²⁾ As sequências dos oligonucleotídeos sintetizados, o tamanho (em pares de bases - pb) do fragmento amplificado e a temperatura de anelamento do par de "primers" são descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Sequência dos *primers* para *PCR* do exon 18 do gene *OTOF*.⁽¹²⁾

<i>Primer</i>	Sequência 5'→3'	Tamanho (pb)	Temperatura de anelamento
<i>OTOF-EX18(F)</i>	CTCCTGGTGCTGTTAGCTAT	258	56°C
<i>OTOF-EX18(R)</i>	GATGAGGAGACTTGCAAGGAG		

b) Amplificação do intron 8 do gene *OTOF* pelo teste da Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*):

Para se detectar a mutação *IVS8-2A-G*,⁽⁵¹⁾ o fragmento do *DNA* genômico, que abrange a região da mutação no intron 8 do gene *OTOF*, foi amplificado pelo teste da

PCR. Para esta reação, foi utilizado um par *primers*, identificados como OTOF-IVS8(F) e OTOF-IVS8(R). As sequências dos oligonucleotídeos sintetizados, o tamanho (em pares de bases - pb) do fragmento amplificado e a temperatura de anelamento do par de "primers" são descritos no Quadro 2.

Quadro 2. Sequência dos *primers* para *PCR* do intron 8 do gene *OTOF*.⁽⁵¹⁾

<i>Primer</i>	Sequência 5'→3'	Tamanho (pb)	Temperatura de anelamento
OTOF-IVS8(F)	ACTAATCCTCACTATTCTTG	490	51°C
OTOF-IVS8(R)	GGTGCTTCTCACTTTATGAAG		

c) Amplificação do exon 22 do gene *OTOF* pelo teste da Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*):

Para se detectar a mutação 2485C-T,⁽²⁰⁾ o fragmento do *DNA* genômico, que abrange a região da mutação no exon 22 do gene *OTOF*, foi amplificado pelo teste da *PCR*. Para esta reação, foi utilizado um par *primers*, identificados como OTOF-EX22(F) e OTOF-EX22(R). As sequências dos oligonucleotídeos sintetizados, o tamanho (em pares de bases - pb) do fragmento amplificado e a temperatura de anelamento do par de "primers" são descritos no Quadro 3.

Quadro 3. Sequência dos *primers* para *PCR* do exon 22 do gene *OTOF*.⁽²⁰⁾

<i>Primer</i>	Sequência 5'→3'	Tamanho (pb)	Temperatura de anelamento
OTOF-EX22(F)	TCTCCCTCGCTGACAAGG	390	58°C
OTOF-EX22(R)	ATCCTGAGGGGCCCCAGAGAG		

d) Amplificação do exon 44 do gene *OTOF* pelo teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

Para se detectar a mutação 5473C-G,⁽²⁰⁾ o fragmento do *DNA* genômico, que abrange a região da mutação no exon 44 do gene *OTOF*, foi amplificado pelo teste da *PCR*, com algumas modificações. Para esta reação, foi utilizado um par *primers*, identificados como OTOF-EX44(F) e OTOF-EX44(R). As sequências dos oligonucleotídeos sintetizados, o tamanho (em pares de bases - pb) do fragmento amplificado e a temperatura de anelamento do par de "primers" são descritos no Quadro 4.

Quadro 4. Sequência dos *primers* para *PCR* do exon 44 do gene *OTOF*.⁽²⁰⁾

<i>Primer</i>	Sequência 5'→3'	Tamanho (pb)	Temperatura de anelamento
OTOF-EX44(F)	GTCTGGAGATGTGGCGCCCA	322	59°C
OTOF-EX44(R)	GCCCCTGCCTCTTCTCAGTT		

e) Amplificação do exon 26 do gene *OTOF* pelo teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

Para se detectar a mutação 3032T-C, o fragmento do *DNA* genômico, que abrange a região da mutação no exon 26 do gene *OTOF*, foi amplificado pelo teste da *PCR*. Para esta reação, foi utilizado um par *primers*, identificados como OTOF-EX26(F) e OTOF-EX26 (R).⁽⁵⁹⁾ As sequências dos oligonucleotídeos sintetizados, o tamanho (em pares de bases - pb) do fragmento amplificado e a temperatura de anelamento do par de "primers" são descritos no Quadro 5.

Quadro 5. Sequência dos *primers* para *PCR* do exon 26 do gene *OTOF*.⁽⁵⁹⁾

<i>Primer</i>	Sequência 5'→3'	Tamanho (pb)	Temperatura de anelamento
OTOF-EX26(F)	GTTCCGTGGAAGCTGAGT	307	52°C
OTOF-EX26(R)	TCAGCGCAGGTGGAGTGC		

Cada uma das cinco reações da *PCR* foi processada em ciclador de temperatura (*Bioer Technology*[®], Modelo *TC-XPG*), em reações de 25 µL de volume final, contendo:

- 1) *DNA* (200-300 ng),
- 2) *primers* - 10 pmoles de cada [direto (F) e inverso (R)].
- 3) Conjunto de Reagentes *FideliTaq*TM *PCR MasterMix* (2X) (*GE HEALTHCARE*[®]) composto por: tampão de *PCR* 1X [Tris-HCl - 30 mM (pH 8.4), cloreto de potássio (KCl) - 50 mM], cloreto de magnésio (MgCl₂) - 1,5 mM, *dNTPs* - 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (*dATP*, *dTTP*, *dCTP*, *dGTP*) e *Taq DNA* polimerase - 1,25 U. Protocolo utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

Foi utilizado o seguinte ciclo padrão para as reações da *PCR*, com diferença apenas no tempo de anelamento do *primer*, que é sempre específico para cada par utilizado: inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 94°C por 3 minutos sendo, posteriormente, submetidas a 35 ciclos repetidos de 60 segundos a 94°C para desnaturação, 60 segundos a X°C para anelamento do *primer* (vide respectiva temperatura nos quadros 1 a 5) e 2 minutos a 72°C para extensão e, após os ciclos, 10 minutos a 72°C para extensão final das cadeias.

Os produtos de cada uma das cinco reações da *PCR* foram adicionados ao azul de bromofenol e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão Tris-Borato-EDTA ou TBE 1X, contendo brometo de etídio, na concentração de 0,5 µg/mL,

submetidos à iluminação ultravioleta para confirmar o sucesso das mesmas e o gel, fotodocumentado.

4.2.2.2 Análise de restrição (Técnica da *RFLP*) dos fragmentos amplificados do gene *OTOF*:

a) Exon 18 (mutação 2416T-A):⁽¹²⁾

O fragmento de 258 pb amplificado pela *PCR* foi submetido à análise de restrição (*RFLP*) utilizando-se 5U da enzima *DdeI* - *Desulfovibrio desulfuricans* (New England Biolabs)[®], a 37°C, por 2h30min. Quando a mutação está presente em ambos os alelos (amostra homozigota mutante - AA), o produto da *PCR* é digerido pela enzima, devido o reconhecimento do sítio de restrição enzimático pela substituição das bases nitrogenadas T-A, na posição 2416 do gene *OTOF*, em fragmentos de 204 e 54 pb. Na ausência da mutação, em ambos os alelos (amostra homozigota selvagem - TT), por não haver o reconhecimento do sítio de restrição da enzima, o produto da *PCR* não é digerido, apresentando apenas o fragmento de 258 pb. Quando a mutação está presente em apenas um alelo (amostra heterozigota -TA), o produto da *PCR* do alelo mutante é digerido em dois fragmentos de 204 e 54 pb e o do alelo normal não é digerido, apresentando este um fragmento de 258 pb.

b) Intron 8 (*IVS8-2A-G*):

O fragmento de 490 pb amplificado pela *PCR* foi submetido à análise de restrição (*RFLP*) utilizando-se 5U da enzima *BGIII* - *Bacillus globigii* (New England Biolabs)[®], a 37°C, por 2h30min. Quando a mutação está presente em ambos os alelos (amostra homozigota mutante - GG), o produto da *PCR* não é digerido pela enzima, pois pela substituição das bases nitrogenadas A-G, no intron 8 do gene *OTOF*, não há o

reconhecimento do sítio de restrição enzimático, apresentando apenas um fragmento 490 pb. Na ausência da mutação, em ambos os alelos (amostra homocigota selvagem - AA), o produto da *PCR* é digerido, pelo reconhecimento do sítio de restrição da enzima, apresentando os fragmentos de 341 pb e 149 pb. Quando a mutação está presente em apenas um alelo (amostra heterocigota - AG), o produto da *PCR* do alelo mutante não é digerido apresentando apenas o fragmento de 490 pb e o do alelo normal é digerido, apresentando este dois fragmentos de 341 pb e 149 pb.

c) Exon 22 (mutação 2485C-T):

O fragmento de 390 pb amplificado pela *PCR* foi submetido à análise de restrição (*RFLP*) utilizando-se 5U da enzima *BfaI* - *Bacteroides fragilis* (New England Biolabs)[®], a 37°C, por 2h30min. Quando a mutação está presente em ambos os alelos (amostra homocigota mutante - TT), o produto da *PCR* é digerido pela enzima, devido o reconhecimento do sítio de restrição enzimático pela substituição das bases nitrogenadas C-T, na posição 2485 do gene *OTOF*, em fragmentos de 288 pb e 102 pb. Na ausência da mutação, em ambos os alelos (amostra homocigota selvagem - CC), por não haver o reconhecimento do sítio de restrição da enzima, o produto da *PCR* não é digerido, apresentando apenas o fragmento de 390 pb. Quando a mutação está presente em apenas um alelo (amostra heterocigota - CT), o produto da *PCR* do alelo mutante é digerido em dois fragmentos de 288 e 102 pb e o do alelo normal não é digerido, apresentando este um fragmento de 390 pb.

d) Exon 44 (mutação 5473C-G)

O fragmento de 322 pb amplificado pela *PCR* foi submetido à análise de restrição (*RFLP*) utilizando-se 5U da enzima *FauI* - *Flavobacterium aquaticum* (New

England Biolabs)[®], a 55°C, por 2h30min. Quando a mutação está presente em ambos os alelos (amostra homozigota mutante - GG), o produto da *PCR* não é digerido pela enzima, pois pela substituição das bases nitrogenadas C-G, na posição 5473 do gene *OTOF*, não há o reconhecimento do sítio de restrição enzimático, apresentando apenas um fragmento 322 pb. Na ausência da mutação, em ambos os alelos (amostra homozigota selvagem - CC), o produto da *PCR* é digerido, pelo reconhecimento do sítio de restrição da enzima, apresentando os fragmentos de 213 pb e 109 pb. Quando a mutação está presente em apenas um alelo (amostra heterozigota - CG), o produto da *PCR* do alelo mutante não é digerido apresentando apenas o fragmento de 322 pb e o do alelo normal é digerido, apresentando este dois fragmentos de 213 pb e 109 pb.

e) Exon 26 (mutação 3032T-C):⁽⁵⁹⁾

O fragmento de 307 pb amplificado pela *PCR* foi submetido à análise de restrição (*RFLP*) utilizando-se 5U da enzima *MspI* - *Moraxella species* (New England Biolabs)[®], a 37°C, por 2h30min. Quando a mutação está presente em ambos os alelos (amostra homozigota mutante - TT), o produto da *PCR* é digerido pela enzima, devido o reconhecimento do sítio de restrição enzimático pela substituição das bases nitrogenadas C-T, na posição 2485 do gene *OTOF*, em fragmentos de 172 pb e 135 pb. Na ausência da mutação, em ambos os alelos (amostra homozigota selvagem - CC), por não haver o reconhecimento do sítio de restrição da enzima, o produto da *PCR* não é digerido, apresentando apenas o fragmento de 322 pb. Quando a mutação está presente em apenas um alelo (amostra heterozigota - CT), o produto da *PCR* do alelo mutante é digerido em dois fragmentos de 172 e 135 pb e o do alelo normal não é digerido, apresentando este um fragmento de 322 pb.

Os produtos das cinco reações de restrição (*RFLP*) foram adicionados ao azul de bromofenol e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão Tris-Borato-EDTA ou TBE 1X, contendo brometo de etídio, na concentração de 0,5 µg/mL, submetidos à iluminação ultravioleta para confirmar o sucesso das mesmas e o gel, fotodocumentado.

4.3 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos previamente à estatística descritiva para determinação da normalidade. Foram utilizados o teste *t* bicaudal de *Student* para amostras independentes com distribuição normal e o teste de *Mann-Whitney* para amostras com distribuição não normal. Quando aplicáveis, foram utilizados o teste *Chi-square* para comparação entre as variáveis e o *odds ratio* com intervalo de confiança de 95% (IC-95%). O nível de significância foi estabelecido em 5%. Os testes estatísticos foram realizados usando o programa GraphPad InStat version 3.00, GraphPad Software Inc, San Diego California USA, www.graphpad.com. A coerência da distribuição genotípica com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada por testes exatos.⁽⁶⁶⁻⁶⁷⁾

5 RESULTADOS

Do total de 16 casos índice do Grupo NPT, 9 (56%) são do gênero feminino e 7 (44%) do gênero masculino. Em relação à faixa etária, a idade variou de 8 a 65 anos para o gênero feminino (Média M-24,2 anos; DP±20,1) e para o gênero masculino a idade variou de 1 a 38 anos (M-14,1 anos; DP±15,7), não sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,29$).

Dos 13 pacientes do Grupo DASN, 7 (54%) são do gênero masculino e 6 (46%) do gênero feminino. Em relação à faixa etária, a idade variou de 7 a 37 anos para o gênero masculino (Média M-22,7 anos; DP±12,6) e para o gênero feminino a idade variou de 12 a 45 anos (M-33,3 anos; DP±12,3), não havendo significância estatística ($p=0,15$).

Em relação aos 20 indivíduos do Grupo Controle, 13 (65%) são do gênero masculino e 7 (35%) do gênero feminino. Em relação à faixa etária, a idade variou de 19 a 44 anos para o gênero masculino (Média M-28,5 anos; DP±7,2) e para o gênero feminino a idade variou de 20 a 35 anos (M-26,3 anos; DP±6,3), sem diferença estatística significativa ($p=0,49$).

Considerando as variáveis demográficas entre os pacientes dos três Grupos, houve prevalência do gênero feminino em todos os três, não sendo esta relação estatisticamente significativa ($p=0,49$). Ambos os grupos, DASN e Controle, tiveram maior prevalência na classificação etária de adulto jovem, perfazendo o total de 55% e 95%, respectivamente. O Grupo NPT teve maior prevalência na faixa infante (38%). A análise estatística para esta variável demográfica não mostrou significância entre os grupos ($p=0,37$). Da mesma forma, os valores médios da idade entre os três Grupos não foram significantes ($p=0,091$) (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das variáveis demográficas dos casos índice do Grupo NPT, pacientes do Grupo DASN e indivíduos do Grupo Controle.

<i>Variáveis</i>	<i>Grupo NPT</i> (<i>n=16</i>)	<i>Grupo DASN</i> (<i>n=13</i>)	<i>Grupo Controle</i> (<i>n=20</i>)	<i>p</i>
Gênero	n (%)	n (%)	n (%)	
Masculino	7 (44)	7 (54)	13 (65)	0,49*
Feminino	9 (56)	6 (46)	7 (35)	
Classificação etária	n (%)	n (%)	n (%)	
Lactente	1 (06)	0 (00)	0 (00)	0,37*
Infante	6 (38)	2 (15)	0 (00)	
Adolescente	3 (19)	2 (15)	0 (00)	
Adulto jovem	4 (25)	7 (55)	19 (95)	
Adulto	2 (12)	2 (15)	1 (05)	
Idoso	0 (00)	0 (00)	0 (00)	
Idade	M ± DP	M ± DP	M ± DP	
Anos	19,8 ± 18,5	27,6 ± 13,1	19,8 ± 18,5	0,091†

*Teste qui-quadrado para amostras independentes.

†Teste de *Kruskal-Wallis*.

M ± DP: Média ± Desvio Padrão.

Os resultados obtidos após realização das técnicas moleculares: extração de *DNA* genômico, *PCR* e *RFLP* com posterior eletroforese em gel de agarose, estão descritos a seguir:

5.1 Extração do *DNA* genômico

Após realização da técnica de extração de *DNA* genômico, foi possível a extração do mesmo, a partir de leucócitos de sangue periférico, de todas as amostras dos três grupos do estudo (n=49 - 100%) (Figura 10).

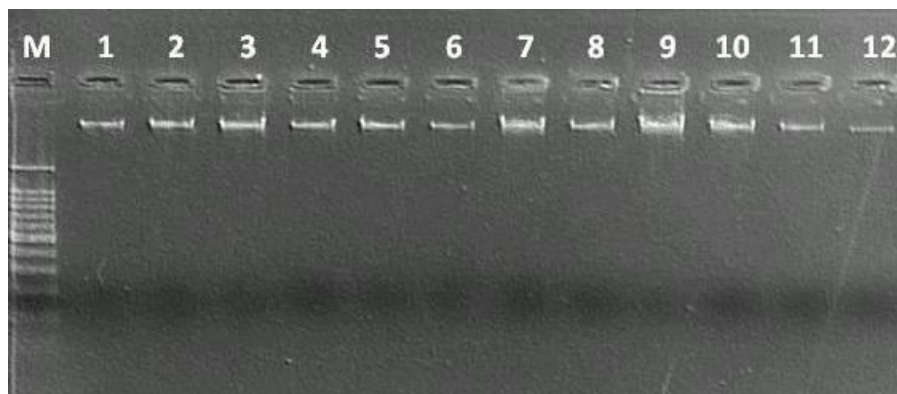


Figura 10. Fotografia do *DNA* genômico das amostras identificadas de 1 a 12, em gel de agarose 1%.M- marcador 100 pb (Ladder[®]).

5.2 Técnica da *PCR*:

a) Amplificação de fragmento do exon 18:

A reação da *PCR* permitiu a amplificação do fragmento de 258 pb que abrange a região mutante, em todas as amostras analisadas dos três Grupos do estudo (n=49 - 100%) (Figura 11).

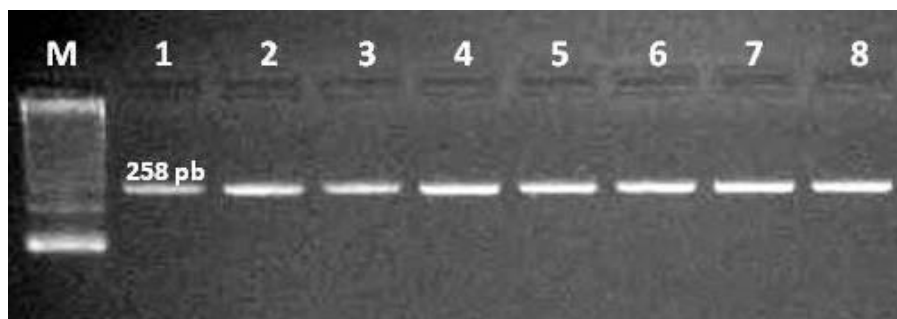


Figura 11. Fotografia do produto da *PCR* - fragmento de 258 pb amplificado do exon 18 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 8 - amostras do estudo. M- marcador 100 pb (Ladder[®]).

b) Amplificação de fragmento do intron 8:

A reação da *PCR* permitiu a amplificação do fragmento de 490 pb que abrange a região mutante, em todas as amostras analisadas dos três Grupos do estudo (n=49 - 100%) (Figura 12).

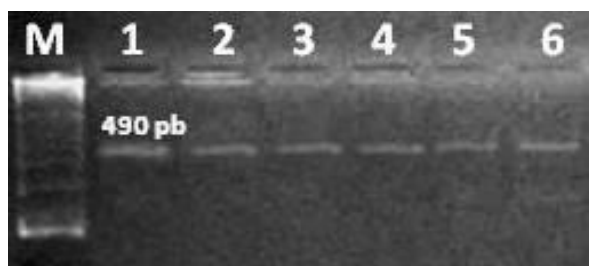


Figura 12. Fotografia do produto da PCR - fragmento de 490 pb amplificado do intron 8 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 6 - amostras do estudo. M- marcador 100 pb (Ladder[®]).

c) Amplificação de fragmento do exon 22:

A reação da *PCR* permitiu a amplificação do fragmento de 390 pb que abrange a região mutante, em todas as amostras analisadas dos três Grupos do estudo (n=49 - 100%) (Figura 13).

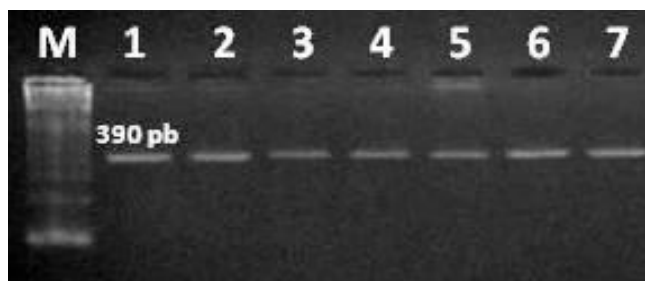


Figura 13. Fotografia do produto da PCR - fragmento de 390 pb amplificado do exon 22 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 7 - amostras do estudo. M- marcador 100 pb (Ladder[®]).

d) Amplificação de fragmento do exon 44:

A reação da *PCR* permitiu a amplificação do fragmento de 322 pb que abrange a região mutante, em todas as amostras analisadas dos três Grupos do estudo (n=49 - 100%) (Figura 14).

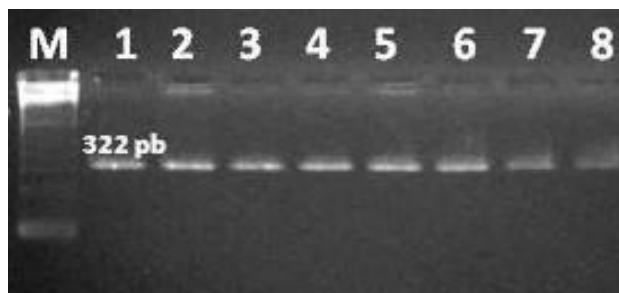


Figura 14. Fotografia do produto da PCR - fragmento de 322 pb amplificado do exon 44 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 7- amostras do estudo. M- marcador 100 pb (Ladder[®]).

e) Amplificação de fragmento do exon 26:

A reação da *PCR* permitiu a amplificação do fragmento de 307 pb que abrange a região mutante, em todas as amostras analisadas dos três Grupos do estudo (n=49 - 100%) (Figura 15).

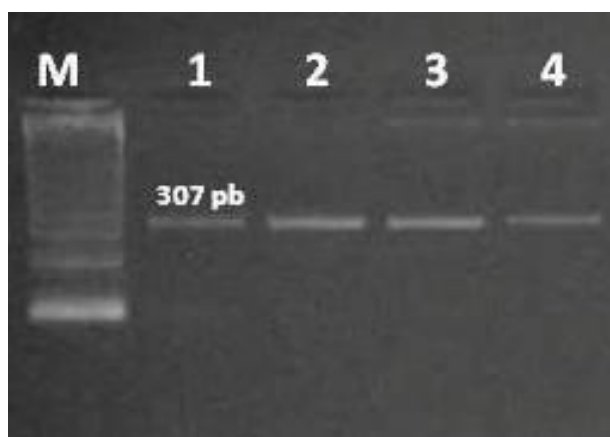


Figura 15. Fotografia do produto da PCR - fragmento de 307 pb amplificado do exon 26 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 4 - amostras do estudo. M- marcador 100 pb (Ladder[®]).

5.3 Técnica da *RFLP* (Digestão Enzimática) de cada fragmento amplificado do gene *OTOF*

As Figuras 16, 17, 18, 19, 20 representam, respectivamente, os resultados da digestão enzimática para identificação de cada uma cinco mutações no gene *OTOF* no exon 18 (mutação 2416T-A), no intron 8 (*IVS8-2A-G*), no exon 22 (mutação 2485C-T), no exon 44 (mutação 5473C-G) e no exon 26 (mutação 3032T-C).

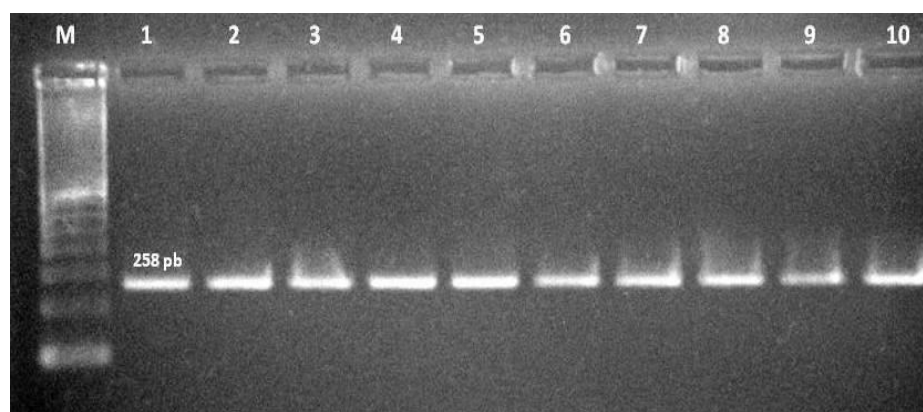


Figura 16. Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmento de 258 pb do exon 18 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 10 – genótipos das amostras do estudo: TT (homozigoto selvagem). M- marcador 100 pb (Ladder®).

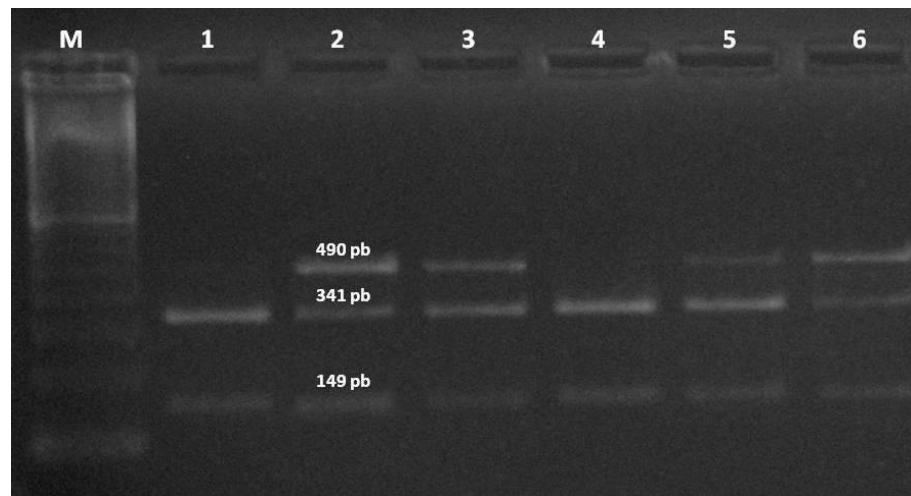


Figura 17. Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmentos de 490, 341 e 149 pb do intron 8 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 e 4 – genótipos das amostras do estudo: AA (homozigoto selvagem). Colunas 2, 3, 5 e 6 – genótipos das amostras do estudo: AG (heterozigoto). M- marcador 100 pb (Ladder[®]).

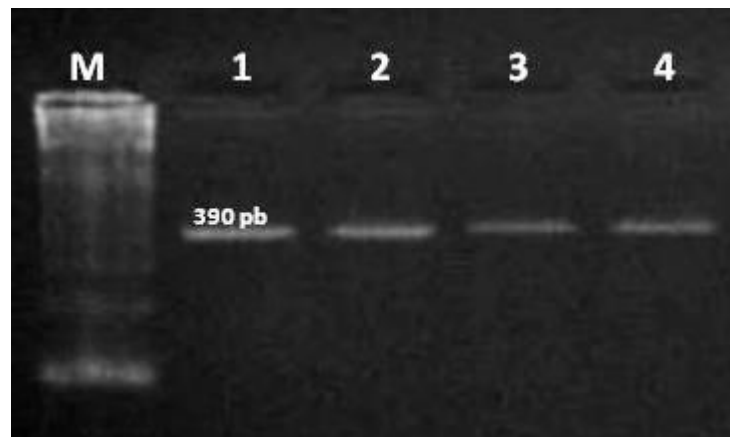


Figura 18. Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmento de 390 pb do exon 22 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 4 – genótipos das amostras do estudo: CC (homozigoto selvagem). M- marcador 100 pb (Ladder[®]).

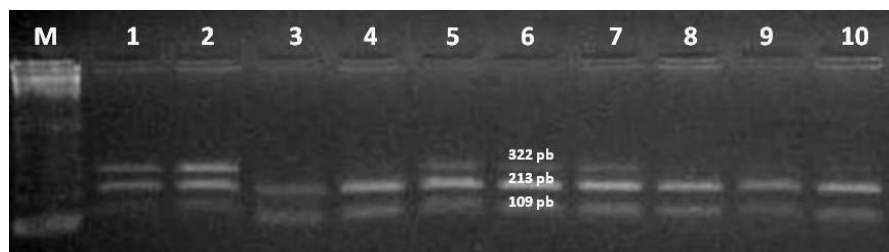


Figura 19. Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmentos de 322, 213 e 109 pb do exon 44 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1, 2, 5, 6 e 7 – genótipos das amostras do estudo: CG (heterozigoto). Colunas 3, 4 8, 9 e 10 – genótipos das amostras do estudo: CC (homozigoto selvagem). M- marcador 100 pb (Ladder®).

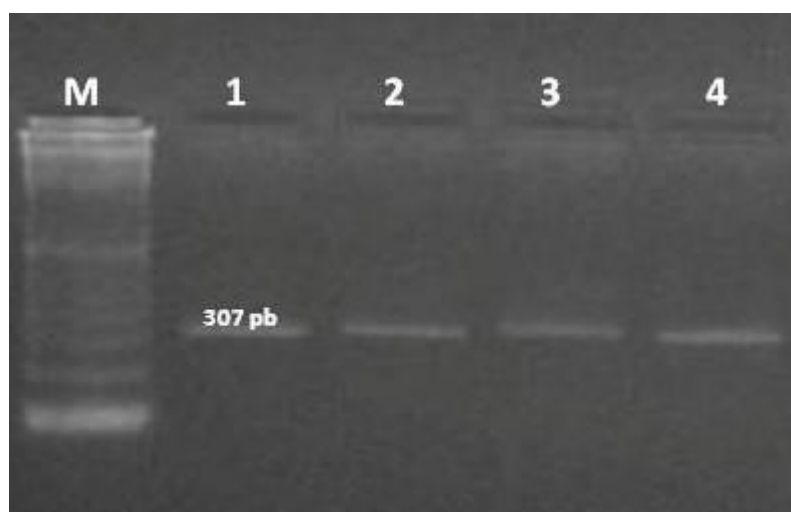


Figura 20. Fotografia do produto da *RFLP* (digestão enzimática) - fragmento de 307 pb do exon 26 do gene *OTOF*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 4 – genótipos das amostras do estudo: TT (homozigoto selvagem). M- marcador 100 pb (Ladder®).

A Tabela 3 apresenta a distribuição, em porcentagens, dos genótipos encontrados nos três grupos avaliados para as cinco mutações no gene *OTOF*. No Grupo NPT, 13 (81%) casos índice apresentam o genótipo selvagem (AA) e 3 (19%) o genótipo heterozigoto AG para a mutação *IVS8-2A-G* (intron 8). A mutação *5473C-G* (exon 44) foi encontrada em heterozigose (CG) em 7 (44%) dos casos índice e 9 (56%) apresentam o genótipo selvagem (CC). Nos Grupos DASN e Controle, 100% dos indivíduos não apresentam qualquer das mutações analisadas no gene *OTOF*.

Tabela 3. Distribuição, em porcentagens, dos genótipos encontrados nos três grupos avaliados para as cinco mutações no gene *OTOF*.

Genótipo	Grupo NPT (n=16) n (%)	Grupo DASN (n=13) n (%)	Grupo Controle (n=20) n (%)
2416T-A Exon 18			
TT	16 (100)	13 (100)	20 (100)
TA	0	0	0
AA	0	0	0
<i>IVS8-2A-G</i> Intron 8			
AA	13 (81)	13 (100)	20 (100)
AG	3 (19)	0	0
GG	0	0	0
2485C-T Exon 22			
CC	16 (100)	13 (100)	20 (100)
CT	0	0	0
TT	0	0	0
5473C-G Exon 44			
CC	9 (56)	13 (100)	20 (100)
CG	7 (44)	0	0
GG	0	0	0
3032T-C Exon 26			
TT	16 (100)	13 (100)	20 (100)
TC	0	0	0
CC	0	0	0

A Tabela 4 demonstra os genótipos identificados nos casos índice do Grupo NPT dentre as cinco mutações analisadas no gene *OTOF* e, pela qual, verifica-se que

foram encontrados 8 (50%) casos índice com mutações no gene *OTOF*, sendo um (12,5%; F1.3) heterozigoto para a mutação *IVS8-2A-G* (intron 8), cinco (62,5%; F1.2, F4.1, FBT1, FBT3.1 e FBT4.2) heterozigotos para a mutação *5473C-G* (exon 44) e dois (25%; F1.1 e F5GI) heterozigotos compostos para as mutações encontradas no intron 8 e exon 44. Dos familiares ouvintes, a mãe da Família 1 (F1.M) é heterozigota composta para as mutações encontradas no intron 8 e exon 44 e as mães das Famílias FBT3 e FBT4 (FBT3.M e FBT4.M, respectivamente) são heterozigotas apenas para a mutação *5473C-G* (exon 44).

Tabela 4. Apresentação dos genótipos encontrados nos casos índice do Grupo NPT dentre as cinco mutações analisadas no gene *OTOF*.

Casos índice (Grupo NPT) e familiares ouvintes	2416T-A exon 18	IVS8-2A-G intron 8	2485C-T exon 22	5473C-G exon 44	3032T-C exon 26
F1.P	-/- (TT)	-/- AA	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
F1.M	-/- (TT)	-/+ (AG)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
<u>F1.1</u>	-/- (TT)	-/+ (AG)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
<u>F1.2</u>	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
<u>F1.3</u>	-/- (TT)	-/+ (AG)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
<u>F2.2 M</u>	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
<u>F2.3</u>	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
<u>F2.6</u>	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
<u>F2.11</u>	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
F3.P	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
F3.M	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
F3.2	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
<u>F3.3</u>	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
<u>F4.1</u>	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
<u>F5.GI</u>	-/- (TT)	-/+ (AG)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
F5.GII	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
<u>F6.1</u>	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
<u>FBT1</u>	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
<u>FBT2</u>	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
FBT3.M	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
<u>FBT3.1</u>	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
FBT4.M	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
FBT4.1	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
<u>FBT4.2</u>	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
FBT5.GI	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
<u>FBT5.GII</u>	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)

Sublinhado → casos índice com neuropatia auditiva (NPT)

-/- → genótipo homocigoto selvagem para a mutação analisada

-/+ → genótipo heterocigoto para a mutação analisada em caso índice

-/+ → genótipo heterocigoto para a mutação analisada em familiar ouvinte

F → Família; P → Pai do caso-índice; M → Mãe do caso-índice; GI → Gemelar I; GII → Gemelar II

A Tabela 5 apresenta, em *odds ratio*, a relação dos genótipos encontrados no estudo entre casos índice NPT e pacientes do Grupo DASN. Não houve diferença estatística do genótipo AA (selvagem) no intron 8 entre casos índice NPT x Grupo DASN, mesmo ambos os grupos terem apresentado igual prevalência. E, apesar de somente o Grupo NPT ter apresentado o genótipo AG, a diferença também não foi significativa. Em relação aos genótipos no exon 44, o genótipo CC (selvagem) foi mais prevalente no Grupo DASN e o heterozigoto (CG) somente prevalente no Grupo NPT, sendo estas diferenças estatisticamente significantes.

Tabela 5. Relação genotípica entre casos índice do Grupo NPT e Grupo DASN, respectivamente, para as mutações no Intron 8 e Exon 44 do gene *OTOF*.

Genótipos (NPT x DASN)	Odds ratio (OR)	IC 95%	p
AA (13 x 13)	0,1429	0,007-3,04	0,2315
AG (3 x 0)	7,0	0,33-149,0	
CC (9 x 13)	0,047	0,024-0,92	0,0084
CG (7 x 0)	21,32	1,08-420,2	

IC - intervalo de confiança de 95%

A Tabela 6 apresenta, também em *odds ratio*, a relação dos genótipos encontrados no estudo, mas entre casos índice NPT e pacientes do Grupo Controle. Não houve diferença estatística do genótipo AA (selvagem) no intron 8 entre casos índice NPT x Grupo Controle, mesmo tendo o Grupo Controle apresentado prevalência pouco maior. E, apesar de somente o Grupo NPT ter apresentado o genótipo AG, a diferença também não foi significativa. Em relação aos genótipos no exon 44, o genótipo CC (selvagem) foi mais prevalente no Grupo Controle e o heterozigoto (CG) somente prevalente no Grupo NPT, sendo estas diferenças estatisticamente significantes.

Tabela 6. Relação genotípica entre casos índice do Grupo NPT e Grupo Controle (GC), respectivamente, para as mutações no Intron 8 e Exon 44 do gene *OTOF*.

Genótipos (NPT x GC)	Odds ratio (OR)	IC 95%	P
AA (13 x 20)	0,094	0,004-1,97	0,078
AG (3 x 0)	10,63	0,51-222,8	
CC (9 x 20)	0,031	0,001-0,59	0,0014
CG (7 x 0)	32,37	1,67-627,8	

IC - intervalo de confiança de 95%

O Grupo NPT foi avaliado para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg⁽⁶⁶⁻⁶⁷⁾ em relação às mutações encontradas no intron 8 e exon 44. De acordo com os cálculos obtidos, as frequências alélicas A (alelo selvagem) e G (alelo mutante) da mutação IVS8-2A-G no intron 8, para os casos índice do Grupo NPT, foram A=0,91 e G=0,09. As frequências genotípicas observadas do homocigoto selvagem (AA-13), heterocigoto mutante (AG-3) e homocigoto mutante (GG-0) destes casos índice estão em concordância com as frequências esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (AA-13,14; AG-2,72 e GG-0,14; $\chi^2 = 0,171$, p=0,68). Em relação à mutação 5473C-G no exon 44, as frequências alélicas C (alelo selvagem) e G (alelo mutante), para os casos índice do Grupo NPT, foram C=0,78 e G=0,22. Para esta mutação, as frequências genotípicas observadas do homocigoto selvagem (CC-9), heterocigoto mutante (CG-7) e homocigoto mutante (GG-0) destes casos índice também estão em concordância com as frequências esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (CC-9,77; CG-5,47 e GG-0,77; $\chi^2 = 0,125$, p=0,26). O valor do χ^2 indica a diferença entre os valores observados e esperados, para a contagem do genótipo. Quando $\chi^2 < 3,84$ / p>0,05 não há diferença entre os valores genotípicos, estando a população em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Em relação ao grau de perda auditiva encontrado nos casos índice do Grupo NPT, 3 (19%) apresentam grau leve, 5 (31%) grau moderado, 5 (31%) grau grave e três

(19%) grau muito grave. No Grupo DASN, 4 (31%) apresentam grau moderado, 2 (15%) grau grave e 7 (54%) grau muito grave. Não houve casos, neste Grupo, com perda leve. A análise estatística para a variável grau de perda não revelou significância entre ambos os grupos ($p=0,124$).

Devido a identificação de mutação somente no intron 8 e exon 44 no gene *OTOF*, a Tabela 7 demonstra os graus de perda auditiva nos casos índice do Grupo NPT e os genótipos encontrados nos mesmos, pela análise molecular destas regiões.

Tabela 7. Apresentação do grau de perda auditiva e os genótipos encontrados no Intron 8 e Exon 44 do gene *OTOF*, nos casos índice do Grupo NPT.

<u>Grupo NPT</u>	<u>Grau de perda auditiva</u>	<u>IVS8-2A-G intron 8</u>	<u>5473C-G exon 44</u>
<u>F1.1</u>	Muito Grave	-/+ (AG)	-/+ (CG)
<u>F1.2</u>	Grave	-/- (AA)	-/+ (CG)
<u>F1.3</u>	Grave	-/+ (AG)	-/- (CC)
<u>F2.2 M</u>	Leve	-/- (AA)	-/- (CC)
<u>F2.3</u>	Moderada	-/- (AA)	-/- (CC)
<u>F2.6</u>	Leve	-/- (AA)	-/- (CC)
<u>F2.11</u>	Moderada	-/- (AA)	-/- (CC)
<u>F3.3</u>	Moderada	-/- (AA)	-/- (CC)
<u>F4.1</u>	Grave	-/- (AA)	-/+ (CG)
<u>F5.GI</u>	Muito Grave	-/+ (AG)	-/+ (CG)
<u>F6.1</u>	Grave	-/- (AA)	-/- (CC)
<u>FBT1</u>	Moderada	-/- (AA)	-/+ (CG)
<u>FBT2</u>	Moderada	-/- (AA)	-/- (CC)
<u>FBT3.1</u>	Grave	-/- (AA)	-/+ (CG)
<u>FBT4.2</u>	Muito Grave	-/- (AA)	-/+ (CG)
<u>FBT5.GII</u>	Leve	-/- (AA)	-/- (CC)

A Tabela 8 apresenta a distribuição, em porcentagens, dos casos índice do Grupo NPT com e sem mutação relacionada ao grau de perda auditiva. Dentre os casos índice com mutação, os que apresentam os graus grave e muito grave foram mais prevalentes do que aqueles sem mutação, do mesmo Grupo ($p=0,022$).

Tabela 8. Distribuição, em porcentagens, dos graus de perda auditiva em relação à presença ou ausência de mutação no gene *OTOF*, nos casos índice do Grupo NPT.

Mutação no Grupo NPT	Grau de perda auditiva				Total n (%)	<i>p</i> *
	Leve n (%)	Moderada n (%)	Grave n (%)	Muito Grave n (%)		
Presente	0 (00)	1 (06)	4 (25)	3 (19)	8 (50)	0,022
Ausente	3 (19)	4 (25)	1 (06)	0 (00)	8 (50)	
Total	3 (19)	5 (31)	5 (31)	3 (19)	16 (100)	

6 DISCUSSÃO

A Neuropatia Auditiva é um distúrbio auditivo caracterizado pela distorção grave ou ausência do potencial evocado auditivo do tronco encefálico (PEATE) com as emissões otoacústicas (EOAs) preservadas, indicando assim, a presença de integridade das células ciliadas externas. Portanto, na neuropatia auditiva a lesão está localizada nas células ciliadas internas, podendo estar também no nervo auditivo ou na sinapse entre ambas as estruturas.⁽⁶⁸⁾

Dentre as causas já identificadas de neuropatia auditiva, estão a hiperbilirrubinemia, a hipoxia neonatal ou doenças neurodegenerativas. No entanto, muitas vezes sua etiologia permanece desconhecida. Mas, há relatos de vários casos, principalmente em crianças, de neuropatia auditiva "isolada", isto é, sem qualquer fator de risco associado, não tendo sido proposto qualquer mecanismo fisiopatológico para explicar esses casos atípicos.^(34,69-70) Os recentes avanços na pesquisa genética tem permitido uma nova abordagem para elucidar a fisiopatologia dessa afecção.⁽⁷¹⁾ Mutações no gene *OTOF*, que codifica a proteína otoferlina, são responsáveis por um tipo de perda auditiva não sindrômica de herança autossômica recessiva (DFNB9) apresentando as características da neuropatia auditiva. Até o presente momento, cerca de 71 variantes patogênicas do gene *OTOF* já foram descritas, sendo que a maioria das mutações conhecidas são do tipo missense/nonsense, splicing ou frameshift.⁽⁷²⁾ Essas mutações foram primeiramente identificadas em famílias consanguíneas provenientes do Oriente Médio ou em grupos étnicos isolados nessa região geográfica e em algumas famílias espanholas. Mas, dados indicam que a prevalência de mutações no gene *OTOF* tem sido subestimada.⁽⁶⁸⁾

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar a prevalência de cinco mutações no gene *OTOF* [2416T-A (Y730X) no exon 18, *IVS8-2-A-G* no intron8, 2485C-T (Q829X) no exon 22, 5473C-G (Pro1825Ala) no exon 44 e 3032T-C (Leu1011Pro) no exon 26] em 16 pacientes com diagnóstico de neuropatia auditiva. Também foram selecionados 20 indivíduos ouvintes e 13 pacientes com DASN cujos exames audiológicos não correspondem ao quadro clínico de neuropatia auditiva e que haviam sido submetidos à análise molecular dos genes da *Conexina 26* e *GJB6* em pesquisa anterior e não apresentam, respectivamente, as mutações 35 delG e $\Delta(GJB6-D13S1830)$. Estes foram incluídos a fim de se verificar se mutações no gene *OTOF* poderiam ser identificadas em ouvintes e em pacientes com DASN sem outras mutações e sem neuropatia auditiva.

Em relação as variáveis demográficas analisadas, não houve diferença estatística houve dos gêneros entre os três grupos do estudo. Ambos os grupos, DASN e Controle, tiveram maior prevalência na classificação etária de adulto jovem e o Grupo NPT maior prevalência na faixa infante, dados que não revelaram diferença significativa. Da mesma forma, os valores médios da idade entre os três Grupos não foram significantes. Estes dados são concordantes com os poucos relatos existentes na literatura sobre a prevalência de gênero e faixa etária relacionados ao gene *OTOF*.^(44,73)

A maior parte dos relatos de mutações identificadas no gene *OTOF* tem sido descritos em homozigose e ou em famílias consanguíneas.^(12,44,51,55,57,74-77) Dentre as cinco mutações analisadas no gene *OTOF*, foram encontradas somente as mutações *IVS8-2A-G* no intron 8 e a mutação 5473C-G no exon 44, acometendo 50% dos casos índice do estudo. Diferentemente da literatura, todos os casos índice são descendentes

de casamentos não consanguíneos, evidenciando que mutações no gene *OTOF* que estão associadas à neuropatia auditiva, podem ocorrer nestes casos.

Casos de heterozigose em pacientes com neuropatia auditiva foram descritos na literatura, associados ou não a casamento consanguíneo.^(20-21,41,60-62,78-79) No presente estudo, a mutação *IVS8-2A-G* no intron 8 foi encontrada em heterozigose (um alelo mutante) em 12,5% dentre os oito casos índice com mutação, o mesmo ocorrendo para a mutação *5473C-G* no exon 44 a qual foi encontrada em 62,5% dos casos. Em 25% dos casos as duas mutações identificadas ocorreram conjuntamente no mesmo indivíduo os quais, por isto, são denominados de heterozigotos compostos. Estas duas mutações, assim como as outras três analisadas [*2416T-A* (*Y730X*) no exon 18, *2485C-T* (*Q829X*) no exon 22 e *3032T-C* (*Leu1011Pro*) no exon 26] não foram encontradas em todos os 13 pacientes do Grupo *DASN* (100%) e em todos os 20 indivíduos do Grupo Controle (100%), dados estes concordantes com os da literatura.^(20-21,41,60-62,78-79)

Em 2000, a mutação *IVS8-2A-G* no intron 8 foi primeiramente descrita em três irmãos indianos nascidos de casamento consanguíneo. A mesma substituição foi encontrada em heterozigose nos pais e nos irmãos não afetados. Nos 109 indivíduos ouvintes do grupo controle, a mutação não foi identificada.⁽⁵¹⁾ Não há relatos posteriores a esse sobre a identificação desta mutação. A mutação *5473C-G* no exon 44 foi descrita em heterozigose composta em uma família espanhola sendo, a mutação *2485C-T* (*Q829X*) no exon 22, a identificada no outro alelo.⁽²⁰⁾ Da mesma forma, não há relatos posteriores sobre a referida mutação no exon 44.

As mutações *5473C-G* (*Pro1825Ala*) no exon 44 e *2485C-T* (*Q829X*) no exon 22 foram as primeiras a serem identificadas em países do Ocidente, particularmente na Espanha e em famílias de casamentos consanguíneos ou não.⁽²⁰⁾ A mutação *5473C-G* no

exon 44 parece ser rara na população espanhola. Em contraste, a mutação 2485C-T (Q829X) no exon 22 é responsável por cerca de 3% de todos os casos de deficiência auditiva autossômica recessiva na população espanhola e 4,4% dos casos familiares ou esporádicos de surdez pré-lingual, negativos para mutações no gene da Conexina 26, nessa mesma população.⁽²⁰⁾

A mutação *nonsense* IVS8-2A-G no intron 8, por criar um prematuro *stop codon*, e a transversoão 5473C-G no exon 44, por alterar a capacidade de ligação com o Ca^{+2} no gene mutante, são consideradas patogênicas, quando em homozigose.^(12,20) No presente estudo, ambas foram encontradas em heterozigose composta somente nos casos-índice com neuropatia auditiva (F1.1 e F5.GI), o que poderia explicar a causa molecular da perda auditiva nos mesmos, pois o fenótipo de neuropatia auditiva tem sido observado em pacientes portadores de duas mutações afetando todas as isoformas da proteína otoferlina ou uma mutação afetando a isoforma longa e a outra a isoforma curta. Isto significa que qualquer combinação de mutações bialélicas no gene *OTOF* pode resultar na neuropatia auditiva por serem parcialmente relacionadas à natureza (truncada ou não truncada) ou à localização (isoforma longa ou curta) das mesmas.⁽⁷⁸⁾

Mas, na mãe ouvinte (F1.M) do caso índice (F1.1) heterozigoto composto também foram encontradas as mesmas mutações (IVS8-2A-G no intron 8 e 5473C-G no exon 44) em heterozigose composta. Como a mãe é ouvinte, a causa da deficiência auditiva do caso índice em questão pode ser devida a outra mutação existente em outros exons ou em outros sítios de *splice*, ou ter mutações mais complexas, tais como grandes deleções ou outros rearranjos de sequência, que necessitariam de abordagem molecular mais específica da que a ora utilizada. Do mesmo modo, estas hipóteses também podem

ser aplicadas para explicar a deficiência auditiva nos seis casos índice restantes, por serem portadores de uma das mutações identificadas em apenas um dos alelos.

Referências brasileiras não relataram as mutações identificadas no presente estudo.⁽⁶⁰⁻⁶²⁾ Dentre esses estudos, somente um deles identificou a mutação 2485C-T (Q829X) no exon 22 em heterozigose em 0,5% do total de casos de pacientes com deficiência auditiva sensorineural não sindrômica (1/200).⁽⁶⁰⁾ Ainda nesse, mutações outras no gene *OTOF* foram a causa da deficiência auditiva em 2% dos casos da amostra total e, dentre os pacientes com neuropatia auditiva, a prevalência foi de 50%, igualmente a encontrada no presente estudo, apesar da identificação de mutações diferentes em ambos os estudos.

A relação dos genótipos encontrados no estudo para a mutação *IVS8-2A-G* no intron 8 entre casos índice e pacientes do Grupo DASN e entre Grupo Controle não foi de significância estatística, apesar de somente os casos índice terem apresentado o genótipo mutante heterozigoto (AG). Este fato talvez possa ser devido ao fato de poucos casos mutantes encontrados nesta mutação. Mas, em relação aos genótipos identificados para a mutação *5473C-G* no exon 44 entre casos índice e pacientes do Grupo DASN e entre Grupo Controle, a diferença para o genótipo mutante heterozigoto (CG) foi estatisticamente significativa, talvez pela presença deste genótipo apenas nos casos índice e em maior prevalência que a mutação no intron 8.

A análise dos dados genotípicos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg revelou que a população do estudo estando em equilíbrio, pode ser considerada homogênea, apesar do pequeno número de casos, pois as frequências observadas no estudo foram concordantes com as frequências esperadas, indicando que as frequências genotípicas não foram

afetadas por fatores que geralmente interferem na análise genotípica de uma população, tais como endogamia, desvio ou seleção genética.

As estimativas da prevalência da neuropatia auditiva na população de surdos variam entre 1 a 19%.⁽²⁵⁻²⁸⁾ No Brasil, a prevalência encontrada de neuropatia auditiva em três anos de registro dentre todos os casos de surdez foi de 1,2%, estando dentro dos índices internacionais.⁽⁸⁰⁾ Essa faixa grande de variação pode ser devida ao fato de que diferentes populações foram estudadas ou por diferenças nos critérios utilizados para identificar pacientes com esta afecção. A prevalência de neuropatia auditiva dentro de uma população sem fatores de risco não está ainda bem estabelecida.^(33,58) No presente estudo todos os critérios de inclusão e exclusão foram rigorosamente seguidos, determinando-se assim a prevalência de 1,3% de casos com neuropatia auditiva dentro de uma população com surdez sensorineural no período estudado.

Também, a estimativa brasileira dos graus de perda nos pacientes com neuropatia auditiva varia entre 29,6% grau leve; 55,5% grau moderado; 7,4% grau grave e 7,5% muito grave.⁽⁸⁰⁾ No presente estudo 19% apresentam grau leve, 31% grau moderado, 31% grau grave e 19% grau muito grave, estando de acordo com os dados da literatura.⁸⁰ Dentre os casos índice com mutações no gene *OTOF*, houve prevalência estatisticamente significativa dos graus grave e muito grave em relação aos graus de perda leve e moderado nos casos índice sem mutação.

A intensidade da perda auditiva causada pela neuropatia auditiva pode variar de leve a muito grave, havendo uma queda desproporcional (escores) para a compreensão da palavra falada em testes verbais que não correspondem ao audiograma tonal. Há certa homogeneidade na literatura, na descrição do fenótipo dos pacientes portadores de mutações no gene *OTOF* o qual, geralmente, é caracterizado por deficiência auditiva

congenita ou pré-lingual de grau muito grave e não associado a outras anormalidades conforme os casos índice aqui apresentados. Sendo assim, a neuropatia auditiva seria a única manifestação fenotípica de mutações no gene *OTOF*.^(58,81)

Conforme descrito, o gene *OTOF* se expressa nas células sensoriais da cóclea, fundamentalmente nas células ciliadas internas e em menor extensão, nas células ciliadas externas. Sendo assim, admite-se que a lesão primária na neuropatia auditiva, decorrente de mutações no gene *OTOF*, está nas células ciliadas internas, ocasionando distinguível perda auditiva pela relativa preservação da função das células ciliadas externas. Não está bem definido ainda se esta preservação é um fenótipo consistente e estável para este específico tipo de perda auditiva genética, pois as células ciliadas externas poderiam ser afetadas de modo semelhante às células internas, mas de forma menos intensa, devido a menores níveis de expressão do gene *OTOF*. Este fato poderia explicar porque alguns pacientes com mutações neste gene inicialmente apresentam EOAs e com o decorrer do tempo as mesmas tornam-se progressivamente indetectáveis ou completamente ausentes.^(21,59,68,81)

A presença de EOAs nos primeiros meses de vida tem importantes implicações nos programas de rastreamento neonatal, nos quais é realizada a pesquisa dessas emissões como método de triagem inicial. Nos casos de neuropatia auditiva, existe o risco dessa perda não ser diagnosticada, pois apesar de esses pacientes terem surdez de grau grave a muito grave, contribuiriam para o aumento de casos classificados como "sem alterações ou normais", pois as EOAs refletem a função auditiva nas células ciliadas externas e sua presença não exclui alterações ao nível das células ciliadas internas, nas sinapses ou no nervo auditivo.^(28,60-62) Além disso, a diminuição das respostas das EOAs com o avançar da idade das crianças com surdez e a avaliação

insuficiente dos afetados podem também levar à perda do diagnóstico de neuropatia auditiva.⁽⁵⁹⁾

No contexto da investigação da deficiência auditiva, é importante levar em consideração a existência do tipo de perda da neuropatia auditiva, a qual é frequentemente subdiagnosticada. Até agora, o número de casos com EOAs positivas relacionados a DFNB9, pelo uso único da análise das EOAs como critério de diagnóstico, não foi avaliado. Na prática, é necessária a realização das EOAs conjuntamente com o PEATE ao lidar com possível perda auditiva em uma criança.^(28,68) Assim, frente a uma criança ou paciente com surdez congênita, isolada, de grau grave a muito grave, com presença de EOAs e PEATE ausente, a hipótese de surdez DFNB9 tem que ser aventada e testes genéticos para pesquisa de mutações no gene OTOF devem ser realizados, como executado no presente estudo, permitindo um diagnóstico etiológico preciso a fim de proporcionar tratamento audiológico adequado em tempo hábil a todos os pacientes.⁽⁴⁴⁾

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

As técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase/Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (*Polimerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism - PCR/RFLP*), com o protocolo utilizado no estudo, propiciam a análise molecular de mutações no gene *OTOF*.

As evidências de associação, entre mutações no gene *OTOF* e a neuropatia auditiva, permitem concluir que existem diferenças, ao nível molecular, em pacientes com e sem este tipo de perda auditiva.

Os resultados indicam que, na ausência de fatores de risco, a combinação de distorção grave ou ausência do potencial evocado auditivo do tronco encefálico e presença das EOAs deve direcionar ao diagnóstico de neuropatia auditiva e ao rastreamento de mutações no gene *OTOF*.

Os testes moleculares são valiosos complementos de diagnóstico não apenas individual, mas também como método de rastreamento para estudo populacional ou neonatal.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parving A, Christensen B. Children younger than 4 years of age, referred to an audiological department. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1992;23:161-70.
2. Ruben RJ. Communication disorders in children: a challenge for health care. *Prev Med* 1993;22:585-8.
3. Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull* 2002;63:73-94.
4. Van Laer L, Cryns K, Smith RJ, Van Camp G. Nonsyndromic hearing loss. *Ear Hear* 2003;24:275-88.
5. Idan N, Brownstein Z, Shivatzki S, Avraham KB. Advances in genetic diagnostics for hereditary hearing loss. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2013;24:165-70.
6. Simões AM, Maciel-Guerra AT. A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez neurosensorial profunda. *J Ped* 1992;68:254-7.
7. Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. 2014; <http://hereditaryhearingloss.org>.
8. Maillet M. *Biologia Celular*. São Paulo:Santos; 2003. p. 11-80.
9. Poirier J, Dumas J-LR, Catala M, André J-M, Gherardi RK, Bernaudin J-F. *Histologia Molecular - Texto e Atlas*. São Paulo:Santos; 2003. p. 257-74.
10. Steel KP. Science, medicine, and the future: new interventions in hearing impairment. *BMJ* 2000;320:622-5.
11. Chaib H, Place C, Salem N, Chardenoux S, Vincent C, Weissenbach J, et al. A gene responsible for a sensorineural nonsyndromic recessive deafness maps to chromosome 2p22-23. *Hum Mol Genet* 1996;5:155-8.

12. Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, et al. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet* 1999;21:363-9.
13. Beisel KW, Nelson NC, Delimont DC, Fritzsche B. Longitudinal gradients of KCNQ4 expression in spiral ganglion and cochlear hair cells correlate with progressive hearing loss in DFNA2. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;82:137-49.
14. Kikuchi T, Adams JC, Miyabe Y, So E, Kobayashi T. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc* 2000;33:51-6.
15. Shibata Y, Kumai M, Nishi K, Nakamura K. Diversity and molecular anatomy of gap junctions. *Med Electron Microsc* 2001;34:153-9.
16. Melman YF, Domènech A, de La Luna S, McDonald TV. Structural determinants of KVLQT1 control by the KCNE family of proteins. *J Biol Chem* 2001;276:6439-44.
17. Varga R, Avenarius MR, Kelley PM, Keats BJ, Berlin CI, Hood LJ, et al. OTOF mutations revealed by genetic analysis of hearing loss families including a potential temperature sensitive auditory neuropathy allele. *J Med Genet* 2006;43:576-81.
18. Starr A, Picton TW, Sininger Y, Hood LJ, Berlin CI. Auditory neuropathy. *Brain* 1996;119:741-53.
19. Leal SM, Apaydin F, Barnwell C, Iber M, Kandogan T, Pfister M, et al. A second Middle Eastern kindred with autosomal recessive non-syndromic hearing loss segregates DFNB9. *Eur J Hum Genet* 1998;6:341-4.
20. Migliosi V, Modamio-Høybiør S, Moreno-Pelayo MA, Rodriguez-Ballesteros M, Villamar M, Telleria D, 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* 2002;39:502-6.
21. Varga R, Kelley PM, Keats BJ, Starr A, Leal SM, Cohn E, et al. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene. *J Med Genet* 2003;40:45-50.
 22. Madden C, Hilbert L, Rutter M, Greinwald J, Choo D. Pediatric cochlear implantation in auditory neuropathy. *Otol Neurotol* 2002;23:163-8.
 23. Rapin I, Gravel J. "Auditory neuropathy": physiologic and pathologic evidence calls for more diagnostic specificity. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003;7:707-28.
 24. Vlastarakos PV, Nikolopoulos TP, Tavoulari E, Papacharalambous G, Korres S. Auditory neuropathy: Endocochlear lesion or temporal processing impairment? Implications for diagnosis and management. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2008;72:1135-50.
 25. Psarommatis IM, Tsakanikos MD, Komtrogiani AD, Ntouniadikis DE, Apostolopoulos NK. Profound hearing loss and presence of click-evoked otoacoustic emissions in the neonate: a report of two cases. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1997;39:237-43.
 26. Rance G. Auditory neuropathy/dys-synchrony and its perceptual consequences. *Trends Amplif* 2005;9:1-43.
 27. Foerst A, Beutner D, Lang-Roth R, Huttenbrink KB, von Wedel H, Walger M. Prevalence of auditory neuropathy/synaptopathy in a population of children with profound hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006;70:1415-22.

28. Maris M, Venstermans C, Boudewyns AN. Auditory neuropathy/dyssynchrony as a cause of failed neonatal hearing screening. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2011;75:973-5.
29. Starr A, Sininger YS, Pratt H. The varieties of auditory neuropathy. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2000;11:215-30.
30. Beutner D, Foerst A, Lang-Roth R, von Wedel H, Walger M. Risk Factors for auditory neuropathy/auditory synaptopathy. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2007;69:239-44.
31. Berg AL, Spitzer JB, Towers HM, Bartosiewicz C, Diamond BE. Newborn hearing screening in the NCIU: profile of failed auditory brainstem response/passed otoacoustic emission. *Pediatrics* 2005;116:933-8.
32. Attias J, Raveh E. Transient deafness in young candidates for cochlear implants. *Audiol Neurootol* 2007;12:49-57.
33. Simmons JL, Beauchaine KL. Auditory neuropathy: case study with hyperbilirubinemia. *J Am Acad Audiol* 2000;11:337-47.
34. Madden C, Rutter M, Hilbert L, Greinwald JH, Choo DI. Clinical and audiological features in auditory neuropathy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:1026-30.
35. Dunkley C, Farnsworth A, Mason S, Dood M, Gibbin K. Screening and follow up assessment in three cases of auditory neuropathy. *Arch Dis Child* 2003;88:25-6.
36. Shapiro SM, Nakamura H. Bilirubin and the auditory system. *J Perinatol* 2001;21 Suppl 1:S52-62.
37. Shapiro SM. Bilirubin toxicity in the developing nervous system. *Pediatr Neurol* 2003;29:410-21.

38. Shaia WT, Shapiro SM, Spencer RF. The jaundice gunn rat model of auditory neuropathy/dyssynchrony. *Laryngoscope* 2005;115:2167-73.
39. Sawada S, Mori N, Mount RL, Harrinson RV. Differential vulnerability of inner and outer hair cell systems to chronic mild hypoxia and glutamate ototoxicity: insights into the cause of auditory neuropathy. *J Otolaryngol* 2001;30:106-14.
40. Cone-Wesson B, Rance G. Auditory neuropathy: a brief review. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;8:421-5.
41. Rodriguez-Ballesteros M, del Castillo FJ, Martín Y, Moreno-Pelayo MA, Morera C, Prieto F, et al. Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene OTOF. *Hum Mut* 2003;22:451-6.
42. Wang Q, Gu R, Han D, Yang W. Familial auditory neuropathy. *Laryngoscope* 2003;113:1623-9.
43. Kim TB, Isaacson B, Sivakumaran TA, Starr A, Keats BJB, Lesperance MM. A gene responsible for autosomal dominant auditory neuropathy (AUNA1) maps to 13q14-21. *J Med Genet* 2004;41:872-6.
44. Rouillon I, Marcolla A, Roux I, Marlin SD, Feldmann D, Coudec R, et al. Results of cochlear in two children with mutations in the OTOF gene. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006;70:689-96.
45. Neall, LF, Morrison S. Genetics Home Reference. 2014; <http://www.ghr.nlm.nih.gov/gene=otof>.
46. Achanzar WE, Ward S. A nematode gene required for sperm vesicle fusion. *J Cell Sci* 1997;110(Pt 9):1073-81.

47. Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M, et al. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 1998;20:37-42.
48. Lui J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;20:31-6.
49. Davis DB, Delmonte AJ, Ly CT, McNally EM. Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2000;9:217-26.
50. Rizzo J, Südhof TC. C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* 1998;273:15879-82.
51. Yasunaga S, Grati M, Chardenoux S, Smith TN, Friedman TB, Lalwani AK, et al. OTOF encodes multiple long and short isoforms: genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB9. *Am J Hum Genet* 2000;67:591-600.
52. Steel K, Kros CJ. A genetic approach to understanding auditory function. *Nat Genet* 2001;27:143-9.
53. McNeil PL, Kirchhausen T. An emergency response team for membrane repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:499-505.
54. Smith RJH, Gurrola JG, Kelley PM. OTOF - Related Deafness. 2014; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1251/>.
55. Brandt A, Striessnig J, Moser T. CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 2003;23:10832-40.
56. Khimich D, Nouvian R, Pujol R, Tom Dieck S, Egner A, Gundelfinger ED, et al. Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signaling. *Nature* 2005;434:889-94.

57. Adato A, Raskin L, Petit C, Tamir-Bonne B. Deafness heterogeneity in a Druze isolate from the Middle East: novel OTOF and PDS mutations , low prevalence of GJB2 35delG mutation and indication for a new locus. *Eur J Hum Genetics* 2000;8:437-42.
58. Mirghomizadeh F, Pfister M, Apaydin F, Petit C, Kupka S, Pusch CM, et al. Substitutions in the conserved C2C domain of otorfelin cause DFNB9, a form of nonsyndromic autosomal recessive deafness. *Neurobiol Dis* 2002;10:157-64.
59. Tekin M, Akcayoz D, Incesulu A. A novel missense mutation in a C2 domain of OTOF results in autosomal recessive auditory neuropathy. *Am J Med Genetics* 2005;138A:6-10.
60. Fávero ML, Romanos J, Mingroni-Neto-RC, Balieiro CR, Donini TS, Spinelli M. Neuropatia auditiva decorrente de mutação no gene OTOF. *Arq Otorrinolaringol* 2005;9:325-30.
61. Oliveira CA, Alexandrino F, Christiani TV, Steiner CE, Cunha JLR, Guerra ATM, et al. Molecular genetics study of deafness in Brazil: 8-year experience. *Am J Med Genet* 2007;143A:1574-9.
62. Romanos J, Kimura L, Fávero ML, Izarra FA, de Melo Auricchio MT, Batisso AC, et al. Novel OTOF mutations in Brazilian patients with auditory neuropathy. *J Hum Genet* 2009;54:382-5.
63. World Health Organization. Report of the informal working group on prevention of deafness and hearing impairment programme planning. Geneva: WHO; 1991. 22 p.
64. Brasil. Lei Nº 10.741, de 1º de Outubro de 2003. Série fontes de referência. Legislação: nº 53. Diário Oficial da União, 3 Out. 2003. 42 p.

65. Murahovschi J. Puericultura no Ambulatório e no Consultório. In: Murahovschi J. *Pediatria Diagnóstico + Tratamento*. 7ª ed. São Paulo: Sarvier; 2013. p. 27-30.
66. Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *Am J Epidemiol* 2009;169:505-14.
67. Strom TM, Wienker TF. Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. 2014; <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.
68. Loundon N, Marcolla A, Roux I, Rouillon I, Denoyelle F, Feldmann D, et al. Auditory neuropathy or endocochlear hearing loss? *Otol Neurotol* 2005;26:748-54.
69. Konradsson KS. Bilaterally preserved otoacoustic emissions in four children with profound idiopathic unilateral sensorineural hearing loss. *Audiology* 1996;35:217-27.
70. Ohwatari R, Fukuda S, Chida E, Matsumura M, Kuroda T, Kashiwamura M, et al. Preserved otoacoustic emission in a child with profound unilateral sensorineural hearing loss. *Auris Nasus Larynx* 2001;28 Suppl:S117-20
71. Manchaiah VK, Zhao F, Danesh AA, Duprey R. The genetic basis of auditory neuropathy spectrum disorder (ANSO). *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2011;75:151-8.
72. Cooper DN, Ball EV, Stenson PD, Phillips AD, Howells K, Heywood S, et al. The Human Gene Mutation Database. 2014; <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
73. Sheykholslami K, Kaga K, Kaga M. An isolated and sporadic auditory neuropathy (auditory nerve disease): report of five patients. *J Laryngol Otol* 2001;115:530-4.

74. Houseman MJ, Jackson AP, Al Gazali LI, Badin RA, Roberts E, Mueller RF. A novel mutation in a family with non-syndromic sensorineural hearing loss that disrupts the newly characterised OTOF long isoforms. *J Med Genet* 2001;38:e25.
75. Gallo-Terán J, Megía López R, Morales-Angulo C, del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, Mazón Gutiérrez A, et al. Evaluation of a family with sensorineural hearing loss due to the Q829X mutation in the OTOF gene. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2004;55:120-5.
76. Gallo-Terán J, Morales-Angulo C, Rodríguez-Ballesteros M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo I, Moreno F. Prevalence of the 35delG mutation in the GJB2 gene, del (GJB6-D13S1830) in the GJB6 gene, Q829X in the OTOF gene and A1555G in the mitochondrial 12S rRNA gene in subjects with non-syndromic sensorineural hearing impairment of congenital/childhood onset. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2005;56:463-8
77. Choi BY, Ahmed ZM, Riazuddin S, Bhinder MA, Shahzad M, Husnain T, et al. Identities and frequencies of mutations of the otoferlin gene (OTOF) causing DFNB9 deafness in Pakistan. *Clin Genet* 2009;75:237-43.
78. Santarelli R, Del Castillo I, Rodríguez-Ballesteros M, Scimemi P, Cama E, Arslan E, et al. Abnormal cochlear potentials from deaf patients with mutations in the otoferlin gene. *J Assoc Res Otolaryngol* 2009;10:545-56.
79. Marlin S, Feldmann D, Nguyen Y, Rouillon I, Loundon N, Jonard L, et al. Temperature-sensitive auditory neuropathy associated with an otoferlin mutation: Deafening fever! *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394:737-42.
80. Penido RC, Isaac ML. Prevalence of auditory neuropathy spectrum disorder in an auditory health care service. *Braz J Otorhinolaryngol* 2013;79:429-33.

81. Gallo-Terán JI, Morales-Angulo C, Sánchez N, Manrique M, Rodríguez-Ballesteros M, Moreno-Pelayo MA, et al. Auditory neuropathy due to the Q829X mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF) in an infant screened for newborn hearing impairment. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2006;57:333-5.

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

Parecer n.º 044/2010

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo CEP n.º 0329/2010 sob a responsabilidade de **Magali Aparecida Orate Menezes da Silva**, com o título "Investigação molecular da neuropatia auditiva", está de acordo com a Resolução do CNS 196/96 e foi **aprovado por esse CEP**.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 08 de fevereiro de 2010.

Dr^a Maria Angélica Benes Teixeira Lemos
Secretária do CEP/FAMERP


Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP - FAMERP