



Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org



ARTIGO ORIGINAL

Association of glutamate metabotropic receptor polymorphisms and sensorineural hearing loss in adults of different age groups[☆]



Sanlin Xie, Jianzhong Li, Wentao Wang e Xianming Chen  *

Fuzhou General Hospital, Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Fujian Sheng, China

Recebido em 25 de fevereiro de 2018; aceito em 17 de abril de 2018

Disponível na Internet em 12 de agosto de 2019

KEYWORDS

Sensorineural hearing loss;
Glutamate metabotropic receptor 7;
Single nucleotide polymorphism

Abstract

Introduction: Sensorineural hearing loss is a common challenge all over the world, including a section of the young population. While there have been many published reports associating glutamate metabotropic receptor 7 with sensorineural hearing loss, there is no report, till date, about the association of glutamate metabotropic receptor 7 polymorphisms with sensorineural hearing loss at different ages.

Objective: To test the association between the single nucleotide polymorphisms rs11928865 and rs11920109 of the glutamate metabotropic receptor 7 with sensorineural hearing loss in adults of different age groups.

Methods: A total of 1661 subjects were studied. The individuals aged between 30 and 50, and between 51 and 70 years with sensorineural hearing loss comprised group A and group B, respectively. Individuals aged between 30 and 50; and between 51 and 70 years without hearing loss comprised control groups C and D, respectively. The MassARRAY method was used to analyze the genotypes.

Results: The difference in genotypes for the glutamate metabotropic receptor 7 rs11928865 single nucleotide polymorphism between patients in the groups B and D was statistically significant ($p=0.018$). The distribution frequencies of genotypes in patients that were aged between 30 and 50 years were not significantly different. The difference in genotypes for the rs11920109 single nucleotide polymorphism between the sensorineural hearing loss groups and control groups showed no statistical significance.

DOI se refere ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2018.04.007>

[☆] Como citar este artigo: Xie S, Li J, Wang W, Chen X. Association of glutamate metabotropic receptor polymorphisms and sensorineural hearing loss in adults of different age groups. Braz J Otorhinolaryngol. 2019;85:560–4.

* Autor para correspondência.

E-mail: 3327747924@qq.com (X. Chen).

PALAVRAS-CHAVE

Perda auditiva
neurosensorial;
Receptor
metabotrópico de
glutamato 7;
Polimorfismo de
nucleotídeo único

Conclusion: The rs11928865 single nucleotide polymorphism was associated with the susceptibility to hearing loss in patients in group B but not with those in group A.

© 2019 Published by Elsevier Editora Ltda. on behalf of Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Associação entre polimorfismos do gene do receptor metabotrópico de glutamato 7 e perda auditiva neurosensorial em adultos de diferentes faixas etárias**Resumo**

Introdução: A perda auditiva neurosensorial é um desafio comum no mundo todo, inclui uma parte da população jovem. Embora haja muitos relatos que associem o gene do receptor metabotrópico de glutamato 7 com perda auditiva neurosensorial, não há relato, até a presente data, sobre a associação de polimorfismos do receptor metabotrópico de glutamato 7 com perda auditiva neurosensorial em diferentes faixas etárias.

Objetivo: Testar a associação entre os polimorfismos de nucleotídeo único, rs11928865 e rs11920109 do receptor metabotrópico de glutamato 7 e perda auditiva neurosensorial em adultos de diferentes faixas etárias.

Método: Um total de 1661 indivíduos foram estudados. Os indivíduos com idade entre 30 e 50 anos e entre 51 e 70 anos com perda auditiva neurosensorial constituíram o grupo A e o grupo B, respectivamente. Indivíduos com idade entre 30 e 50 anos; e entre 51 e 70 anos sem perda auditiva foram os grupos controle C e D, respectivamente. O método MassARRAY foi utilizado para analisar os genótipos.

Resultados: A diferença nos genótipos para o polimorfismo de nucleotídeo único rs11928865 do gene receptor metabotrópico de glutamato 7 entre os pacientes dos Grupos B e D foi estatisticamente significativa ($p = 0,018$). As frequências de distribuição dos genótipos nos pacientes entre 30 e 50 anos não foram significativamente diferentes. A diferença nos genótipos para o polimorfismo de nucleotídeo único rs11920109 entre os grupos com perda auditiva neurosensorial e os grupos controle não mostrou significância estatística.

Conclusão: O polimorfismo de nucleotídeo único rs11928865 foi associado à suscetibilidade para perda auditiva em pacientes do grupo B, mas não àqueles do grupo A.

© 2019 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem causar alterações na qualidade ou quantidade de expressão de proteína, o que pode estar relacionado à ocorrência de determinadas doenças ou à susceptibilidade a doenças. O glutamato é um importante neurotransmissor do sistema auditivo. O produto da proteína do gene do receptor metabotrópico de glutamato 7 (GRM7), mGluR7, é amplamente distribuído nas células ciliadas internas e externas e na célula nervosa do gânglio espiral. A perda auditiva neurosensorial (PANS) é um desafio comum em todo o mundo, inclui uma parte da população jovem. Já houve muitos relatos que associaram o GRM7 à PANS. Friedman et al. associaram o gene GRM7 com a susceptibilidade à PANS em indivíduos de países europeus.¹ A presença de SNPs do gene GRM7 correlaciona-se significativamente à PANS em homens idosos chineses da etnia Han e diferentes tipos de perda auditiva apresentam diferentes polimorfismos genéticos.² Entretanto, os indivíduos com PANS nesses estudos tinham mais de 50 anos. Curiosamente,

não há relato até a presente data sobre a associação dos polimorfismos do GRM7 com PANS em diferentes faixas etárias. Não está claro se os indivíduos mais jovens com PANS também apresentam uma associação com os SNPs do GRM7.

Aqui, selecionamos um grupo de pacientes com PANS com 30 a 50 e 51 a 70 anos e os grupos de controle correspondentes para uma análise genética do GRM7. Comparamos a suscetibilidade à PANS nos pacientes dessas diferentes faixas etárias com os SNPs do GRM7.

Método**Amostra**

Participaram deste estudo 1.661 voluntários chineses da etnia Han. Todos tinham de 30 a 70 anos e visitaram nosso hospital entre janeiro de 2013 e janeiro de 2017. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do hospital e o consentimento informado por escrito foi obtido de cada indivíduo; o

número de aprovação do comitê de ética foi 2015003. Constituíram o grupo A 467 indivíduos, entre 30 e 50 anos, incluiu 236 homens e 231 mulheres com média de $40,54 \pm 5,32$ anos, com PANS. Constituíram o grupo controle C 278 indivíduos, com entre 30 e 50 anos, incluiu 147 homens e 131 mulheres com média de $40,23 \pm 4,99$ anos, sem PANS. Constituíram o grupo B 439 indivíduos, com entre 51 e 70 anos, incluiu 208 homens e 231 mulheres com média de $62,02 \pm 3,44$ anos, com PANS. Finalmente, 477 indivíduos, com entre 51 e 70 anos, incluiu 257 homens e 220 mulheres com média de $61,08 \pm 4,31$ anos, sem PANS, constituíram o grupo controle D.

Avaliação clínica e medidas audiológicas

Todos os participantes foram submetidos a um exame anual de rotina que incluiu um breve questionário de dados demográficos, histórico de doença sistêmica, histórico de vida pessoal para hábitos como fumar e consumo de álcool, radiografia de tórax, eletrocardiograma e perfil bioquímico de amostras de sangue.

Todos os sujeitos foram analisados por meio de audiometria tonal, timpanometria e potencial evocado auditivo de tronco encefálico (Peate). A audiometria foi feita com um audiômetro de tom puro modelo GSI-61 (Grason-Stadler, Inc., Madison WI, EUA). A timpanometria usou o equipamento GSI-Tymp star II (Grason-Stadler, Inc.). A resposta auditiva do tronco encefálico foi medida através do Smart EP (Intelligent Hearing Systems, Miami, Flórida, EUA). A média do limiar do tom puro (LTP) da frequência aérea dos pacientes a 0,5 kHz, 1 kHz, 2 kHz e 4 kHz foi calculada para cada indivíduo e, em seguida, os indivíduos foram agrupados de acordo com o LTP das orelhas. A diminuição da audição no grupo experimental ultrapassou os 26 dB de nível auditivo (NA) com duas ou mais quedas consecutivas na frequência. Os indivíduos foram examinados através de Peate. O pico de latência das ondas I, III e V e a latência interpica das ondas I?V foram determinados e a diferença de latência interlateral do pico de latência e da latência interpico foi comparada. Aqueles que preencheram as seguintes condições: quando o pico de latência da onda V se estendia por mais de 6,1 ms; ou a onda III e a onda V não puderam ser induzidas; ou o alongamento da latência interpico das ondas I?V foi maior ou igual a 4,0 ms; ou a diferença de latência interlateral com a onda V foi maior do que 0,4 ms e aqueles considerados positivos para lesões pós-cocleares não foram incluídos no estudo. Os indivíduos foram excluídos se tivessem surdez condutiva, surdez induzida por ruído e surdez causada por outras causas, como como surdez induzida por drogas, surdez súbita, doença de Ménière, otosclerose, otite adesiva, neuroma acústico e surdez autoimune. Além disso, os indivíduos também foram excluídos se tivessem doenças sistêmicas, inclusive diabetes, hipertensão, doença cardíaca, hiperlipidemia, doença renal crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica e abuso de álcool. Entre os candidatos que preencheram essas condições, os indivíduos que tiveram perda progressiva da audição após os 50 anos foram categorizados no grupo B, enquanto os indivíduos com perda auditiva progressiva após os 29 anos foram alocados para o grupo A.

Testes de análise Sequenom MassARRAY SNP

Com base em estudos anteriores, rs11928865 e rs11920109 foram selecionados como os SNPs de GRM7 relevantes para a PANS relacionada à idade.^{1,2} A genotipagem foi feita com amplificação por reação de polimerase em cadeia (PCR) e análises MassARRAY específicas para SNPs. O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue total com o minikit QIA-amp DNA Blood (Qiagen, Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os primers foram projetados com o *software* Assay Designer 3.1 e foram sintetizados pelo Instituto de Genômica de Pequim, na China. O método MassARRAY foi usado para analisar o genótipo dos dois loci de SNP selecionados. A amplificação por PCR foi feita com configuração de abertura de 384 na PCR (Applied Biosystems, Pequim, China). As condições do ciclo da PCR incluíram uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida por 45 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20s, anelamento a 56 °C por 30s e uma extensão a 72 °C por 1 min e uma fase final de extensão a 72 °C por 3 min. O sequenciamento do produto da PCR foi feito com o analisador MassARRAY (Applied Beijing Genomics Institute, Pequim, China).

Análises estatísticas

Foram feitas com o *software* SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Aplicou-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg e examinamos a representação grupal das frequências gênicas em cada grupo. Os dados de medição foram avaliados com o teste *t* e os dados categóricos foram avaliados com um teste de qui-quadrado multicamada ou teste exato de Fisher. As comparações entre alelos intergrupos e frequência genotípica foram feitas com o teste do qui-quadrado. Os riscos relativos dos genótipos são indicados pelo *odds ratio* (OR) e pelo intervalo de confiança de 95% (IC95%). A diferença foi estatisticamente significativa para $p < 0,05$.

Resultados

A faixa do teste de reconhecimento de fala do grupo A foi de 26-120 dB e o limiar auditivo médio foi de $50,91 \pm 19,34$ dB. Os respectivos valores para o grupo B foram 26-120 dB e $53,53 \pm 18,44$ dB. Os respectivos valores para o grupo C foram -5 dB-25 dB e $9,22 \pm 6,39$ dB. Os respectivos valores para o grupo D foram -5 dB-25 dB e $11,33 \pm 6,24$ dB. Os pacientes foram pareados por idade e sexo entre os grupos de perda auditiva e controle para as análises. Não houve diferenças significantes em relação à idade e ao sexo entre os grupos PANS e controle.

Genotipagem

As distribuições de frequência de alelos e genótipos de rs11928865 e rs11920109 estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A **tabela 1** mostra as diferenças nas frequências de alelos e genótipos dos polimorfismos rs11928865 ($P_{\text{freq}} = 0,937$, OR não ajustado = 1,035, IC95% = 0,787–1,360) e rs11920109 ($P_{\text{freq}} = 0,815$, OR não ajustado = 1,052, IC95% = 0,815–1,300) para indivíduos no grupo com de 30 a 50 anos com PANS e

Tabela 1 Associação dos SNPs rs11928865 e rs11920109 no grupo com perda auditiva neurossensorial com de 30 a 50 anos e no grupo controle com de 30 a 50 anos

SNP	Distribuição genotípica				Frequências alélicas				OR _{não-ajustado} (IC 95%) P _{freq}	
		Controle % (n = 278)		Caso % (n = 467)		Controle %		Caso %		
rs11928865	TT	188	67,60	321	68,70	T	455	81,83	769	82,33
	AT	79	28,40	127	27,20	A	101	18,17	165	17,67
	AA	11	4,00	19	4,10					
rs11920109	CC	90	32,40	154	33,00	C	314	56,47	539	57,71
	CT	134	48,20	231	49,50	T	242	43,53	395	42,29
	TT	54	19,40	82	17,60					

Tabela 2 Associação dos SNPs rs11928865 e rs11920109 no grupo com perda auditiva neurossensorial com de 51 a 70 anos e no grupo controle com de 51 a 70 anos

SNP	Distribuição genotípica				Frequências alélicas				OR _{não-ajustado} (IC95%) P _{freq}	
		Controle % n = 477		Caso % n = 467		Controle %		Caso %		
rs11928865	TT	311	65,20	332	75,60	T	776	81,34	759	86,45
	AT	154	32,30	95	21,60	A	178	18,66	119	13,55
	AA	12	2,50	12	2,70					
rs11920109	CC	220	46,10	185	42,10	C	638	66,88	558	63,55
	CT	198	41,50	188	42,80	T	316	33,12	320	36,45
	TT	59	12,40	66	15,00					

Tabela 3 Modelo de regressão logística: análise dos efeitos dos genótipos GRM7 SNP rs11928865 nos grupos com perda auditiva neurossensorial com de 51–70 anos e nos grupos controle de 51–70 anos

SNPs	Genótipo	Controle	Caso	p	OR	IC 95%
rs11928865	TT	311	332			
	AT	154	95	0,000	0,578	0,492–0,779
	AA	12	12	0,260	0,617	0,266–1,429

grupo controle, que não diferiram significativamente entre si (tabela 1).

A tabela 2 mostra a distribuição dos genótipos do polimorfismo rs11928865 e frequências de alelos para os indivíduos dos grupos B e controle. As distribuições genotípicas do polimorfismo rs11928865 foram significativamente diferentes entre os grupos ($P_{\text{freq}} = 0,001$, $OR_{\text{não ajustado}} = 1,463$, $IC95\% = 1,136 \pm 1,884$). No entanto, as distribuições genotípicas do SNP rs11920109 nesses grupos não foram significativamente diferentes ($P_{\text{freq}} = 0,349$, $OR_{\text{não ajustado}} = 0,846$, $IC95\% = 0,712 \pm 1,047$) (tabela 2).

A tabela 3 mostra os resultados das análises logísticas após os dados terem sido ajustados para idade e sexo. Modelos de regressão logística foram construídos para controlar potenciais efeitos de confusão nos genótipos do GRM7, que mostraram uma diferença significativa nos alelos AT *versus* TT do rs11928865 nos grupos PANS e controle de 51 a 70 anos ($p = 0,000$, $OR_{\text{não ajustado}} = 0,578$,

$IC95\% = 0,429–0,779$), enquanto a diferença nos alelos TT vs. AA não foi estatisticamente significante ($p = 0,260$, $OR = 0,617$, $IC95\% = 0,266–1,429$) (tabela 3).

As distribuições genotípicas foram significativamente diferentes entre indivíduos com entre 51 e 70 anos com ou sem PANS, indicaram que o SNP rs11928865 em GRM7 está associado à susceptibilidade à PANS em indivíduos nessa faixa etária. No entanto, o SNP rs11928865 não foi significativamente diferente entre indivíduos com entre 30 e 50 anos com e sem PANS, o que sugere que rs11928865 não está relacionado à suscetibilidade a PANS nessa faixa etária. Além disso, nenhuma associação foi identificada entre rs11920109 e PANS neste estudo.

Discussão

A incidência de PANS está intimamente relacionada à idade e essa incidência aumenta gradualmente com a idade.

Fatores ambientais e genéticos são as duas principais causas de PANS. Os fatores genéticos representam 35% a 55% da deficiência auditiva relacionada à idade.³ Anormalidades genéticas, como a mutação no gene que codifica a conexina 26,⁴ mutação *frameshift* grainyhead-like 2⁵ e mutações no gene da caderina, foram associadas com PANS.⁶ No entanto, a maioria dos adultos com PANS não tem um histórico genético familiar típico.

Este estudo mostra que o rs11928865 do GRM7 foi associado à suscetibilidade à PANS, o que é consistente com os resultados de estudos anteriores.^{1,2} No entanto, os indivíduos dos estudos anteriores diferiram em relação aos critérios de inclusão e exclusão usados neste estudo, bem como outros fatores, como idade, sexo e condição geral. Luo et al. selecionaram homens chineses com entre 70 e 100 anos como sujeitos e o estudo da doença sistêmica também foi incluído na pesquisa.² O polimorfismo rs11928865 mostrou uma associação significativa com PANS em outro estudo com indivíduos europeus com 53 anos ou mais.¹ Em outro estudo, os indivíduos americanos tinham uma média de 71,3 anos; foi relatada uma correlação significativa entre os SNPs do GRM7 e percepção auditiva.⁷

Além disso, estudos anteriores também demonstraram que sexo e idade podem influenciar a PANS.^{8,9} O risco de PANS está diretamente correlacionado com a idade; os homens são mais suscetíveis a ela do que as mulheres e a perda auditiva tende a ser mais grave nos homens do que nas mulheres.¹⁰

Os resultados deste estudo não mostraram associação entre o locus rs11928865 do GRS7 e PANS no grupo A e nenhum resultado positivo foi observado para o locus rs11920109, refletiu a complexidade da PANS, devido ao envolvimento de múltiplos genes, fatores ambientais, drogas ototóxicas, doenças sistêmicas e hábitos de vida. Vários genes candidatos patogênicos, inclusive os genes que codificam a conexina 26 (GJB2),^{4,11,12} grainyhead-like 2 (GRHL2),⁵ caderina (CDH23),⁶ o gene de canal de potássio dependente da voltagem 4 (KCNQ4),¹³ N-acetiltransferase (NAT),^{14–16} Apolipoproteína E (APOE)¹⁷ e o gene da proteína desacopladora 2 (UCP2)^{18,19} já foram relacionados à suscetibilidade genética à PANS e é provável que esses genes interajam na patogênese dela.

Conclusão

O polimorfismo rs11928865 foi associado a suscetibilidade à PANS nos indivíduos do grupo B, mas não nos indivíduos do grupo A. Isso sugere que diferenças na idade de início da PANS nas duas faixas etárias, medidas pelo tempo e natureza da perda auditiva, podem ser explicadas por diferentes etiologias genéticas.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Aos pacientes por sua participação. Este trabalho foi apoiado pela Natural Science Foundation of Fujian Province, subvenção n° 2015J01405.

Referências

- Friedman RA, Van Laer L, Huentelman MJ, Sheth SS, Eyken EV, Corneveaux JJ, et al. GRM7 variants confer susceptibility to age-related hearing impairment. *Hum Mol Genet.* 2009;18:785–96.
- Luo HJ, Yang T, Jin XJ, Pang XH, Li JP, Chai YC, et al. Association of GRM7 variants with different phenotype patterns of age-related hearing impairment in an elderly male Han Chinese population. *PLOS ONE.* 2013;8:e77153.
- Gates GA, Couropmitree NN, Myers RH. Genetic associations in age-related hearing thresholds. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;125:654–9.
- Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi E, et al. Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet.* 1999;36:829–32.
- Van Laer L, Van Eyken E, Franssen E, Huyghe JR, Topsakal V, Hendrickx JJ, et al. The grainyhead like 2 gene (grhl2), alias tfcp2l3, is associated with age-related hearing impairment. *Hum Mol Genet.* 2008;17:159–69.
- Davis RR, Kozel P, Erway LC. Genetic influences in individual susceptibility to noise: a review. *Noise Health.* 2003;5:19–28.
- Newman DL, Fisher LM, Ohmen J, Parody R, Fong CT, Frisina ST, et al. GRM7 variants associated with age-related hearing loss based on auditory perception. *Hear Res.* 2012;294:125–32.
- Dubno JR, Lee FS, Matthews LJ, Mills JH. Age-related and gender-related changes in monaural speech recognition. *J Speech Lang Hear Res.* 1997;40:444–52.
- Price K, Zhu X, Guimaraes PF, Vasilyeva ON, Frisina RD. Hormone replacement therapy diminishes hearing in peri-menopausal mice. *Hear Res.* 2009;252:29–36.
- Kilicdag EB, Yavuz H, Bagis T, Tarim E, Erkan AN, Kazanci F. Effects of estrogen therapy on hearing in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190:77–82.
- Lefebvre PP, Van De Water TR. Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;32:159–62.
- Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Takasaka T, Adams JC. Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;32:163–6.
- Van Eyken E, Van Laer L, Franssen E, Topsakal V, Lemkens N, Laureys W, et al. KCNQ4: a gene for age-related hearing impairment. *Hum Mutat.* 2006;27:1007–16.
- Unal M, Thmer L, Dogruer ZN, Yildirim H, Yavuzoglu Y, Camdeviren H. N-acetyltransferase 2 gene polymorphism and presbycusis. *Laryngoscope.* 2005;115:2238–41.
- Van Eyken E, VanCamp G, Franssen E, Topsakal V, Hendrickx JJ, Demeester K, et al. Contribution of the N-acetyltransferase 2 polymorphism NAT2*6A to age-related hearing impairment. *J Med Genet.* 2007;44:570–8.
- Bared A, Ouyang X, Angeli S, Du LL, Hoang K, Yan D, et al. Antioxidant enzymes, presbycusis, and ethnic variability. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;143:263–8.
- O'Grady G, Boyles AL, Speer M, DeRuyter F, Strittmatter W, Worley GA. Polipoprotein E alleles and sensorineural hearing loss. *Int J Audiol.* 2007;46:183–6.
- Sugiura S, Uehida Y, Nakashima T, Ando F, Shimokata H. The association between gene polymorphisms in uncoupling proteins and hearing impairment in Japanese elderly. *Acta Otolaryngol.* 2010;130:487–92.
- Kitahara T, Horii A, Kizawa K, Maekawa C, Kubo T. Changes in mitochondrial uncoupling protein expression in the rat vestibular nerve after labyrinthectomy. *Neurosci Res.* 2007;59:237–42.