



Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org



ARTIGO ORIGINAL

Molecular study of hearing loss in Minas Gerais, Brazil[☆]



Raíssa de Oliveira Aquino Schüffner, Karla Lima Nascimento,
Fábio André Dias, Pedro Henrique Teodoro da Silva,
Wrgelles Godinho Bordone Pires, Nilson Moreira Cipriano Junior
e Luciana Lara dos Santos *

Universidade Federal de São João del-Rei, Divinópolis, MG, Brasil

Recebido em 6 de junho de 2018; aceito em 15 de dezembro de 2018
Disponível na Internet em 24 de abril de 2020

KEYWORDS

Hearing loss;
GJB2;
GJB6;
Brazil

Abstract

Introduction: Deafness is the most frequent sensory deficit in humans. Incidence is estimated at 4:1000 births in Brazil. Specific programs for clinical care of patients with hearing loss are still scarce in Brazil and the issue is an important public health problem.

Objective: To determine the frequency of 35delG and D13S1830 mutations in *GJB2* and *GJB6* genes respectively in patients with non-syndromic sensorineural hearing loss from Minas Gerais, Brazil.

Methods: This research involved 53 individuals, who were assessed by a questionnaire for predicting the possibility of non-syndromic deafness and for data collecting. Samples were tested for the presence of the 35delG mutation in *GJB2* gene and D13S1830 in *GJB6* gene by polymerase chain reaction and restriction enzyme digestion.

Results: Epidemiological research has shown that the majority of the subjects are unaware of the etiology and the pathogenesis of hearing loss. In 9 patients (16.98%), 35delG mutation was found in heterozygosis and the allele frequency was estimate to be around 8.5%. Although 9.61% of the patients reported having some degree of consanguinity between the parents and 12.08% reported other cases of deafness in their families, this mutation was not found in homozygosis. The D13S1830 mutation was not found in this study.

Conclusion: This research describes for the first time the frequency of the 35delG and D13S1830 mutation in hearing-impaired individuals from Minas Gerais, Brazil, and the collected data reinforce the need for further studies in this population due to heterogeneity of hearing loss.

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

DOI se refere ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2018.12.005>

[☆] Como citar este artigo: Schüffner RO, Nascimento KL, Dias FA, Silva PH, Pires WG, Cipriano Junior NM, et al. Molecular study of hearing loss in Minas Gerais, Brazil. Braz J Otorhinolaryngol. 2020;86:327–31.

* Autor para correspondência.

E-mail: llaramg@hotmail.com (L.L. Santos).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

2530-0539/© 2019 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

PALAVRAS-CHAVE

Perda auditiva;
GJB2;
GJB6;
Brasil

Estudo molecular da perda auditiva em Minas Gerais, Brasil**Resumo**

Introdução: A surdez é o déficit sensorial mais frequente em humanos. Estima-se que a incidência seja de 4:1.000 nascimentos no Brasil. Programas específicos para atendimento clínico de pacientes com perda auditiva são escassos no Brasil e a questão é um importante problema de saúde pública.

Objetivo: Determinar a frequência das mutações 35delG no gene *GJB2* e D13S1830 no *GJB6* em pacientes deficientes auditivos de origem neurosensorial e não síndrômica de Minas Gerais, Brasil.

Método: A pesquisa envolveu 53 indivíduos selecionados por meio de questionário o qual avaliou a possibilidade de surdez não síndrômica entre outros dados. As amostras foram testadas quanto à presença da mutação 35delG no gene *GJB2* e D13S1830 no gene *GJB6* por reação em cadeia da polimerase e digestão com enzima de restrição.

Resultados: A pesquisa epidemiológica mostrou que a maioria dos indivíduos desconhece a etiologia da perda auditiva. Em 9 pacientes (16,98%), a mutação 35delG foi encontrada em heterozigose e a frequência alélica foi estimada em 8,5%. Embora 9,61% das pessoas tenham relatado algum grau de consanguinidade entre os pais e 12,08% relatassem outros casos de surdez em suas famílias, essa mutação não foi encontrada em homozigose. A mutação D13S1830 não foi encontrada neste estudo.

Conclusão: Este trabalho descreve pela primeira vez a frequência da mutação 35delG e D13S1830 em deficientes auditivos de Minas Gerais, Brasil, e os dados coletados reforçam a necessidade de mais estudos nessa população devido à heterogeneidade da perda auditiva.

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

Introdução

A surdez é o déficit sensorial mais frequente em humanos, com uma incidência que varia de 1:300 a 1:1.000 crianças. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a perda auditiva afeta cerca de 10% da população mundial.¹ A frequência da surdez no Brasil é estimada em 4:1.000 nascimentos. No Brasil, fatores ambientais são responsáveis por 80% dos casos e as causas genéticas são responsáveis pelos outros 20%.^{2,3}

As formas hereditárias não síndrômicas, que não estão associadas a outras manifestações clínicas, são responsáveis por cerca de 70% dos casos e podem ser autossômicas recessivas (DFNB), autossômicas dominantes (DFNA), ligadas ao X ou mitocondriais. As formas recessivas são mais prevalentes (75% a 80% dos casos) e tendem a ser mais graves e frequentemente associadas a alterações na cóclea, levam à incapacidade neurosensorial. As formas dominantes (15% a 20% dos casos) são mais leves e contribuem, na maioria dos casos, para a surdez pós-lingual progressiva. As formas ligadas ao X são mais raras, assim como a forma mitocondrial.⁴⁻⁸ A identificação precoce da surdez com o diagnóstico etiológico também possibilita o tratamento precoce, melhora o prognóstico. No Brasil, os programas específicos para atendimento clínico de pacientes com perda auditiva ainda são escassos e isso constitui um importante problema de saúde pública. A pesquisa da surdez congênita não síndrômica com teste de Guthrie não está disponível no sistema público de saúde brasileiro (SUS, Sistema Único de Saúde) e apenas o teste de emissões otoacústicas (EOA) é exigido, por lei, nos recém-nascidos.⁹ Além disso, o diagnóstico molecular é mais restrito em pesquisas científicas e a alta heterogeneidade

genética da perda auditiva não síndrômica é um fator complicador.¹⁰

Mais de 150 loci foram mapeados e 93 genes foram identificados para perda auditiva não síndrômica,¹¹ embora os genes envolvidos e as frequências das mutações sejam fortemente influenciados pela composição étnica da população.¹² Descobriu-se que mutações em três genes que codificam a conexina, *GJB2* (Cx 26), *GJB6* (Cx 30) e *GJB3* (Cx 31), causam deficiência auditiva e a ocorrência nos dois primeiros é mais frequentemente descrita.² Variações no gene *GJB2* são responsáveis por até 50% de todos os casos de perda auditiva não síndrômica geneticamente causada em caucasianos.¹³ Não há relatos sobre a frequência das mutações nesses genes na população de surdos de Minas Gerais e aqui estimamos a frequência de duas mutações frequentemente descritas, 35delG no gene *GJB2* e D13S1830 no gene *GJB6* em pacientes com deficiência auditiva não aparentados do estado de Minas Gerais, Brasil.

Método**Amostra**

Foi feito um estudo transversal, no qual 53 indivíduos com deficiência auditiva, 32 homens e 21 mulheres, todos não aparentados, foram estudados. Incluímos no estudo pacientes sem confirmação clínica sobre a causa da deficiência. Portanto, foram incluídos pacientes com deficiência auditiva classificada como de causa desconhecida, sem hipótese diagnóstica sobre a causa da perda auditiva, ausência de confirmação através de testes específicos e/ou confirmação médica descrita no relatório. Não houve restrição de idade

para participação neste estudo. Todos os indivíduos são moradores da região Centro-Oeste de Minas Gerais. Os pacientes foram recrutados da escola de assistência audiovisual para deficientes auditivos (AAVIDA) e da associação de surdos de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de São João del-Rei, em Minas Gerais, com parecer favorável número 009/2011. Todos os passos para o esclarecimento do estudo foram feitos com a linguagem brasileira de sinais (Libras) e a língua portuguesa, para que todos os participantes tivessem plena autonomia para decidir sobre sua participação na pesquisa. Os indivíduos que decidiram participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Usou-se um questionário para coleta de dados relacionados à idade de início da perda auditiva, presença de outros casos na família, relações consanguíneas na família, manifestação de síndromes associadas à deficiência auditiva para confirmação de surdez não síndrômica e exclusão de causas ambientais com confirmação médica: infecções pré-natais, como rubéola ou toxoplasmose, infecções pós-natais e exposição a medicamentos ototóxicos.

Análise molecular

Amostras de sangue (5 mL) foram coletadas dos pacientes e o DNA genômico foi isolado de acordo com procedimentos padronizados.¹⁴ A amplificação da região genômica para análise da mutação 35delG no gene *GJB2* foi feita com *primers* descritos anteriormente e a temperatura de *annealing* usada foi de 65 °C.² A PCR produz um fragmento de 89 pb que é digerido pela enzima de restrição BstNI. Indivíduos sem a mutação 35delG têm o sítio de restrição para a enzima BstNI e produzem dois fragmentos, de 69 pb e 20 pb. A deleção de 35delG elimina o sítio de restrição da enzima e, consequentemente, indivíduos homozigotos para essa mutação produzem apenas um fragmento de 89 pb, enquanto indivíduos heterozigotos produzem os três fragmentos descritos acima.²

A mutação D13S1830 no gene *GJB6* foi detectada pela técnica padrão de PCR com três *primers*, F: (TTT AGG GCA TGA TTG GGG TGA TTT), R1: (CAC CAT GCG TAG CCT TAA CCA TTTT) e R2: (TCA TCG GGG GTG TCA ACA AACA).² A temperatura de *annealing* foi de 62 °C. Os *primers* R1 e R2 estão localizados no gene que codifica a proteína conexina 30 e o *primer* F está localizado antes da região de 342 kb, a qual é deletada em indivíduos com a mutação. O *primer* reverso (R2), por sua vez, está localizado próximo ao ponto de quebra do DNA na presença da mutação. Indivíduos normais que não têm a mutação formarão produtos de 681 pb amplificados pelos *primers* R1 e R2. Quando a deleção ocorre, a região de *annealing* do *primer* R2 é perdida, aproxima-se das regiões de anelamento dos *primers* F e R1, amplifica um fragmento de 460 pb. Portanto, os indivíduos heterozigotos têm fragmentos de 681 pb e 460 pb, enquanto os indivíduos homozigotos com a mutação apresentam apenas o fragmento com 460 pb. Duas mutações (35delG e D13S1830) foram rastreadas em todos os participantes.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato de prata. O produto de extração do DNA foi armazenado no *freezer* (temperatura média de -6 °C) e de maneira similar aos produtos da PCR. Todas as análises foram feitas em um laboratório especializado em biologia molecular da Universidade Federal de São João del-Rei, Divinópolis, MG, Brasil.

Resultados

Neste estudo, foram avaliados 53 indivíduos com deficiência auditiva. A idade dos pacientes variou de 5 a 42 anos, com média de 23,5.

Em relação ao estágio da perda auditiva, 32,07% dos indivíduos apresentaram manifestação ao nascimento, 26,41% perceberam a incapacidade auditiva antes dos dois anos e 11,32% após os dois anos. Essa informação não foi avaliada para 30,18% dos indivíduos. Entre os pacientes que responderam a perguntas sobre a etiologia da surdez, ninguém apresentou laudo médico que confirmasse a etiologia da perda auditiva. Pacientes com suspeitas sobre a possível causa de deficiência, mas sem confirmação médica, corresponderam a 60,37% da amostra; os dados não estavam disponíveis para 39,62%. O grande número de dados faltantes pode estar relacionado à falta de informação dos indivíduos sobre a provável causa da deficiência auditiva.

A linguagem brasileira de sinais (Libras) é uma forma de comunicação usada pela maioria dos participantes, 86,79%. Apenas 9,43% usam comunicação oral e os dados não foram avaliados para 3,77% da amostra.

Na análise de consanguinidade, 9,61% das pessoas relataram a existência de algum grau de consanguinidade entre os pais (confirmado apenas por genograma simples) e 12,08% relataram outros casos de surdez em suas famílias.

Em relação à análise molecular, indivíduos com surdez de etiologia desconhecida e residentes na região Centro-Oeste do Estado de Minas Gerais, Brasil, foram investigados quanto à presença das mutações 35delG e D13S1830 nos genes *GJB2* e *GJB6*, respectivamente. Dos 106 alelos presentes nos 53 indivíduos submetidos à análise molecular, nove apresentavam a mutação 35delG. Assim, a frequência alélica da mutação 35delG na amostra estudada foi de 8,5%. Todos os indivíduos com essa mutação eram heterozigotos (16,98%). Embora os pacientes relatassem a presença de relacionamentos consanguíneos em algumas famílias, os indivíduos homozigotos para essa mutação não foram encontrados. A mutação D13S1830 não foi encontrada nos indivíduos testados.

Discussão

Casos de surdez pré-lingual podem estar associados a fatores ambientais ou herança genética. Os fatores ambientais no Brasil estão entre as principais causas de perda auditiva, a síndrome da rubéola congênita e a anóxia neonatal são os fatores de risco associados mais prevalentes (33,5%), seguidos pelos de etiologia desconhecida (18,5%). Nos casos de surdez pós-lingual, a perda pode ser uma consequência do uso de medicamentos ototóxicos, história familiar de perda auditiva, pode ser considerada idiopática em alguns casos.¹⁵

A mutação 35delG no gene *GJB2* é a principal causa de surdez genética em populações caucasianas e foi descrita em todos os estudos feitos em outras regiões brasileiras.^{13,15,16} Essa mutação foi encontrada em heterozigose em 16,98% da amostra estudada. As formas recessivas da perda auditiva são as mais prevalentes nas formas hereditárias não síndrômicas. Quando os pacientes apresentam a mutação 35delG em ambos os alelos (homozigose), é possível afirmar que a deficiência auditiva se manifesta como resultado desse genótipo. No entanto, quando a mutação está em heterozigose, como na maioria dos casos, é necessário fazer análises adicionais no gene *GJB2*, para investigar uma possível heterozigose composta como justificativa da manifestação da surdez.

Tabela 1 Frequência da mutação 35delG em estudos anteriores feitos em populações brasileiras

Região	População amostral	Alelo 35delG	Referências
Estado de Minas Gerais	53 pacientes com perda auditiva não síndrômica	8,5%	Presente Estudo
Estado de São Paulo	300 pacientes com perda auditiva não síndrômica	9,8%	17
Estado de São Paulo	180 pacientes com perda auditiva não síndrômica	13,30%	18
Estado de São Paulo	33 pacientes com perda auditiva neurosensorial não síndrômica congênita	21,21%	8
Estado do Espírito Santo	77 pacientes com perda auditiva não síndrômica	7,8%	2
Norte do Brasil	77 pacientes com perda auditiva não síndrômica	5,19%	19

A frequência da mutação 35delG em uma amostra de deficiência auditiva do Estado de Minas Gerais foi descrita pela primeira vez neste estudo. Essa frequência é semelhante a outras já descritas em populações do Sudeste do Brasil (tabela 1). Os que não estão de acordo podem ser devido ao tamanho da amostra e aos critérios de seleção da amostra.^{2,8,17-19} Apesar de D13S1830 ser uma mutação frequentemente descrita em populações brasileiras, este alelo não foi encontrado na amostra de Minas Gerais. Alguns outros estudos também não encontraram essa mutação em sua análise.¹⁹⁻²¹ Embora as causas ambientais da surdez possam ser altamente frequentes no Brasil, a identificação das causas genéticas ocultas através dos testes moleculares é importante. O teste genético é útil para o diagnóstico precoce para atingir os objetivos na reabilitação de indivíduos surdos e aconselhamento genético. A pesquisa epidemiológica, como descrita aqui, mostrou que a maioria dos indivíduos desconhece a etiologia da surdez. Alguns deles suspeitam da causa, mas nenhum indivíduo tem um laudo médico, o que confirma a falta de dados quanto à etiologia e à patogenia da perda auditiva. Todos esses aspectos envolvidos na compreensão etiológica da surdez são importantes para proporcionar um melhor prognóstico; o estímulo da fala e a fraqueza da diáde audição-fala contribuem para uma melhor qualidade de vida para indivíduos com deficiência auditiva genética não síndrômica e suas famílias.¹⁷

Embora variações no gene *GJB2* causem quase que exclusivamente perda auditiva autossômica recessiva pré-lingual, esse distúrbio é muito heterogêneo.¹³ Outras mutações, ou outros genes não estudados aqui podem estar envolvidos na patogênese da deficiência. O sequenciamento do gene *GJB2* poderia ser útil para identificar o segundo alelo mutante e, apesar do sequenciamento do gene *GJB6* não ter sido relatado em populações brasileiras até o momento, seria interessante identificar outras possíveis frequentes mutações associadas à deficiência auditiva.

Conclusão

Este trabalho descreve pela primeira vez a investigação molecular de dois genes relacionados à perda auditiva na população de Minas Gerais. A frequência alélica da mutação 35delG na amostra estudada foi de 8,5% e a mutação D13S1830 no gene *GJB6* não foi encontrada nos pacientes investigados. Esses resultados, em conjunto, reforçam a necessidade de mais estudos sobre a investigação da surdez no Brasil, a fim de melhorar as questões de saúde pública e o aconselhamento genético. Informações genéticas e epidemiológicas possibilitam a identificação etiológica, aconselhamento genético para famílias e melhor avaliação da possibilidade de tratamento.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os pacientes por participarem deste estudo, à Escola de Assistência Audiovisual para Deficientes Auditivos (AAVIDA) e à Associação de Surdos de Divinópolis.

Referências

1. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann NY Acad Sci.* 1991;630:16-31.
2. Cordeiro-Silva Mde F, Barbosa A, Santiago M, Provetti M, Rabbi-Bortolini E. Prevalence of 35delG/GJB2 and del (GJB6-D13S1830) mutations in patients with non-syndromic deafness from a population of Espírito Santo-Brazil. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010;76:428-32.
3. Piatto VD, Maniglia JV. Importância do Gene Conexina 26 na etiologia da deficiência auditiva sensorioneural não-síndrômica. *Acta AWHO.* 2001;20:106-12.
4. Piatto VB, Oliveira CA, Alexandrino F, Pimpinati CJ, Sartorato EL. Prospects for genetic hearing loss screening: 35delG mutation tracking in a newborn population. *J Pediatr.* 2005;81:139-42.
5. Carvalho GM, Ramos PZ, Castilho AM, Guimaraes AC, Sartorato EL. Molecular study of patients with auditory neuropathy. *Mol Med Rep.* 2016;14:481-90.
6. Shearer AE, Hildebrand MS, Smith RJHMD. Hereditary hearing loss and deafness overview; 2017, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1434/> of subordinate document [accessed 08.03.17].
7. Piatto VB, Moreira OA, Silva MA, Maniglia JV, Pereira MC, Sartorato EL. Correlation between audiometric data and the 35delG mutation in ten patients. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2007;73:777-83.
8. Piatto VB, Bertollo MGE, Sartorato LE, Maniglia VJ. Prevalence of the GJB2 mutations and the del(GJB6-D13S1830) mutation in Brazilian patients with deafness. *Hear Res.* 2004;196:87-93.
9. Luz I, Ribas A, Kozłowski L, Willig M, Berberian AP. Newborn Hearing Screening in a Public Maternity Ward in Curitiba, Brazil: determining factors for not retesting. *Int Arch Otorhinolaryngol.* 2016;20:300-4.
10. Manzoli GN, Bademci G, Acosta AX, Felix TM, Cengiz FB, Foster J2nd, et al. Targeted resequencing of deafness genes reveals a founder MYO15A variant in northeastern Brazil. *Ann Hum Genet.* 2016;80:327-31.
11. Niu Z, Feng Y, Hu Z, Li J, Sun J, Chen H, et al. Exome sequencing identifies a novel missense mutation of WFS1 as the cause of

- non-syndromic low-frequency hearing loss in a Chinese family. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2017;100:1–7.
12. Camp VG, Smith R. Hereditary hearing loss homepage; 2018, <http://hereditaryhearingloss.org/> of subordinate document [accessed 05.03.17].
 13. Parzefall T, Frohne A, Koenighofer M, Kirchnawy A, Streubel B, Schoefer C, et al. Whole-exome sequencing to identify the cause of congenital sensorineural hearing loss in carriers of a heterozygous GJB2 mutation. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2017;274:3619–25.
 14. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
 15. Bernardes R, Bortoncello S, Christiani TV, Sartorato EL, Silva RC, Porto PR. Molecular investigation in children candidates and submitted to cochlear implantation. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006;72:333–6.
 16. Oliveira CA, Pimpinati CJ, Alexandrino F, Magna LA, Maciel-Guerra AT, Sartorato EL. Allelic frequencies of the 35delG mutation of the GJB2 gene in different Brazilian regions. *Genet Test.* 2007;11:1–3.
 17. Batissoco AC, Abreu-Silva RS, Braga MC, Lezirovitz K, Della-Rosa V, Alfredo T Jr, et al. Prevalence of GJB2 (connexin-26) and GJB6 (connexin-30) mutations in a cohort of 300 Brazilian hearing-impaired individuals: implications for diagnosis and genetic counseling. *Ear Hear.* 2009;30:1–7.
 18. Svidnicki MC, Silva-Costa SM, Ramos PZ, dos Santos NZ, Martins FT, Castilho AM, et al. Screening of genetic alterations related to non-syndromic hearing loss using MassARRAY iPLEX(R) technology. *BMC Med Genet.* 2015;16:85.
 19. Castro LS, Marinho AN, Rodrigues EM, Marques GC, Carvalho TA, Silva LC, et al. A study of GJB2 and delGJB6-D13S1830 mutations in Brazilian non-syndromic deaf children from the Amazon region. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2013;79:95–9.
 20. Manzoli GN, Abe-Sandes K, Bittles AH, da Silva DS, Fernandes Lda C, Paulon RM, et al. Non-syndromic hearing impairment in a multi-ethnic population of Northeastern Brazil. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2013;77:1077–82.
 21. Melo US, Santos S, Cavalcanti HG, Andrade WT, Dantas VG, Rosa MR, et al. Strategies for genetic study of hearing loss in the Brazilian northeastern region. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2014;5:11–21.