



Brazilian Journal of  
**OTORHINOLARYNGOLOGY**

www.bjorl.org.br



ARTIGO ORIGINAL

## Molecular approach of auditory neuropathy<sup>☆</sup>

Magali Aparecida Orate Menezes da Silva<sup>a</sup>, Vânia Belintani Piatto<sup>b,\*</sup>, Jose Victor Maniglia<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgião de Cabeça e Pescoço, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Anatomia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil

Recebido em 4 de julho de 2014; aceito em 12 de agosto de 2014

### KEYWORDS

Deafness;  
Genes;  
Molecular biology;  
Mutation

### Abstract

*Introduction:* Mutations in the otoferlin gene are responsible for auditory neuropathy.

*Objective:* To investigate the prevalence of mutations in the otoferlin gene in patients with and without auditory neuropathy.

*Methods:* This original cross-sectional case 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 mutations in the otoferlin gene sites were amplified by polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism.

*Results:* The 16 index cases included nine (56%) females and seven (44%) males. The 13 deaf patients comprised seven (54%) males and six (46%) females. Among the 20 normal-hearing subjects, 13 (65%) were males and seven were (35%) females. Thirteen (81%) index cases had wild-type genotype (AA) and three (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 seven (44%) index cases and nine (56%) had the wild-type allele (CC). Of these mutants, two (25%) were compound heterozygotes for the mutations found in intron 8 and exon 44. All patients with sensorineural hearing loss and normal-hearing individuals did not have mutations (100%).

*Conclusion:* There are differences at the molecular level in patients with and without auditory neuropathy.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2015.03.005>

<sup>☆</sup> Como citar este artigo: da Silva MA, Piatto VB, Maniglia JV. Molecular approach of auditory neuropathy. Braz J Otorhinolaryngol. 2015;81:321-8.

\* Autor para correspondência.

E-mails: vbpiatto@gmail.com, vania.piatto@famerp.br (V.B. Piatto).

**PALAVRAS-CHAVE**

Surdez;  
Genes;  
Biologia molecular;  
Mutação

**Abordagem molecular da neuropatia auditiva****Resumo**

**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.

**Método:** Estudo de casos em corte transversal sendo 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.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

**Introdução**

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 (otoferlina) são as mais frequentes das causas genéticas de surdez em crianças. Esse tipo de deficiência auditiva (DA) é mais complicado, uma vez que, na fase inicial, pode apresentar-se como uma neuropatia auditiva (NA), não sendo detectada por triagem auditiva neonatal baseada no teste de emissões otoacústicas.<sup>1</sup>

A NA é um tipo único de DA quando timpanogramas são normais, os reflexos acústicos e os potenciais evocados auditivos de tronco encefálico (PEATE) são ausentes ou gravemente alterados, mas a função das células ciliadas externas é normal, evidenciada pela presença de emissões otoacústicas (EOAs). Pacientes com essa desordem podem apresentar variações nos graus de DA, além de ter grave prejuízo na compreensão da fala, sendo desproporcional ao grau de perda auditiva.<sup>1</sup>

Em 2003, foi definido o termo “NA não sindrômica autossômica recessiva” devido às características audiológicas e também às descobertas genéticas relacionadas a mutações no gene OTOF que foram associadas a esse tipo de surdez.<sup>2</sup> O gene OTOF, localizado no cromossomo 2 (2p23-p22), contém 48 exons e codifica a proteína otoferlina, sendo expresso nas células ciliadas internas cocleares e nas células ciliadas vestibulares Tipo I.<sup>3</sup> A partir de então, foram publicados estudos moleculares que permitiram a identificação de mutações no gene OTOF e associá-las à NA não sindrômica autossômica recessiva.<sup>2-12</sup>

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo investigar a prevalência das mutações no gene OTOF: 2416T-A (Y730X) no exon 18,<sup>3</sup> IVS8-2-A-G no intron 8/exon 9,<sup>6</sup> 2485C-

T (Q829X) no exon 22,<sup>5</sup> 5473C-G (Pro1825Ala) no exon 44<sup>5</sup> e 3032T-C (Leu1011Pro) no exon 26,<sup>9</sup> em pacientes com NA e em pacientes com DA não sindrômica.

**Método**

No período de 01/04/2010 a 30/07/2011, foi realizado estudo em corte transversal no qual, dentre 1.230 casos de DA sensorineural não sindrômica (DASN) do Ambulatório de Surdez da Instituição, foram selecionados 16 pacientes (Grupo NPT - Neuropatia) de ambos os gêneros com NA, os quais foram denominados de casos índice, tendo como critérios de inclusão: exame otoscópico normal; diagnóstico de DASN pela audiometria tonal; presença de EOAs e/ou microfonismo coclear na pesquisa do PEATE; ausência de ondas do PEATE ou alteração grave da morfologia das mesmas; normalidade ao exame de ressonância magnética; ausência dos fatores de risco (infecções materno-fetais, meningites, drogas ototóxicas) ou de neuropatias periféricas; e os critérios de exclusão: diagnóstico de perda auditiva condutiva ou mista; presença dos fatores de risco ou de neuropatias periféricas; e idade maior que 65 anos.

Também foram selecionados 13 pacientes (Grupo DASN), de ambos os gêneros, já com diagnóstico de DASN, cujos exames audiológicos não correspondiam ao quadro clínico de NA e sem mutações nos genes da Conexina 26 e GJB6.

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.

Os casos índice, pacientes e controles eram da mesma origem racial, idade ≤ 65 anos, sem casamento consanguíneo e da mesma área geográfica.

O estudo foi aprovado pelo CEP da Instituição (Parecer n° 44/2010). O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue periférico usando-se o *kit* de extração *GE Illustra - Blood Genomicprep Mini Spin Kit™* (GE Healthcare UK Limited), de acordo com o protocolo do fabricante.

Todas as cinco mutações analisadas no gene OTOF foram identificadas pelas suas posições no Gene Bank NCBI RefSeq-Gene: NG\_009937.1. Para a análise molecular foram utilizados os testes da PCR/RFLP (*Polimerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Cada uma das cinco reações da PCR foi processada em ciclodador 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 e inverso); 3- Conjunto de Reagentes Fidelity™ PCR MasterMix (2×) (GE HEALTHCARE®), com protocolo 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 específico para cada par utilizado: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, 35 ciclos repetidos de 60 segundos a 94 °C para desnaturação, 60 segundos a X °C para anelamento do *primer* (para a mutação 2416T-A: 56 °C; IVS8-2A-G: 51 °C; 2485C-T: 58 °C; mutação 5473C-G: 59 °C; mutação 3032T-C: 52 °C) e extensão de 2 minutos a 72 °C e 10 minutos a 72 °C para extensão final. Os fragmentos amplificados pela PCR foram, respectivamente, submetidos à RFLP, utilizando-se 5U das seguintes enzimas enzima Ddel, BgIII, Bfal, Faul e MspI (New England Biolabs®).

Os produtos das reações (PCR/RFLP) foram adicionados ao azul de bromofenol e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão Tris-Borato-EDTA 1X contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL), tendo sido submetidos à iluminação ultravioleta e os géis fotodocumentados.

## Análise estatística

Os resultados foram submetidos previamente à estatística descritiva para determinação da normalidade. Foram utilizados o Teste do Qui-quadrado para comparação entre variáveis independentes com distribuição normal e o Teste de Kruskal-Wallis para amostras com distribuição não normal, além do *odds ratio* com intervalo de confiança de 95% (95% IC). O nível de significância foi estabelecido em 5%. Testes estatísticos foram realizados usando o programa *GraphPad InStat version 3.00* (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). A coerência da distribuição genotípica com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada por testes exatos.<sup>13</sup>

## Resultados

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

Dos 13 pacientes do Grupo DASN, sete (54%) eram do gênero masculino e seis (46%) do gênero feminino. Em relação

à faixa etária, a idade variou entre sete e 37 anos para o gênero masculino (M-22,7 anos; DP ± 12,6), e para o gênero feminino a idade variou entre 12 e 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%) eram do gênero masculino e sete (35%) do gênero feminino. Em relação à faixa etária, a idade variou entre 19 e 44 anos para o gênero masculino (M-28,5 anos; DP ± 7,2), e para o gênero feminino a idade variou entre 20 e 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 1).

A tabela 2 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 apresentaram o genótipo selvagem (AA) e três (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 sete (44%) dos casos índice e nove (56%) apresentaram o alelo selvagem (CC). Nos Grupos DASN e Controle, 100% dos indivíduos não apresentaram qualquer das mutações analisadas no gene OTOF.

Sendo assim, no Grupo NPT, foram encontrados oito (50%) casos índice com mutações no gene OTOF, sendo um (12,5%;

**Tabela 1** Distribuição das variáveis demográficas dos casos índice do Grupo NPT, pacientes do Grupo DASN e indivíduos do Grupo Controle

Variáveis	Grupo NPT (n = 16)	Grupo DASN (n = 13)	Grupo Controle (n = 20)	p
<i>Gênero</i>	n (%)	n (%)	n (%)	
Masculino	7 (44)	6 (46)	7 (35)	0,49 <sup>a</sup>
Feminino	9 (56)	7 (54)	13 (65)	
<i>Classificação etária</i>	n (%)	n (%)	n (%)	
Lactente	1 (06)	0 (00)	0 (00)	0,37 <sup>a</sup>
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, ±18,5	0,091 <sup>b</sup>

M ± DP, Média ± Desvio-padrão.

<sup>a</sup> Teste Qui-quadrado.

<sup>b</sup> Teste de Kruskal-Wallis.

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

F1.3) heterozigoto para a mutação IVS8-2A-G, cinco (62,5%; F1.2, F4.1, FBT1, FBT3.2 e FBT4.2) heterozigotos para a mutação 5473C-G e dois (25%; F1.1 e F5G1) heterozigotos compostos para as mutações encontradas, respectivamente, no intron 8 e exon 44. Dos familiares ouvintes, a mãe da Família 1 (F1.M) era heterozigota composta para as mutações analisadas no intron 8 e exon 44, e as mães das Famílias FBT3 e FBT4 eram heterozigotas apenas para a mutação 5473C-G (tabela 3).

O Grupo NPT foi avaliado para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) 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, para os casos índice do Grupo NPT, foram A = 0,91 e G = 0,09. As frequências genotípicas observadas do homozigoto selvagem (AA-13), heterozigoto mutante (AG-3) e homozigoto mutante (GG-0) destes casos índice se encontravam em concordância com as frequências esperadas pelo EHW ( $\chi^2 = 0,171$ ;  $p = 0,68$ ). Em relação à mutação 5473C-G, 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 homozigoto selvagem (CC-9), heterozigoto mutante (CG-7) e homozigoto mutante (GG-0) destes casos índice também se encontravam em concordância com as frequências esperadas pelo EHW ( $\chi^2 = 0,125$ ;  $p = 0,26$ ).

Em relação ao grau de perda auditiva encontrado nos casos índice do Grupo NPT, três (19%) apresentavam grau leve, cinco (31%) grau moderado, cinco (31%) grau grave e três (19%) grau profundo. No Grupo DASN, quatro (31%) apresentavam grau moderado, dois (15%) grau grave e sete (54%) grau profundo. 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 à identificação de mutação somente no intron 8 e exon 44 no gene OTOF, a tabela 4 demonstra os graus de perda auditiva nos casos índice do Grupo NPT e os genótipos encontrados nos mesmos, pela análise molecular dessas regiões.

Dentre os casos índice com mutação, os que apresentavam os graus grave (4; 25%) e profundo (3; 19%) foram mais prevalentes do que aqueles sem mutação (1 grau grave apenas, 6%) do mesmo Grupo, os quais apresentaram maior prevalência nos graus leve (3; 19%) e moderado (4; 25%), sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,022$ ).

## Discussão

A NA é um distúrbio auditivo caracterizado pela distorção grave ou ausência do PEATE com as EOAs preservadas, indicando, assim, a presença de integridade das células ciliadas externas.<sup>14</sup>

Dentre as causas já identificadas de NA, estão a hiperbilirrubinemia, a hipoxia neonatal e/ou doenças neurodegenerativas, mas há relatos de NA “isolada”, isto é, sem qualquer fator de risco associado, não tendo sido proposto qualquer mecanismo fisiopatológico para explicar esses casos. Os recentes avanços na pesquisa genética têm permitido uma nova abordagem para elucidar a fisiopatologia dessa afecção.<sup>15,16</sup>

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar a prevalência de cinco mutações no gene OTOF em pacientes com diagnóstico de NA, em indivíduos ouvintes e em pacientes com DASN. Estes foram incluídos a fim de se verificar se mutações no gene OTOF poderiam ser identificadas em ouvintes e em pacientes com DASN sem mutações em outros genes e sem NA.

Em relação às variáveis demográficas analisadas, houve prevalência do gênero feminino nos três grupos do estudo, não sendo esta diferença estatisticamente significativa. 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 e que são concordantes com os poucos relatos existentes na literatura sobre a prevalência de gênero e faixa etária relacionados ao gene OTOF.<sup>17,18</sup>

A maior parte dos relatos de mutações identificadas no gene OTOF tem sido descrita em homozigose e em famílias consanguíneas.<sup>3,4,6,9,18-22</sup> 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 NA podem ocorrer nestes casos.

Casos de heterozigose em pacientes com NA foram descritos, associados ou não a casamento consanguíneo.<sup>2,5,8,10-12,23,24</sup>

**Tabela 3** 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)
F1.1	-/- (TT)	-/+ (AG)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
F1.2	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
F1.3	-/- (TT)	-/+ (AG)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
F2.2 M	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
F2.3	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
F2.6	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
F2.11	-/- (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)
F3.3	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
F4.1	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
F5.GI	-/- (TT)	-/+ (AG)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
F5.GII	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
F6.1	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
FBT1	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
FBT2	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
FBT3.M	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
FBT3.1	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
FBT4.M	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
FBT4.1	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
FBT4.2	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/+ (CG)	-/- (TT)
FBT5.GI	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)
FBT5.GII	-/- (TT)	-/- (AA)	-/- (CC)	-/- (CC)	-/- (TT)

Sublinhado, casos índice com neuropatia auditiva (NPT); F, família; P, pai do caso índice; M, mãe do caso índice; GI, Gemelar I; GII, Gemelar II; -/-, genótipo homocigoto selvagem para a mutação analisada; -/+, genótipo heterocigoto para a mutação analisada; -/+, genótipo heterocigoto para a mutação analisada em familiar ouvinte.

No presente estudo, a mutação IVS8-2A-G foi encontrada em heterocigose (um alelo mutante) em 12,5% dos casos índice, o mesmo ocorrendo para a mutação 5473C-G, a qual foi encontrada em 62,5% dos casos. Em 25% dos casos, as duas mutações identificadas ocorreram conjuntamente no mesmo indivíduo, é, por esse motivo, são denominadas heterocigotos compostos. Estas duas mutações, assim como as outras três analisadas, não foram encontradas em 100% do Grupo DASN (100%) e também em 100% do Grupo Controle, dados estes concordantes com as referências.<sup>2,5,8,10-12,23,24</sup>

Em 2000, a mutação IVS8-2A-G foi primeiramente descrita em homocigose em três irmãos indianos nascidos de casamento consanguíneo, e em heterocigose nos pais e nos irmãos não afetados, não sendo identificada nos 109 indivíduos ouvintes do grupo controle.<sup>6</sup> Não há relatos posteriores sobre essa mutação. A mutação 5473C-G foi descrita em heterocigose composta em uma família espanhola, sendo a mutação 2485C-T no exon 22 a identificada no outro alelo.<sup>5</sup>

Da mesma forma, não há relatos posteriores sobre a referida mutação no exon 44.

A mutação IVS8-2A-G, por criar um prematuro *stop codon*, e a 5473C-G, por alterar a capacidade de ligação com o Ca<sup>2+</sup> no gene selvagem, são consideradas patogênicas, quando em homocigose.<sup>3,5</sup> No presente estudo, ambas foram encontradas em heterocigose composta somente nos casos índice com NA (F1.1 e F5.GI), o que poderia explicar a causa molecular da perda auditiva nos mesmos, pois o fenótipo de NA 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 NA, por serem parcialmente relacionadas à natureza (truncada ou não truncada) ou à localização (isoforma longa ou curta) das mesmas.<sup>23</sup>

No entanto, na mãe ouvinte (F1.M) do caso índice (F1.1) heterocigoto composto também foram encontradas as mesmas mutações em heterocigose composta. Como a mãe é ouvinte, a causa da DA do caso índice em questão pode ser devida a outra mutação existente em outros exons ou

**Tabela 4** 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

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

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 DA 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,<sup>10-12</sup> sendo que somente um deles identificou a mutação 2485C-T no exon 22 em heterozigose em 0,5% do total de casos de pacientes com DA sensorioneural não síndrômica (1/200).<sup>10</sup>

As estimativas da prevalência da NA em surdos variam entre 1% a 19%.<sup>25-28</sup> No Brasil, a prevalência de NA entre todos os casos de surdez é 1,2%.<sup>29</sup> Esta faixa de variação pode se dever ao fato de que diferentes populações foram estudadas ou por diferenças nos critérios utilizados para identificar pacientes com esta afecção. A prevalência de NA dentro de uma população sem fatores de risco não está ainda bem estabelecida.<sup>9</sup> No presente estudo todos os critérios de inclusão e exclusão foram rigorosamente seguidos, determinando-se assim a prevalência de 1,3% de casos com NA dentro de uma população com surdez sensorioneural no período estudado.

Também, a estimativa brasileira dos graus de perda nos pacientes com NA varia entre 29,6% grau leve; 55,5% moderado; 7,4% grave e 7,5% profundo.<sup>29</sup> No presente estudo, 19% apresentavam grau leve, 31% moderado, 31% grave e 19% profundo. Dentre os casos índice com mutações no gene OTOF, houve prevalência estatisticamente significativa dos graus grave e profundo em relação aos graus de perda leve e moderado nos casos índice sem mutação. A intensidade da perda auditiva causada pela NA pode variar de leve a pro-

funda, havendo uma queda desproporcional para a compreensão da palavra falada que não correspondem ao audiograma tonal.

Há certa homogeneidade na descrição do fenótipo dos pacientes com mutações no gene OTOF, o qual é caracterizado por DA congênita ou pré-lingual de grau profundo e não associado a outras anormalidades, conforme os casos índice estudados. Sendo assim, a NA seria a única manifestação fenotípica de mutações no gene OTOF, com distinguível perda auditiva pela relativa preservação da função das células ciliadas externas.<sup>9,30</sup>

A presença de EOAs nos primeiros meses de vida tem importantes implicações nos programas de rastreamento neonatal, como triagem inicial. Nos casos de NA, existe o risco dessa perda não ser diagnosticada, pois, apesar de estes pacientes terem surdez de grau grave a profundo, 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 no nível das células ciliadas internas, nas sinapses ou no nervo auditivo.<sup>28</sup>

No contexto da investigação da DA, é importante levar em consideração a existência do tipo de perda da NA, a qual é frequentemente subdiagnosticada. Assim, frente a uma criança ou paciente com surdez e com presença de EOAs, a hipótese de NA 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.<sup>28</sup>

As potenciais limitações em relação aos resultados encontrados no estudo merecem consideração. Apesar dos resultados positivos, os mesmos devem ser interpretados com atenção e devem ser corroborados por estudos independentes.

tes e multicêntricos para determinar a real prevalência de mutações no gene OTOF e a associação com a NA na população brasileira.

## Conclusão

As evidências de associação entre mutações no gene OTOF e a NA permitem concluir que: existem diferenças, em nível molecular, entre pacientes com e sem este tipo de perda auditiva; na ausência fatores de risco, a combinação de distorção grave ou ausência do PEATE e presença das EOAs deve direcionar ao diagnóstico de NA e ao rastreamento de mutações no gene OTOF; e os testes moleculares são valiosos complementos de diagnóstico não apenas individual, mas também como método de rastreamento para estudo populacional ou neonatal.

## Financiamento

Este estudo foi financiado pela Bolsa-auxílio Pesquisa (BAP-FAMERP).

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Agradecimentos

Aos pacientes e responsáveis que, por concordarem com a execução desta pesquisa, contribuirão para um futuro melhor às crianças de nosso país. À Instituição na qual a pesquisa foi realizada, pelo incentivo à pesquisa e à qualificação docente.

## Referências

- 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.
- Varga R, Kelley PM, Keats BJ. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene. *J Med Genet.* 2003;40:45-50.
- 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.
- Adato A, Raskin L, Petit C. 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 Genet.* 2000;8:437-42.
- Migliosi V, Modamio-Høybjør S, Moreno-Pelayo MA, Rodríguez-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.
- 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.
- Mirghomizadeh F, Pfister M, Apaydin F, Petit C, Kupka S, Pusch CM, et al. Substitutions in the conserved C2C domain of otoferlin cause DFNB9, a form of nonsyndromic autosomal recessive deafness. *Neurobiol Dis.* 2002;10:157-64.
- Rodríguez-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 Mutat.* 2003;22:451-6.
- 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 Genet.* 2005;138:6-10.
- Fávero ML, Romanos J, Mingroni-Neto R.C. Neuropatia auditiva de corrente de mutação no gene OTOF. *Arq Otorrinolaringol.* 2005;9:325-30.
- 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 Part A.* 2007;143:1574-9.
- Romanos J, Kimura L, Fávero ML, Izarra FA, de Melo Auricchio MT, Batissoco AC, et al. Novel OTOF mutations in Brazilian patients with auditory neuropathy. *J Hum Genet.* 2009;54:382-5.
- Rodríguez S, Gaunt TR, Day INM. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol.* 2009;169:505-514. Disponível em: <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>
- 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.
- Manchiaiah VK, Zhao F, Danesh AA. The genetic basis of auditory neuropathy spectrum disorder (ANSD). *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011;75:151-8.
- Cooper DN, Ball EV, Stenson PD. The Human Gene Mutation Database; 2014. Disponível em: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
- Sheykholeslami 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.
- 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.
- Houseman MJ, Jackson AP, Al Gazali LI. 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.
- Gallo-Terán J, Megía López R, Morales-Angulo C, del Castillol, 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.
- Gallo-Terán J, Morales-Angulo C, Rodríguez-Ballesteros M. 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Psarommatis IM, Tsakanikos MD, Komtrogiani AD. 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/dyssynchrony and its perceptual consequences. *Trend Amplif.* 2005;9:1-43.
27. Foerst A, Beutner D, Lang-Roth R. 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. Penido RC, Isaac ML. Prevalence of auditory neuropathy spectrum disorder in an auditory health care service. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2013;79:429-33.
30. Gallo-Terán J, 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.