

DETECÇÃO DA MUTAÇÃO 35delG E DE FATORES ETIOLÓGICO AMBIENTAIS EM USUÁRIOS DE IMPLANTE COCLEAR

The detection of 35delG mutation and environmental etiologic factors in cochlear implant users

Artigo Original

RESUMO

Objetivo: Identificar a ocorrência da mutação 35delG e de fatores ambientais relacionados à perda auditiva em pacientes usuários de implante coclear, determinando o ganho funcional auditivo após o implante. **Métodos:** Tratou-se de um estudo transversal realizado em seis voluntários, com idades variando de cinco a vinte e um anos. As variáveis estudadas consistiram da identificação de fatores de risco para a perda auditiva no período pré-natal, peri-natal e pós-natal. Para o estudo genético, pesquisou-se a ocorrência da mutação 35delG no gene da conexina 26. O ganho funcional devido ao implante foi avaliado com o estímulo “tom puro”, em frequências moduladas de 250Hz, 500Hz, 1000Hz, 2000Hz, 3000Hz e 4000Hz. **Resultados:** Na pesquisa de fatores ambientais, evidenciaram-se relatos de infecções do grupo TORCH (Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes e Sífilis), hipertensão materna, uso de abortivos, Meningite, Sarampo, oxigenoterapia e Icterícia. O estudo genético revelou dois casos de mutação 35delG, um em homozigose e outro em heterozigose. O ganho funcional do implante coclear variou de 60 a 85dBNA. **Conclusão:** Na amostra estudada, evidenciaram-se as ocorrências da mutação 35delG e de fatores ambientais relacionados à deficiência auditiva. As medidas de ganho funcional foram satisfatórias, independente da etiologia relacionada à perda.

Descritores: Genética; Mutação; Perda Auditiva; Implante Coclear.

ABSTRACT

Aim: To identify the occurrence of 35delG mutation and of environmental factors related to hearing loss in patients with cochlear implant, determining the functional gain post-implant. **Methods:** It was a cross-sectional study conducted with six volunteers, aged from five to twenty-one years old. The studied variables consisted on the identification of risk factors for hearing loss in prenatal, perinatal and postnatal periods. For genetic investigation, the occurrence of 35delG mutation in the connexin 26 gene was studied. The functional gain due to the implant was evaluated with “pure tone” stimulus in modulated frequencies of 250Hz, 500Hz, 1000Hz, 2000Hz, 3000Hz and 4000Hz. **Results:** In the study of environmental factors, we evidenced reports of TORCH infections (Toxoplasmosis, Rubella, Cytomegalovirus, Herpes and Syphilis), maternal hypertension, abortive usage, Meningitis, Measles, oxygen therapy and Jaundice. The genetic investigation revealed two cases of 35delG mutation, one in homozygosis and other in heterozygosis. The functional gain due to the cochlear implant ranged from 60 to 85dBHL. **Conclusion:** In the studied sample, both the occurrences of 35delG mutation and of environmental factors related to the hearing loss were evident. The values of functional gain were satisfactory, regardless from the etiology related to the loss.

Descriptors: Genetics; Mutation; Hearing Loss; Cochlear Implantation.

Camila Nogueira Lélis⁽¹⁾
Marília Fontenele e Silva
Câmara⁽¹⁾
Edi Lúcia Sartorato⁽²⁾

1) Universidade de Fortaleza -
UNIFOR - (CE)

2) Universidade Estadual de Campinas -
UNICAMP - (SP)

Recebido em: 12/11/2008

Revisado em: 11/05/2009

Aceito em: 19/05/2009

INTRODUÇÃO

A perda auditiva (PA) pode afetar a qualidade de vida do indivíduo, comprometendo a comunicação verbal, cognição, relacionamento, sociabilidade, emotividade, aprendizagem, realizações acadêmicas e oportunidades vocacionais, podendo apresentar etiologias diversas, congênicas e adquiridas⁽¹⁾. O implante coclear promove a saúde auditiva, proporcionando melhora na audibilidade e compreensão da fala⁽²⁾.

Diferenciar a PA de origem genética da PA de origem ambiental torna-se difícil, pela falta de informações precisas da família sobre intercorrências durante a gestação, no parto e no período perinatal, em muitos casos, a PA fica como causa indefinida⁽³⁾.

Em países desenvolvidos, 1 em 1000 crianças têm PA grave a profunda ao nascer ou durante a infância. Mais de 60% dos casos congênicos estão relacionados a fatores genéticos, e em outros casos, pode haver etiologias ambientais⁽⁴⁾. Genes relacionados à PA podem causar comprometimentos na audição de forma isolada, ou forma não sindrômica⁽³⁾, que são responsáveis por 70% dos casos de etiologia hereditária. Estes genes podem se expressar de forma autossômica recessiva, dominante e mitocondrial⁽⁴⁾.

Uma forma de PA não sindrômica recessiva ocorre pela mutação na conexina 26, proteína formadora de *gap junctions*, presente no gene GJB2. Esses canais conectam células adjacentes, possibilitando a passagem de moléculas e permitindo a reciclagem de íons de potássio nos fluidos cocleares^(4,5). A deficiência na produção da conexina 26 é capaz de ocasionar PA pré-lingual, não progressiva. O padrão de transmissão desta mutação é autossômica dominante ou recessiva^(5,6).

As mutações no gene da conexina 26 são consideradas fatores determinantes, sendo responsáveis por aproximadamente 80% dos casos de PA recessiva. Contudo, 70% da população com esta alteração tem particularmente mutação 35delG⁽³⁾.

A mutação 35delG encontra-se no gene GJB2, o que torna possível o diagnóstico etiológico de muitos pacientes e aumenta a probabilidade destes serem candidatos ao Implante Coclear (IC). Esta mutação pode causar PA bilateral, muitas vezes de grau profundo. Indivíduos com PA congênita de origem genética geralmente não apresentam lesões físicas do aparelho auditivo, favorecendo o uso do IC⁽⁷⁾.

A integridade das vias auditivas centrais, o tempo de privação sensorial, a capacidade do usuário pela leitura orofacial, aspectos referentes a fatores audiológicos, linguísticos, psicológicos, culturais cognitivos e

eletrofisiológicos e a avaliação da família no processo educacional e terapêutico são fatores determinantes no processo de seleção para uso do IC^(8,9,10).

O IC é um dispositivo eletrônico que tem se consolidado como uma opção efetiva na habilitação e reabilitação do deficiente auditivo, pois ele auxilia os indivíduos com PA sensorineural grave a profunda bilateral que não se beneficiam com o Aparelho de Amplificação Sonora Individual (AASI), pois este é indicado no tratamento de PA, devendo haver uma reserva coclear suficiente para que ocorra uma boa percepção do som e fala⁽⁹⁾.

As crianças com PA adquirida são melhores candidatos ao IC do que aquelas com PA congênita, e as com IC recém implantado têm melhor desempenho do que as que realizam o IC muito tempo após adquirir PA⁽¹¹⁾.

Os recentes avanços no entendimento da PA de origem genética têm colaborado com a compreensão da função auditiva e tornado o diagnóstico mais aprimorado⁽¹²⁾.

A presente pesquisa teve como objetivo descrever a frequência da mutação 35delG e das etiologias ambientais em pacientes usuários de implante coclear, apresentando o ganho funcional após o implante.

MÉTODO

Na presente investigação realizada na cidade de Fortaleza, desenvolveu-se um estudo do tipo transversal, iniciado em abril de 2007 e concluído em outubro de 2008. Foram adotados como critérios de inclusão para a seleção da amostra, indivíduos usuários de IC, independente da faixa etária.

Participaram da pesquisa seis voluntários selecionados em clínicas e hospitais, com tempo médio de uso do IC de cinco anos e cinco meses, faixa etária entre cinco e vinte e um anos, sendo todos do gênero feminino, residentes no estado do Ceará. Destes, cinco apresentaram PA pré-lingual e um apresentou PA pós-lingual.

Por meio de instrumento de coleta de dados, o pesquisador levantou informações sobre indicadores de risco da PA no período pré-natal, peri-natal e pós-natal.

Com o objetivo de comprovar a ocorrência ou não de mutação 35delG no gene da conexina 26, foi realizada, por uma médica patologista, a coleta de sangue, por meio de lanceta. O sangue foi coletado em papel FTA e, em seguida, encaminhado para o Laboratório de Genética Humana da Universidade de Campinas (Unicamp). Para a triagem da mutação 35delG utilizou-se a técnica PCR-alelo-específico (AS – PCR). A análise molecular da conexina 26, no gene GJB2, se deu por extração do DNA, amplificação do gene GJB2 e sequenciamento.

A verificação do ganho funcional do IC ressaltou a importância da dinâmica de funcionalidade relacionada à etiologia, visto que pesquisas⁽⁷⁾ demonstram melhor desempenho deste em indivíduos com etiologia genética não sindrômica, para tanto, foi utilizado pelo pesquisador, o equipamento GSI – 16, Granson Stadler, com dois canais. O processo de análise da orelha implantada ocorreu por meio de sistema de campo livre, composto por um alto-falante, em zero azimute, a 50 cm do paciente, capaz de emitir estímulos sonoros. A apresentação do sinal de teste ocorreu primeiramente de forma descendente e, em seguida, ascendente, para definir o limiar de audibilidade. O estímulo acústico utilizado na audiometria foi o tom puro, em frequência modulada de 250Hz, 500Hz, 1000Hz, 2000Hz, 3000Hz e 4000Hz. O ganho funcional foi determinado em decibéis (dB)

Os dados foram analisados, estabelecendo o percentual das ocorrências em relação ao total da amostra e descrevendo-se os valores de ganho para cada frequência sonora.

Os procedimentos de coleta e análise dos dados foram submetidos à avaliação do comitê de ética da Universidade de Fortaleza e aprovados conforme parecer de número 04-601. Os participantes da pesquisa, após tomarem ciência de todo o procedimento, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

RESULTADOS

Dos seis pacientes com implante coclear, quatro apresentaram intercorrências no período pré-natal. Dois por infecções do grupo TORCH, um com quadro de hipertensão materna e um pelo uso de drogas abortivas. No período peri-natal não foi evidenciada a presença de qualquer fator ambiental relacionado. No período pós-natal evidenciou-se oxigenoterapia, meningite, sarampo e icterícia como fatores relacionados à perda auditiva. As ocorrências de complicações nos períodos pré, peri e pós-natais, estão apresentadas na Tabela I.

A detecção da mutação genética 35delG na análise do gene GJB2 constatou que dos seis casos estudados: quatro eram não mutantes, e dois eram mutantes, sendo um de caráter heterozigoto e um homozigoto.

Na figura 1a apresenta-se o ganho funcional do IC de acordo com a frequência de teste, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, evidencia-se um maior ganho em uma frequência de 29000Hz. Na figura 1b, destaca-se uma melhor resposta com o IC nos pacientes 4 e 6 e uma pior resposta nos pacientes 1 e 2.

Tabela I - Distribuição dos indivíduos conforme a ocorrência de ocorrências nos períodos pré-, peri- e pós-natais.

Pré-natais		
Ocorrências	Nº	%
Infecções TORCH	2	33,3
Hipertensão	1	16,6
Uso de abortivo	1	16,6
Sem ocorrência	2	33,3
Pós-natais		
Ocorrências	Nº	%
Meningite	1	16,6
Sarampo	1	16,6
Oxigenoterapia	1	16,6
Icterícia	1	16,6
Sem ocorrência	2	33,3

TORCH: toxoplasmose, rubéola, citomegalovirus, herpes e sífilis

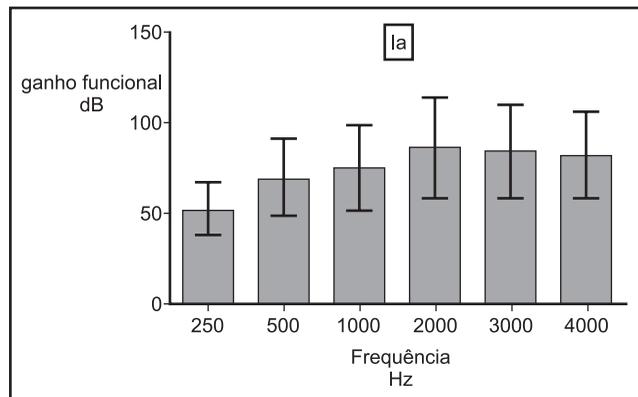


Figura 1a - Ganho funcional médio (dB) da amostra de pacientes com implante coclear de acordo com as diferentes frequências (Hz) testada durante audiometria.

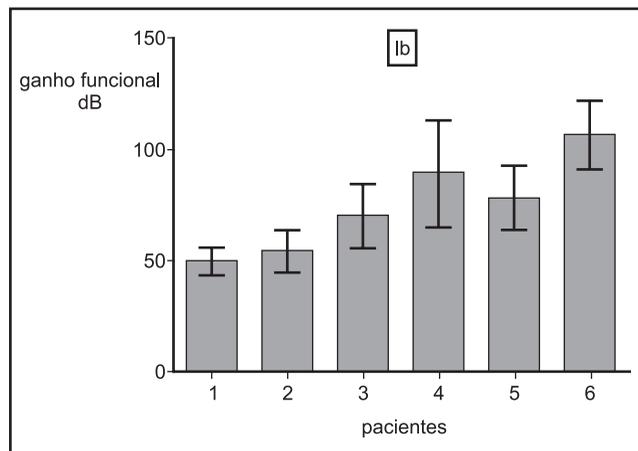


Figura 1b - Ganho funcional médio (dB) dos pacientes com implante coclear evidenciado na audiometria.

DISCUSSÃO

Causas ambientais de PA, tal como a rubéola embriopática, têm sido de caráter epidêmico na natureza, estabelecendo que a incidência de PA congênita possa variar diversas vezes e entre populações, quando se leva em consideração a heterogeneidade do lugar⁽¹⁴⁾. Outras importantes causas de PA incluem prematuridade, infecções pré-natais e pós-natais, trauma craniano, hemorragia sub-aracnóidea e medicamentos ototóxicos, dados compatíveis com os resultados encontrados⁽¹³⁾.

Levantar informações sobre o histórico das patologias nos períodos pré, peri e pós-natais é um dos métodos mais eficientes para se chegar a uma conclusão a respeito das etiologias da PA, ocorridas nos períodos pré e pós-lingual. Um estudo desenvolvido em uma escola de São Caetano do Sul, para determinar as principais etiologias de PA, revelou na maioria dos participantes (99%) ocorrência de PA sensorineural e nesta maioria predominou causa desconhecida de PA (25,2%), podendo ser ocasionada por contaminação viral durante o parto ou mutação genética⁽¹⁵⁾. Assim, fica evidente a relevância dos dados descritos na tabela I, onde estão dispostos os principais fatores que podem ocasionar PA pré e pós-lingual.

Mutações no gene GJB2 ocorrem em alta proporção de PA não síndrômicas recessivas⁽¹⁶⁾, estas mutações envolvendo a conexina 26 são encontradas em muitos sujeitos com gene recessivo autossômico, determinando o fenótipo da PA não-sindrômica pré-lingual⁽¹⁷⁾. Entretanto, diagnósticos genéticos são complicados pelo fato que 10% a 50% dos sujeitos afetados, com mutações GJB2, portam somente um alelo mutante.

Casos tardios de PA, ou seja, pós-linguais, podem ocorrer também por meio de contato com drogas ototóxicas, história familiar de PA, e em alguns casos podem ser uma PA súbita⁽⁸⁾.

Considerando os achados, observou-se a presença de um indivíduo em homozigose e um em heterozigose para a mutação 35delG, sem casos de PA na família, e os demais sem alterações. Os achados relacionados à mutação 35delG, para os casos de homozigose e heterozigose, apresentam-se semelhantes aos achados de pesquisa desenvolvida com 32 pacientes, 4 deles em homozigose (12%) e 6 em heterozigose (19%), para identificação da frequência da etiologia genética na PA⁽⁸⁾.

É necessário que o indivíduo herde dois alelos mutados, sendo um do pai e outro da mãe, para que se expresse a PA. Assim, há a impossibilidade de a conexina 26 ser codificada pelo gene GJB2 alterado. Quando o paciente apresentar a mutação 35delG em heterozigose significa que há mutação

em apenas um dos alelos, sendo possível que o outro alelo codifique a proteína. Esta condição pode ou não representar PA⁽⁸⁾.

Recém-nascidos que apresentarem a mutação 35delG em heterozigose pelo teste genético deverão ter acompanhamento audiométrico seriado, pois estes podem estar incluídos nos casos da mutação 35delG, com PA⁽¹⁸⁾.

Apesar do genótipo não predizer a audição, homozigotos para 35delG têm incidência de PA pré-lingual significativa: 26 a 30% terão PA grave e outros 30 a 57% profunda⁽¹⁸⁾, compatível com os graus de PA encontrados na pesquisa.

Causas genéticas ocorrem em 50% a 60% de PA na infância em países desenvolvidos e podem ser classificadas de acordo com a herança paterna, a presença (síndrômica) ou ausência (não-síndrômica) de fatores clínicos distintos, princípio etário, progressão, características audiológicas de PA ou a identificação de mutação casual⁽¹³⁾. Sendo que 60% dos casos de PA isolada têm origem genética⁽²⁰⁾.

Em todas as frequências analisadas, de todos os voluntários, houve maior ganho funcional quando comparados sem e com o uso do IC, demonstrando a eficiência deste nos casos pesquisados. O IC ultrapassa a orelha interna para estimular diretamente o nervo auditivo, sendo efetivo sempre que as células auditivas estão lesadas⁽²¹⁾. Trabalho prévio demonstrou que indivíduos com PA pré-lingual bilateral grave e/ou profunda, que não se beneficiam do AASI, apresentam resultados mais favoráveis com o IC⁽⁸⁾.

CONCLUSÃO

Conclui-se, a partir dos dados obtidos, a existência de mutação 35delG e de fatores ambientais relacionados à perda auditiva, e que houve ganho funcional com o implante coclear, independente da causa relacionada à deficiência.

REFERÊNCIAS

1. Yoshinaga-Itano C, Sedey A, Coulter DK, Mehl AL. Language of early and later identified children with hearing loss. *Pediatrics*. 1998;102:1161-71.
2. Bento AF, Brito Neto R, Castilho AM, Gómez VG, Giori SB, Guedes MC. Auditory results with multichannel cochlear implant in patients submitted to cochlear implant surgery at University of São Paulo Medical School - Hospital das Clínicas. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2004;70(5):632-7.
3. Sartorato EL, Maciel-Guerra AT. Genes do silêncio: a complexidade clínica da surdez genética. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2002;68(6):903-6.

4. Piatto VB, Nascimento ECT, Alexandrino F, Oliveira CA, Lopes ACP, Sartorato EL, Maniglia JV. Molecular genetics of non – syndromics deafness. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2005;71(2):216-23.
5. Ballana E, Ventayol M, Rabionet R, Gaspsrine P, Estivill X. Connexin and deafness homepage [homepage na Internet]. [acesso em 2008 Set 28]. Disponível em: <http://davinci.crg.es/deafness/index.php>
6. Oliveira CA, Maciel-Guerra AT, Sartorato EL. Deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene in brazilian patients. *Clin Genet.* 2002;61:354-8.
7. Wang H, Chang W, Li A, Yeh T, Wu C, Chen M, et al. Functional analysis of connexin 26 mutants associated with hereditary recessive deafness. *J Neurochem.* 2003;84:735-42.
8. Bernardes R, Bortoncello S, Christiani TV, Sartorato EL, Silva RC, Porto PRC. Estudo molecular em crianças candidatas e submetidas ao implante coclear. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2006;72(3):333-6.
9. Moraes VT, Zeigelboim BS, Bevilacqua MC, Jacob LCB. Indicação de implante coclear: tendências atuais. *Acta Who.* 2002;20(4):224-8.
10. Bevilacqua MC, Filho OAC, Martinho ACF. Implante Coclear. In: Ferreira LP, Lopes DMB, Limongi SCO. *Tratado de Fonoaudiologia.* São Paulo: Roca; 2004. p. 751-61.
11. Northern JL, Dons MP. *Audição na infância.* 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 245-75.
12. Godinho R, Keogh I, Eavey R. Perda auditiva genética. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2003;69(1):100-4.
13. Morton CC, Nance WE. Newborn hearing Screening: a silent revolution. *N Engl J Med.* 2006;354:2151-64.
14. Oliveira CA, Alexandrino F, Abe-Sandes WA, Maciel - Guerra AT, Magna LA, Sartorato EL. Frequency of the 35delG mutation in the GJB2 gene in samples of european, asian, and african brazilians. *Hum Biol.* 2004;76(2):313-6.
15. Cacatto SB, Garcia RID, Costa KS, Abdo TRT, Rezende CEB, Rapoport PB. Análise das principais etiologias de deficiência auditiva em escola especial “Anne Sullivan”. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2003;69:235-40.
16. Rothrock CR, Murgia A, Sartorato EL, Leonardi E, Wei S, Lebeis SL, et al. Connexin 26 35delG does not represent a mutational hotstop. *Hum Genet.* 2003;113:18-23.
17. Del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, Brownstein Z, Marlin S, Adina Q, et al. Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study. *Hum Genet.* 2003;73:1452-8.
18. Piatto VB, Oliveira CA, Alexandrino F, Pimpinati CJ, Sartorato EL. Perspectivas para triagem de deficiência auditiva genética: rastreamento da mutação 35delG em neonatos. *J Pediatr.* 2005;81(2):139-42.
19. Pfeifsticker LN, Stole G, Sartorato EL, Delfino D, Maciel-Guerra AT. A Investigação genética na surdez hereditária não sindrômica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004;70(2):182-6.
20. Oliveira CA, Alexandrino F, Christiani TV, Steiner CE, Cunha JLR, Maciel-Guerra AT, Sartorato EL. Molecular genetics study of deafness in Brazil: 8-year experience. *Am J Med Genet.* 2007;143(14):1-6.
21. Blake C, Karen AG. Cochlear implants for children with severe: to-profound hearing loss. *N Engl J Med.* 2007;357:2380-7.
22. Mesquita ST, Canôas JW, Costa Filho OA. Implante coclear: quem são seus usuários?. *J Bras Fonoaudiol.* 2002;13(3):257-73.

Endereço para correspondência

Marília Fontenele Silva e Câmara
Rua Marcos Macedo, 44/800
Aldeota
CEP: 60150-190 - Fortaleza - CE
E-mail: marilia@unifor.br