



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

KATIA CRISTINA COSTA

ETIOLOGIA DA PERDA AUDITIVA EM NEONATOS DIAGNOSTICADOS EM UM
PROGRAMA DE TRIAGEM AUDITIVA NEONATAL

CAMPINAS

2016

KATIA CRISTINA COSTA

ETIOLOGIA DA PERDA AUDITIVA EM NEONATOS DIAGNOSTICADOS EM UM
PROGRAMA DE TRIAGEM AUDITIVA NEONATAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestra
em Ciências Médicas, área de concentração em Otorrinolaringologia.

ORIENTADOR: EDI LÚCIA SARTORATO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA KATIA CRISTINA COSTA, E ORIENTADA PELA
PROF(A). DR(A). EDI LÚCIA SARTORATO.

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos – CRB 8/8402

C823e Costa, Katia Cristina, 1979-
Etiologia da perda auditiva em neonatos diagnosticados em um programa de triagem auditiva neonatal / Kátia Cristina Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Edi Lúcia Sartorato.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Perda auditiva neurossensorial. 2. Perda auditiva. 3. Triagem neonatal. I. Sartorato, Edi Lúcia, 1962-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Etiology of hearing loss in a newborn hearing screening program

Palavras-chave em inglês:

Hearing loss, Sensorineural

Hearing loss

Neonatal screening

Área de concentração: Otorrinolaringologia

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Edi Lúcia Sartorato [Orientador]

Camila Andréa de Oliveira

Maria Francisca Collela-Santos

Data de defesa: 06-06-2016

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

KATIA CRISTINA COSTA

ORIENTADOR (a) PROF (A). DR (A). EDI LÚCIA SARTORATO

MEMBROS:

1. PROF.(A) DR. (A). EDI LÚCIA SARTORATO

2. PROF. (A) DR. (A). CAMILA ANDRÉA DE OLIVEIRA

3. PROF.(A) DR.(A). MARIA FRANCISCA COLELLA DOS SANTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 06 de junho de 2016

Aos meus pais, irmãos, tios, primos, cunhados, sobrinhos e gatinhos.

Em especial a minha mãe Nilcéia!

AGRADECIMENTOS

À Deus que me proporciona esta vida maravilhosa cheia de oportunidades.

Aos meus pacientes da ATEAL e seus responsáveis que confiam em mim e no meu trabalho, sem eles não seria possível a criação e execução deste estudo.

À Prof. Dra. Edi Lúcia Sartorato pela orientação e sua amizade. Prof. Dra. Edi além de ser uma pessoa incrível no âmbito profissional também é uma pessoa de um “coração enorme”: uma humildade única para toda a sua sabedoria. Obrigada por me receber na sua equipe, obrigada por entender as minhas dificuldades, obrigada pela paciência, obrigada pela oportunidade.

Aos professores que gentilmente se dispuseram e contribuíram para as bancas de qualificação e defesa: Dra. Andréa Maciel, Dra. Camila Andréa de Oliveira, Dr. Edmir Américo Lourenço, Dr. Reinaldo Gusmão, Dra. Maria Francisca Colella.

Um agradecimento especial para a Prof. Dra. Sueli Matilde da Silva Costa a quem devo toda minha experiência de escrever relatório, artigo e dissertação. Diria que a professora Sueli é “a mãe e amiga” na pós-graduação. Prof. Dra. Sueli obrigada por suas orientações, por suas colocações, o seu incentivo e interesse em me ajudar. Obrigada por sua paciência também.

Ao Prof. Dr. Silvio Antônio Monteiro Marone que já na residência médica me inspirou a seguir a carreira acadêmica principalmente na área da Triagem Auditiva Neonatal. Na residência já me designava para “limpar os ouvidos dos bebês” da TANU. Muito obrigada Professor!

À Mariza Pomílio, diretora da ATEAL, que acredita não só na assistência aos pacientes portadores de perda auditiva como também nas pesquisas e que vibrou com o “nosso” trabalho a cada vez que o mesmo foi apresentado no Brasil e no exterior.

À Tania Pereira, coordenadora da área da Saúde Auditiva da ATEAL e a Enfermeira Ellen Carine coordenadora do Centro Médico de Santa Bárbara d’ Oeste por me ajudarem na “logística”, que permitiu frequentar as aulas da pós-graduação, pré requisitos obrigatórios para o mestrado. Também agradeço a Sandra, Marlene, Milene, Thuane da ATEAL e Ana (e o pessoal da regulação) que me ajudaram a

organizar as agendas e os horários dos pacientes. Trabalhar e estudar ao mesmo tempo não é fácil!

Ao pessoal da equipe do CBMEG: Dra. Priscila Zonzini por me orientar, ajudar e resolver minhas dúvidas (inclusive as mais bobas) sempre com muita tranquilidade e competência; Natália Zocal por me ajudar a “ser estudante novamente” me explicando passo a passo o funcionamento da pós; Alessandra, técnica do laboratório que me ensinou os procedimentos e técnicas utilizados no laboratório. Obrigado a todos que me receberam muito bem no CBMEG.

Às fonoaudiólogas Gisele Longui e Daniela Petrechem que trabalham junto comigo no diagnóstico da perda auditiva dos bebês da TANU, sempre queremos melhorar!!

Obrigada a enfermeira e amiga Silamar que colheu o sangue dos bebês com muito cuidado e dedicação.

Aos meus ex professores da otorrino e colegas: Mário, BB, Hed, Renato Talli e Juliana Bertoncello e a fonoaudióloga Maria Inês Moretti que sempre acreditavam no meu potencial, inclusive para “dar aulas”.

Aos meus amigos, com quem muitas vezes não pude estar junto, principalmente por estar ocupada com a pesquisa. Aos meus amigos que trocavam plantões para que eu pudesse frequentar as aulas ou apresentações na pós-graduação. Agradecimento especial Amanda Rossi e ao trio Marco, Bruno e Wilson. Eles sempre me incentivaram e acreditaram no meu potencial.

A TODOS meus amigos que de alguma forma me ajudaram mesmo que você “torcendo” por mim nesta pequena batalha.

À minha família que amo muito e em especial a minha mãe Nilcéia que sempre me ajudou nas realizações dos meus sonhos.

RESUMO

A Triagem Auditiva Neonatal Universal (TANU) é o meio mais precoce para a identificação e a reabilitação da perda auditiva congênita. Concomitantemente ao diagnóstico audiológico, a identificação da etiologia da perda auditiva é importante, uma vez que pode fornecer resposta aos familiares dos portadores da perda auditiva assim como o aconselhamento genético quando necessário. Além disso, o conhecimento da causa da perda auditiva pode permitir que os serviços de saúde promovam e atuem nas ações de prevenção ou melhoria das causas que poderiam ser evitáveis, como por exemplo as doenças infecciosas congênitas. A identificação da etiologia também permite a realização de monitoramentos auditivos mais constantes, uma vez que algumas perdas cursam com alterações do padrão audiológico e podem se manifestar como perdas auditivas de forma flutuante ou progressiva como o caso da infecção por citomegalovírus e síndrome do aqueduto vestibular alargado.

O propósito deste estudo foi determinar a frequência e as etiologias das perdas auditiva assim como verificar os achados audiológicos em um Programa de Triagem Auditiva Neonatal.

Neste estudo 43.230 neonatos foram triados para perda auditiva, sendo identificados 56 com perda auditiva neurossensorial, no período de Agosto de 2003 a Dezembro de 2014. Destes, 31 pacientes realizaram a investigação etiológica para a perda auditiva. A perda auditiva foi detectada em 1,2 neonatos a cada mil. As etiologias foram ambiental em 22,6% dos casos, desconhecida em 22,6% dos casos e sem causa esclarecida (há presença de fatores de risco hereditários porém sem confirmação) em 22,6%. Etiologia genética com confirmação molecular foi determinado em 16,1% dos casos, todos apresentaram a mutação c.35delG. Causa de “múltiplos fatores” foi observada em 16,1% dos casos. Este presente estudo mostra a importância do sequenciamento pelo menos do gene *GJB2* no programa de triagem da perda auditiva permitindo, em alguns casos, a confirmação do diagnóstico etiológico. Os fatores de risco e os achados dos exames permitiram concluir a etiologia nos pacientes de causa ambiental, causa de “múltiplos fatores” e genético e pressupor que no grupo de causa não esclarecida haja componentes hereditários. Os achados audiológicos no grupo da etiologia genética exibiram o padrão esperado de perda

auditiva bilateral de grau profundo, mas nas demais categorias não foi possível determinar um padrão característico.

Palavras chaves: perda auditiva neurossensorial, triagem auditiva neonatal, etiologia, mutação 35delG.

ABSTRACT

The Newborn Hearing Screening Program (NHSP) is a way to promote early diagnosis of hearing impairment. Concomitantly with early diagnosis and intervention, it is important to search for the primary cause. The identification of the cause of hearing loss could help explain the underlying cause to the patient's family, ensure that patients receive genetic counseling when necessary, and help health services to promote awareness regarding or prevent or improve the underlying causes (primarily those of environmental origin). Furthermore, information regarding the etiology of hearing loss can help confirm the diagnosis and guide the creation of hearing programs, since some losses occur with alterations of audiological pattern: can be floating or progressive as the case of cytomegalovirus infection and the enlarged vestibular aqueduct syndrome.

In the present study, we aimed to determine the frequency and etiology of sensorineural hearing loss as well as the audiological findings in neonates enrolled in a hearing screening program in a city in Brazil.

In this prospective study, we identified 56 neonates with sensorineural hearing loss from among 43.230 screened newborns who underwent the hearing screening program between August 2003 and December 2014. A total of 31 then underwent etiological assessments. Hearing loss was detected in 1.2 per 1000 newborns. The etiologies were environmental in 22.6% cases, unknown in 22.6% cases, and unexplained (including the presence of hereditary risk factors that cannot be confirmed as the cause) in 22.6% cases. A genetic etiology with molecular confirmation was determined in 16.1% cases, all of which exhibited a homozygous c.35delG mutation. Multiple factors causes were observed in 16.1% cases.

The present study shows the importance of sequencing at least the *GJB2* gene in a hearing screening program allowing in some cases the accurate diagnosis. Moreover, the risk factors and test findings observed in this study suggest that the etiology of hearing loss may be environmental, multiple risk factors, or genetic, and that patients with unexplained causes may likely have a hereditary condition. With regard to genetic etiology, patients exhibited a profound degree bilateral condition, as expected; however, none of the other etiologic categories exhibited a characteristic pattern.

Key words: sensorineural hearing loss, newborn hearing screening, etiology, mutation c.35delG.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ilustração da anatomia da orelha. Figura retirada do Mini Atlas Vertigem (23).....	22
Figura 2 - Ilustração da orelha média. Figura retirada do livro Miniatlas Vertigem (23).....	23
Figura 3 - Ilustração de corte da cóclea, com visualização das rampas vestibular, timpânica e canal coclear. Figura retirada do livro Miniatlas Vertigem (23).....	24
Figura 4 - Ilustração de corte histológico do Órgão de Corti. (Imagem retirada do site: https://audiology.wordpress.com/la-coclea/anatomy/) (25).....	25
Figura 5 - Ilustração do mecanismo de transdução; inclinação dos estereocílios com abertura dos canais de cálcio e a liberação de vesículas com neurotransmissores. (Imagem retirada do site https://audiology.wordpress.com) (25).....	26
Figura 6- Ilustração da estrutura da Conexina (retirado do site: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Connexon_and_connexin_structure.svg)...39	39
Figura 7 – Fluxograma com resumo e a constituição da casuística.....	61
Figura 8 - Ilustrações do processo de eletroforese em gel de agarose (A) e dos produtos da amplificação visualizados após coloração de brometo de etídio (B). Arquivo do autor.....	71
Figura 9 - Gráfico distribuição das crianças diagnosticadas na TANU, crianças com perda auditiva neurossensorial confirmada e crianças participantes do estudo conforme o ano.....	80
Figura 10 - Gráfico idade do diagnóstico audiológico em meses nos pacientes conforme ordem cronológica de nascimento.....	81
Figura 11 - Gráfico idade do diagnóstico etiológico em meses nos pacientes conforme ordem cronológica de nascimento.....	82
Figura 12 - Gráfico situação do paciente em relação ao acompanhamento, uso de dispositivo auditivo (AASI ou IC) e reabilitação.....	83
Figura 13 - Gráfico forma de comunicação dos pacientes portadores de perda auditiva do estudo.....	84
Figura 14 - Gráfico fatores de risco para perda auditiva encontrado em 19 pacientes do estudo.....	85
Figura 15 - Gráfico distribuição das etiologias da perda auditiva nas crianças (n=31) do estudo.....	91
Figura 16 - Gráfico caracterização da perda auditiva da população do estudo quanto a lateralidade bilateral e o grau.....	93

Figura 17 - Gráfico caracterização da perda auditiva da população do estudo quanto a lateralidade unilateral e o grau.....	93
Figura 18 - Gráfico distribuição do gênero em relação a etiologia da perda auditiva na população do estudo.....	94
Figura 19 - Gráfico distribuição da lateralidade das perdas auditivas da população do estudo quanto as etiologias das perdas auditivas.....	95
Figura 20 - Gráfico de distribuição do grau de perda auditiva unilateral conforme a etiologia.....	96
Figura 21 - Gráfico de distribuição do grau de perda auditiva bilateral conforme a etiologia.....	97
Figura 22 -Gráfico relação pacientes do estudo e o meio utilizado para o diagnóstico da etiologia da perda auditiva.....	98
Figura 23 - Gráfico correlação meios diagnósticos e pacientes com ou sem fator de risco.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequências dos primers e o tamanho dos fragmentos utilizados para amplificação do gene <i>GJB2</i>	70
Tabela 2- Sequência do par de primers utilizados no rastreamento da mutação IVS1+1G>A.....	72
Tabela 3- Sequência dos pares de primers e tamanhos dos fragmentos utilizados no rastreamento das deleções del(<i>GJB6</i> -D13S1830) e del(<i>GJB6</i> - D13S1854) no gene <i>GJB6</i>	74
Tabela 4- Par de primers utilizados no rastreamento da mutação m.1555A>G no gene mitocondrial MTRNR1.....	75
Tabela 5- Distribuição dos fatores de risco.....	86
Tabela 6- Distribuição dos P valores no teste de igualdade de proporções para os fatores de risco do estudo.....	86
Quadro 1- Apresentação dos fatores de risco, exames laboratoriais, radiológicos, genéticos e etiologia.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CMV	- Citomegalovírus
Cx26	- Conexina 26
Cx30	- Conexina 30
dBNA	- Decibéis
dl	- decilitros
ELISA	- <i>Enzyme –Linked Immunosorbent Assay</i>
FTA-Abs	- <i>Fluorescent Treponemal Antibody Absorption</i>
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
JCIH	- <i>Joint Committee on Infant Hearing</i>
OEA	- Otoemissões Acústicas
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PCR	- Reação em Cadeia de Polimerase
PEATE	- Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
PEATE-A	- Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico Automático
RN	- Recém-nascido
RNs	- Recém-nascidos
SAVA	- Síndrome do Aqueduto Vestibular Alargado
TANU	- Triagem Auditiva Neonatal Universal
TPHA	- <i>Treponema pallidum Hemagglutination</i>
UTI	- Unidade de Terapia Intensiva
VDRL	- <i>Venereal Diseases Research Laboratory</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2.OBJETIVO	21
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivo específico	21
3. REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1. Sistema Auditivo	22
3.2. Definição e classificação de perda auditiva.....	26
3.3. Etiologias das perdas auditiva.....	27
3.3.1. Causas adquiridas: doenças infecciosas	28
3.3.2. Causas adquiridas: intercorrências neonatais	34
3.3.3. Malformações de orelha interna.....	37
3.3.4. Causa genética: perda auditiva de origem não síndrômica	39
3.3.5. Causa genética: perda auditiva não síndrômica no Brasil	44
3.3.6. Causa genética: outros genes envolvidos na perda auditiva não síndrômica.....	48
3.3.7. Causa genética: perda auditiva síndrômica	49
3.4. Espectro da neuropatia auditiva.....	52
3.5. Fatores de risco história familiar e consanguinidade	53
3.6. Triagem auditiva neonatal.....	55
4. MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1. Tipos de estudo.....	60
4.2. Casuística	60
4.3. Métodos	62
4.3.1. Procedimentos audiológicos na triagem auditiva.....	62
4.3.2. Procedimentos após a triagem auditiva	62
4.3.3. Processo diagnóstico da perda auditiva	62
4.3.4. Classificação da perda auditiva	63
4.3.5. Avaliação Otorrinolaringológica	63
4.3.6. Exames laboratoriais	65
4.3.7. Exames de imagem	67
4.3.8. Teste Genético: Estudo molecular dos principais genes da surdez	68
4.3.9. Classificação dos resultados	76
4.3.10. Análises das perdas auditivas	77

4.3.11. Metodologia estatística	77
4.4. Aspectos éticos	79
5. RESULTADOS.....	80
5.1. Características gerais da população do estudo	80
5.2. Fatores de risco presentes na amostra estudada	85
5.3. Resultados do estudo molecular dos principais genes da surdez.....	87
5.4. Resultados dos exames de imagem	87
5.5. Etiologia da perda auditiva	91
5.6. Caracterização audiológica da perda auditiva.....	92
5.7. Correlação etiologia da perda auditiva e gênero.....	94
5.8. Correlação etiologia da perda auditiva e lateralidade	95
5.9. Correlação da etiologia da perda auditiva, lateralidade e grau da perda auditiva	96
5.10. Avaliação dos meios diagnósticos na investigação da etiologia	98
5.11. Correlação meios diagnósticos para investigação etiológica e fator de risco	99
6. DISCUSSÃO	100
7. CONCLUSÃO	104
8. REFERÊNCIAS.....	105
9. ANEXOS	122

1.INTRODUÇÃO

A perda auditiva bilateral apresenta prevalência de 1 a 3 a cada mil recém nascidos (RNs) e de 2 a 4 por cem RNs que permanecem na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal (1). A perda auditiva unilateral identificada nos programas de triagem neonatal apresenta prevalência de 0,5% a 3,4% (2). Um estudo epidemiológico nos Estados Unidos demonstrou que a incidência da perda auditiva neonatal é de 1,1 por mil RNs (3). No Brasil, um estudo em um serviço público de saúde da cidade de Bauru detectou uma prevalência de perda auditiva neurossensorial de 0,96 por mil neonatos (4).

A triagem auditiva neonatal universal (TANU) é o meio de promover o diagnóstico da perda auditiva e sua reabilitação o mais precoce possível. Concomitantemente ao diagnóstico audiológico recomenda-se o diagnóstico etiológico da perda auditiva (5,6).

A identificação da causa da perda auditiva tem por objetivos: fornecer respostas aos familiares das crianças portadoras de perda auditiva; permitir por parte dos serviços de saúde reconhecer as causas das perdas auditivas e quando possível promover e atuar nas ações públicas para prevenção ou melhoria das mesmas, principalmente naquelas de origem ambiental, como doenças congênitas de origem infecciosa ou causas perinatais. Além disso, o conhecimento da etiologia pode prever o prognóstico em alguns casos, como por exemplo, as perdas auditivas por Citomegalovírus (CMV) e Síndrome do Aqueduto Vestibular Alargado (SAVA), etiologias estas que podem cursar com perda auditiva progressiva ou flutuante (5,7).

As causas das perdas auditivas podem ser de origem ambiental ou genética. No Brasil as causas ambientais estão entre os principais motivos para a perda da audição (8,9,10). Entre as perdas auditivas de origem genética, 70% são classificadas como não sindrômicas, ou seja, o paciente apenas apresenta a perda auditiva; e 30% são perdas auditivas sindrômicas, onde a perda auditiva faz parte de um conjunto de sinais e sintomas específicos de uma síndrome. As perdas auditivas não sindrômicas possuem vários padrões de herança: autossômica recessiva (75 a 80%); autossômica dominante (20 a 25%); ligado ao cromossomo X (1 a 2%) e herança mitocondrial (1%) (11).

Em geral o padrão recessivo cursa com perda auditiva neurosensorial pré-lingual de grau severo a profundo. No padrão dominante a perda auditiva geralmente é do tipo progressiva e pós-lingual. A explicação para tal fato seria que nas desordens de herança recessiva, o gene perderia sua “função” totalmente, enquanto que nas perdas auditivas não sindrômicas de origem dominante, haveria uma perda parcial da “função”, uma vez que um alelo seria o normal e o outro mutante (12). Mutações no gene *GJB2* são responsáveis por 50% dos casos de perda auditiva de padrão recessivo (11-13).

O gene *GJB2*, está localizado no braço longo do cromossomo 13 (13q11-q12), no *locus* DFNB1 e codifica a proteína chamada de Conexina 26 (Cx26) (14). Esta proteína está envolvida na formação dos canais ou junções intercelulares, que permitem a circulação dos íons potássio e a reciclagem do mesmo, garantindo assim a homeostase iônica dos líquidos da orelha interna e conseqüentemente o adequado funcionamento da mesma. Mutações no gene da Cx26 ocasionam defeitos nas estruturas das junções intercelulares, interrompendo o fluxo de íons, prejudicando o processo de transdução sensorial auditivo, causando a perda da função auditiva (13).

Nas perdas auditivas de origem ambiental citam-se as infecções congênitas (rubéola, CMV, sífilis, toxoplasmose, herpes vírus, o vírus da Imunodeficiência Humana- HIV), as causas neonatais como asfixia, prematuridade, baixo peso, permanência em UTI, drogas ototóxicas e as causas pós-natais como meningite, trauma craniano, ototóxicos e quimioterapia (15).

Em um estudo de revisão sistemática de perda auditiva bilateral neurosensorial, os autores perceberam que nos estudos mais recentes, as prevalências da perda auditiva por rubéola congênita e causas desconhecidas diminuíram. A explicação para estes fatos seriam, respectivamente, as campanhas de vacinação para rubéola e o aumento do diagnóstico de perda auditiva de origem genética não sindrômica, devido à tecnologia dos exames diagnósticos moleculares da surdez (16). Por outro lado as causas ambientais ainda se mantêm presentes, principalmente pelos avanços médicos e tecnológicos que garantem o nascimento de crianças prematuras e de baixo peso, mas que necessitam permanecer na UTI neonatal com uso de ventilação mecânica, com necessidade de tratamentos com medicações ototóxicas e expostas aos altos ruídos da UTI (15,17).

A triagem auditiva é um processo simples, rápido e não oneroso, que identifica aqueles casos com maiores possibilidades de alteração na função auditiva testada. Aqueles que apresentarem falhas na triagem auditiva neonatal deverão ser encaminhados para procedimentos de maior complexidade (6). A triagem auditiva deve ser universal, uma vez que estudos já demonstraram que pacientes sem fatores de risco podem apresentar perda auditiva (18,19).

Atualmente os procedimentos recomendados na triagem auditiva neonatal são as otoemissões acústicas (OEA) e o Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico Automático (PEATE-A). As OEA são sons de baixa intensidade gerados pela cóclea e transmitidos para a orelha média e canal auditivo, as OEA informam sobre o funcionamento do Órgão de Corti e do sistema eferente auditivo. O PEATE-A é uma modificação do PEATE convencional para a triagem, é baseado em um único estímulo em uma certa intensidade (normalmente 35 dBNA) para verificar resposta do nervo coclear ao tronco encefálico baixo e independe de interpretação. Os dois exames são considerados para a triagem, com resposta “passa” ou “falha” e são complementares uma vez que avaliam funções diferentes do sistema auditivo (20, 21).

Nos RNs considerados de baixo risco pode ser realizado a OEA e se necessário o PEATE-A. Para os neonatos de alto risco é obrigatório o PEATE-A e as OEA, uma vez que estes estão mais susceptíveis a apresentar espectros de neuropatia auditiva (5,6).

Neonatos com fatores de risco mas que passaram na triagem seguem para o programa de acompanhamento auditivo, uma vez que alguns fatores de risco, como por exemplo história familiar e ou CMV, podem cursar com perda auditiva de início tardio. Os neonatos que falharem no teste e reteste serão encaminhados para o processo de diagnóstico audiológico. Nesta etapa recomenda-se o diagnóstico da perda auditiva até os três meses de idade e início da intervenção, seja com uso de aparelhos auditivos ou implante coclear até os seis meses de vida (5).

Este estudo justifica-se pelo fato de apesar do diagnóstico audiológico ser adequadamente realizado pela TANU, ainda se necessita de mais estudos em relação ao diagnóstico etiológico em neonatos.

2.OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo é determinar as etiologias da perda auditiva em um Programa de Triagem Auditiva Neonatal na cidade de Jundiaí, que é referência regional no estado de São Paulo, por meios da avaliação médica, exames laboratoriais, de imagem e os testes moleculares para os principais genes da surdez.

2.2. Objetivos específicos

Descrever os fatores de risco para a perda auditiva mais verificados na população da triagem auditiva neonatal.

Determinar as frequências das etiologias da perda auditiva na amostra estudada e descrever as características das perdas auditivas.

Relatar a frequência de perda auditiva neurossensorial em um Programa de TANU e verificar quais meios diagnósticos (história clínica, exames laboratoriais, exames radiológicos e teste moleculares para a surdez) tiveram maior eficiência na investigação da etiologia da perda auditiva deste estudo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Sistema auditivo

O sistema auditivo é constituído por orelha externa, média, interna e vias auditivas. A orelha como um todo encontra-se no osso temporal e as vias auditivas iniciam-se no nervo auditivo e seguem para o tronco encefálico (22) (Figura 1).

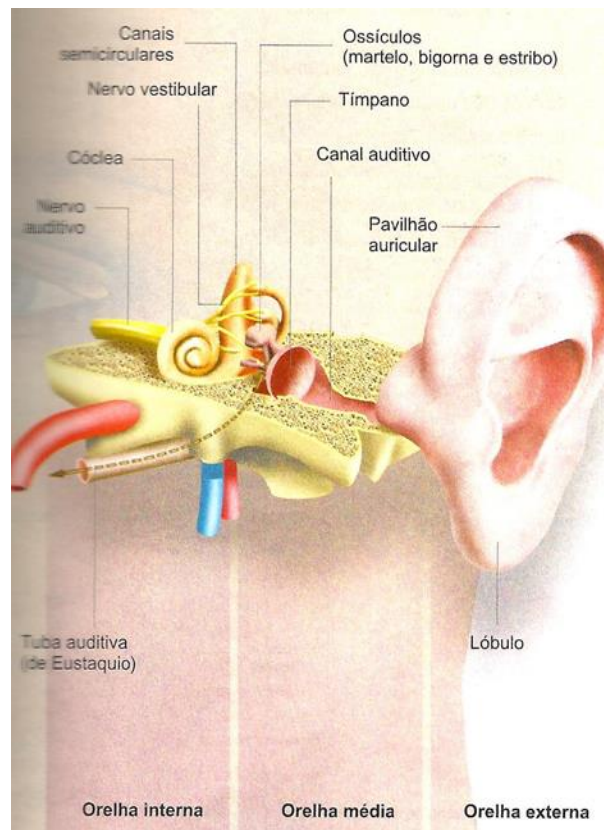


Figura 1- Esquema ilustrativo da anatomia da orelha. Figura retirada do Mini Atlas Vertigem (23).

A orelha externa é constituída de pavilhão auricular, meato acústico externo e face externa da membrana do tímpano. Suas funções são de coletar as ondas sonoras, localizar o som, ressonância do som e amplificação do mesmo. Além disso na pele do meato auditivo externo, a cera produzida pelas glândulas ceruminosa impermeabiliza e protege o ouvido da ação de micro-organismos (22,23).

Considera-se orelha média a face medial da membrana do tímpano, os ossículos (martelo, bigorna e estribo), os músculos e ligamentos pertencentes à esta região, a tuba auditiva, o antro da mastoide e as células mastoídeas (figura 2). A orelha média tem como função transmissão do som sonoro, de uma maneira que não se

perca a energia do som. Para isto é importante que todo o sistema da orelha média se encontre íntegro (23).



Figura 2-Ilustração da orelha média. Figura retirada do livro Miniatlas Vertigem (23).

A tuba auditiva tem a função de igualar as pressões que atuam internamente e externamente na membrana timpânica permitindo sua vibração. A cadeia ossicular transmite as vibrações sonoras da membrana timpânica até janela do vestíbulo. Este é o mecanismo de transmissão por via aérea.

Além da transmissão por via aérea existe a transmissão via óssea, que ocorre por meio de vibrações ósseas (da própria calota craniana e da calota craniana em relação à cadeia de ossículos) que atingem os líquidos da orelha interna, estimulando os receptores do Órgão Espiral também chamado de Órgão Corti (22,23).

A orelha interna é constituída pelo labirinto ósseo que recobre o labirinto membranoso e compreende dois aparelhos diferentes: o coclear e o vestibular.

Os espaços entre os labirintos ósseo e membranoso são ocupados por perilinfa. Na cóclea o labirinto ósseo está dividido em duas cavidades chamadas de rampa vestibular e timpânica e entre elas há um terceiro espaço que é o ducto coclear. No interior das rampas vestibular e timpânica há a presença de perilinfa e no ducto coclear há o líquido endolinfa (22,24) (figura 3).

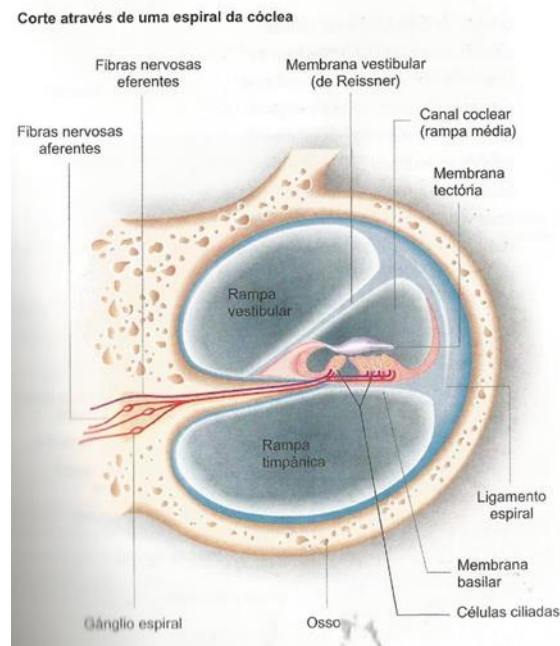


Figura 3- Ilustração de corte da cóclea, com visualização das rampas vestibular, timpânica e canal coclear. Figura retirada do livro *MiniAtlas Vertigem* (23).

A cóclea é formada em volta de um eixo cônico chamado de modíolo, na cóclea está o Órgão de Corti que é a porção sensorial, propriamente dita da orelha interna. Ele está situado na superfície da membrana basilar embebida na endolinfa do canal coclear. Esse órgão é composto de células de suporte e células sensoriais, chamada de células ciliadas externas e internas e recobertas por uma membrana gelatinosa chamada membrana tectórica. As células ciliadas apresentam em sua porção superior filamentos de actina, que são chamados de estereocílios (22,24) (figura 4).

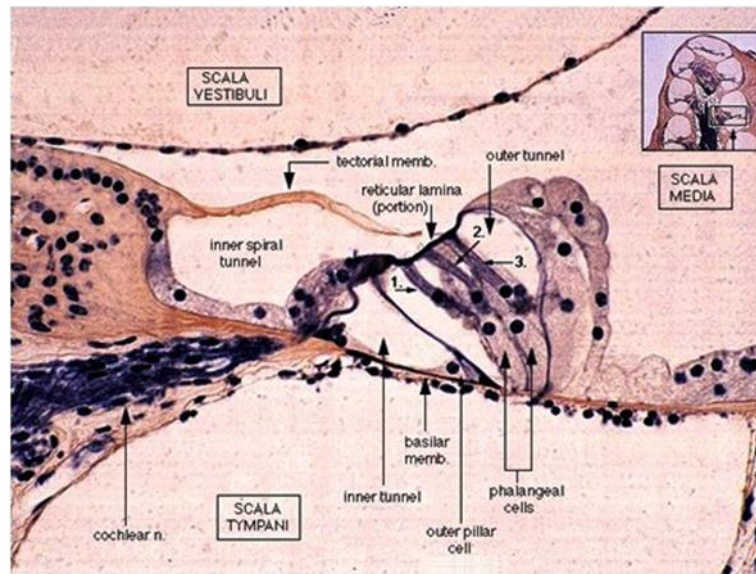


Figura 4- Ilustração de um corte histológico do Órgão de Corti. (Imagem retirada do site: <https://audiology.wordpress.com/la-coclea/anatomy/>) (25).

A inervação aferente das células ciliadas do Órgão de Corti é feita pelo oitavo par, o nervo coclear. Os corpos celulares dos neurônios estão localizados no modíolo, formando assim o gânglio espiral. Os dendritos passam pela membrana basilar, inervando tanto as células internas como externas. Os axônios juntam-se no centro da cóclea, formando o ramo coclear e fazem sua primeira sinapse somente no núcleo coclear situado no tronco cerebral (22,24).

As vias auditivas possuem dois núcleos no tronco encefálico: núcleo coclear e complexo olivar superior; no mesencéfalo há o núcleo do leminisco lateral e colículo inferior e no rombencéfalo estão situados os corpos geniculados medial. O mecanismo auditivo ocorre desde o som captado pela orelha externa, o mesmo exerce uma pressão positiva sobre a membrana timpânica, o qual promove movimento dos ossículos. O estribo por sua vez exercerá pressão na janela oval, através da platina. Os líquidos se movem através da rampa vestibular e timpânica que se comunicam no helicotrema- ápice da cóclea (22,24).

Esta vibração induz a movimentos dos líquidos da cóclea. Este movimento causa vibração da membrana basilar e tectórica, que provocarão a deflexão dos estereocílios, permitindo o influxo dos íons potássio por meio da abertura de canais que despolarizam a membrana das células ciliadas. Essa despolarização permite a

liberação de neurotransmissores nas células ciliadas externas e internas que desencadeiam o impulso nervoso da audição (figura 5) (24).

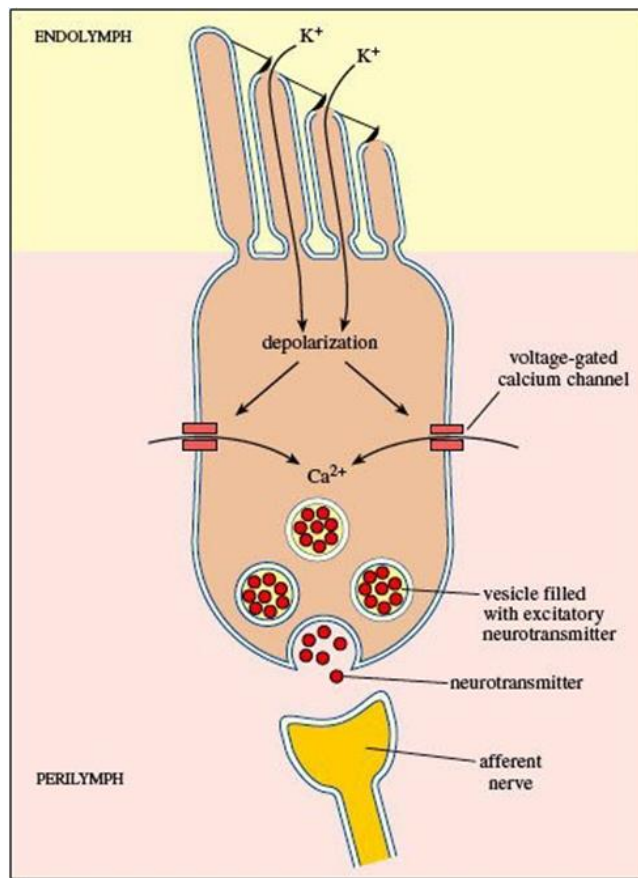


Figura 5-Ilustração do mecanismo de transdução; inclinação dos estereocílios com abertura dos canais de cálcio e a liberação de vesículas com neurotransmissores. (Imagem retirada do site <https://audiology.wordpress.com>) (25).

3.2. Definição e Classificações da Perda Auditiva

Perda auditiva consiste na diminuição ou na ausência total do sentido de ouvir. É considerada quando os limiares auditivos psicoacústicos são detectados maiores que 20 dBNA na criança e 25dBNA no adulto. A perda auditiva pode afetar uma ou ambas as orelhas e pode ser de grau leve a profundo. O termo surdez, segundo a Organização Mundial da Saúde -OMS, aplica-se as pessoas portadoras de perda auditiva profunda, que escutam pouco ou quase nada e que geralmente se comunicam por sinais (26).

O JCIH, em 2007, considera perda auditiva nos neonatos as perdas auditivas sensoriais congênita uni ou bilateral; as condutivas permanentes e a perda

do tipo neuronal, perda esta incluída pelo surgimento do diagnóstico do espectro da neuropatia auditiva (5).

A perda auditiva pode ser congênita, desde o nascimento ou ser adquirida durante algum período da vida. Pode ser chamada de pré-lingual quando ocorre antes do indivíduo adquirir linguagem ou pós-lingual, quando o indivíduo já tem habilidades linguísticas, incluindo a fala (27).

Também é classificada de acordo com o acometimento anatomofisiológico: perda auditiva condutiva geralmente ocorre quando há injúrias na orelha externa e/ou orelha média. Perda auditiva neurossensorial ocorre geralmente quando há injúria na cóclea (surdez sensorial), no nervo coclear (surdez neural), no tronco cerebral (surdez de tronco encefálico, causada por exemplo por Kernicterus) e no sistema nervoso (surdez central). Perda auditiva mista é quando se tem os dois mecanismos de lesão associados: o condutivo e o neurossensorial (24).

3.3. Etiologias das perdas auditivas

As perdas auditivas podem ser consideradas de origem hereditária/genética ou ambientais, adquirida no período pré-natal, neonatal e pós-natal. Citam-se como causas ambientais adquiridas, de acordo com o período estas abaixo (15):

Pré-natal: as doenças de origem infecciosas congênicas, uso de medicações ou álcool/drogas durante gestação, diabetes mellitus, raio x, talidomida, hipóxia, nefropatia;

Neonatal (nascimento até 28 dias): asfixia, cardiopatia congênita, herpes, prematuridade, baixo peso (<1500g), trauma obstétrico, aspiração de mecônio e hiperbilirrubinemia;

Pós-natal: sepse, aminoglicosídeos, herpes zoster, meningite bacteriana, radiação, trauma acústico, tumores ou cistos de fossa posterior.

As causas não ambientais são as causas genéticas que englobam os casos genéticos de perda auditiva não sindrômica e síndromes genéticas com perda auditiva. Alguns fatores de risco como história familiar e consanguinidade podem ser considerados fatores não ambientais, porém muitas vezes não há comprovação nos testes moleculares para o diagnóstico de perda auditiva. Nos estudos de etiologias,

onde ainda não era difundido a tecnologia dos exames moleculares, incluía-se na causa genética pacientes com comprovação de padrão de herança ou casos de consanguinidade (15,28).

Atualmente as perdas genéticas são classificadas como não sindrômica e sindrômica, onde o portador da perda auditiva apresenta sinais dismórficos que façam parte de uma síndrome. Nas não sindrômicas, o padrão de herança mais presente entre as perdas auditiva é o padrão autossômico recessivo (75-80%), seguido do autossômico dominante (20%), padrão ligado ao cromossomo X (2-5%) e a herança mitocondrial (1%) (11).

3.3.1. Causa adquirida: doenças infecciosas

As doenças infecciosas de origem congênita que podem causar perda auditiva são a Toxoplasmose, Rubéola, CMV, Herpes Vírus, Sífilis e HIV.

A Rubéola Congênita, conhecida principalmente pela tríade clássica defeitos cardíacos, catarata e perda auditiva neurossensorial, encontra-se sob controle nos países que, em 2002, participaram da campanha de imunização global. Porém em alguns locais como Sudeste Asiático, sua incidência continua aumentada. Seus riscos para os efeitos teratogênicos encontram-se principalmente quando a gestante se infecta no primeiro trimestre (29,30).

A perda auditiva por rubéola congênita se caracteriza na maioria dos casos como bilateral, de grau profundo (31). No Brasil alguns estudos demonstraram que a prevalência da rubéola como causa de perda auditiva era alta. Lima, 2000, encontrou em 150 crianças, de um centro de reabilitação auditiva, de 2 a 13 anos, 22% de perda auditiva por rubéola (9). Cecatto, 2003, em um estudo em uma escola para surdos, encontrou 23,6% de casos relativos a rubéola congênita (10).

Nóbrega, avaliando as causas em dois períodos de anos: 1990 a 1994 e 1994 a 2000, demonstrou que a rubéola congênita, ainda era a segunda causa etiológica mais presentes nos pacientes com perda auditiva, com índices menores apenas que a causa desconhecida (28). Um estudo de 2007 estudou o impacto da vacinação contra a rubéola (iniciada em 1992 até 2000) no Brasil e demonstrou que os casos de rubéola congênita diminuiram a partir de 2001 (32).

O vírus Herpes Simples, quando presente, costuma ser sintomático já ao nascimento. As infecções por este vírus podem ocorrer na gestação, durante o parto ou no período pós-natal. As sequelas de uma infecção congênita são microcefalia, coriorretinite, microftalmia, além da perda auditiva (31).

Em uma revisão sistemática na literatura em 2008, com objetivo de avaliar a perda auditiva imediata ou tardia pelo vírus Herpes Simples chegou-se à conclusão, que o screening não é necessário, uma vez que são raras as infecções comprovadamente pelo Herpes Simples e que, justamente por ser sintomático, quando a infecção ocorre é fácil identificá-la (33).

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível causada pela bactéria *Treponema pallidum*. Sua transmissão ocorre por via sexual ou vertical, quando esta última ocorre é chamada de sífilis congênita. Em 2005, a prevalência de gestante com diagnóstico de sífilis foi entre 1,4% e 2,8% e a taxa de transmissão vertical de 25% (34). Esta transmissão costuma ocorrer só a partir do quarto mês, uma vez que as células de Langerhans na placenta que impediam a entrada do *Treponema* tornam-se atrofiada e permitem a circulação da bactéria através da placenta para o feto. A gravidez pode evoluir com aborto espontâneo, natimorto e trabalho de parto prematuro (35).

Na sífilis congênita precoce, os sintomas podem aparecer até os dois anos de idade, com sintomas como lesões de pele, lesões ósseas, hepatomegalia, manifestações hematológicas. O aparecimento após o segundo ano de vida de sintomas é chamado de manifestações tardias e incluem: alterações ósseas e dentárias, ceratite intersticial e surdez (34).

A perda auditiva causada pela sífilis geralmente é descrita como súbita, bilateral, profunda e sem sintomas vestibulares associados (36). O Ministério da Saúde recomenda a sorologia não treponêmica inicialmente, o *Venereal Diseases Research Laboratory*, VDRL e se o teste apresentar titulação positiva recomenda-se os testes treponêmicos- *Treponema pallidum Hemagglutination*- TPHA; *Fluorescent Treponemal Antibody Absorption* – FTA-Abs e o *Enzyme –Linked Immunosorbent Assay*- ELISA. O tratamento da sífilis é a Penicilina Benzatina para as gestantes e para o recém-nascido (RN) caso o mesmo nasça sintomático ou com sorologias positivas (34).

Um artigo de revisão de 2009, no intuito de avaliar a perda auditiva na sífilis congênita, encontrou apenas um estudo que preenchia os critérios de inclusão: estudo longitudinal com crianças expostas ou infectadas pelo *Treponema*, com avaliações audiométricas adequadas e com confirmação sorológica ou dos sintomas, excluindo-se qualquer outra causa de perda auditiva na criança. Apenas um artigo foi encontrado nestes critérios e nenhum caso de perda auditiva foi encontrado (37).

A toxoplasmose congênita é a infecção durante a gestação pelo protozoário *Toxoplasma Gondii*. A transmissão do protozoário para o feto via hematogênica transplacentária pode ocorrer na infecção aguda, na reativação latente ou na reinfeção durante a gestação. Na gestação o processo inflamatório e a necrose causadas pelo protozoário podem causar lesões cerebrais, coriorretinite e perda auditiva (38).

Para o diagnóstico da toxoplasmose congênita pode ser realizado a reação em cadeia de polimerase (PCR) no líquido amniótico, porém o mais utilizado na prática clínica são as sorologias por serem mais acessíveis na saúde pública e por serem menos inerentes aos riscos de procedimentos invasivos. A ultrassonografia obstétrica pode avaliar sinais dismórficos no feto que sugiram toxoplasmose, mas deverá haver outro método de confirmação associado. Os testes sorológicos de pesquisa de anticorpos imunoglobulinas G e M (IgM e IgG, respectivamente) são os mais utilizados, porém a interpretação dos resultados é um tanto complexa e exige a necessidade de repetição dos exames ao longo da gestação (38).

Na presença de IgG positivo na gestante, a sorologia deve ser repetida em um intervalo de 3 semanas e se houver um aumento de títulos significa que a gestante foi infectada recentemente. O teste de avidéz de IgG pode ser utilizado para estimar o momento que ocorreu a infecção aguda. Um índice de avidéz elevado (maior que 60%) indica que a infecção aguda ocorreu há mais de 3 a 4 meses. Porém índices entre 31 a 59% são inconclusivos e devem ser repetidos ao longo da gestação. O anticorpo IgM pode ser detectado também na primeira ou segunda semana após a infecção aguda e permanecer com títulos elevados por 2 a 3 meses. Desta forma a sorologia positiva para IgM durante a gravidez não necessariamente significa que a infecção foi adquirida na gestação (38).

O diagnóstico sorológico no RN precisa também ser interpretado adequadamente pelo fato de que o anticorpos maternos da classe IgG atravessam a barreira placentária. Títulos destes anticorpos, nos recém nascidos quatro vezes ou mais que os títulos de anticorpos materno podem sugerir infecção congênita. Por sua vez a presença de IgM no RN sugere infecção congênita, uma vez que este anticorpo não ultrapassa a barreira placentária. A pesquisa do anticorpo, via punção de sangue periférico, deverá ocorrer de 2 a 5 dias de vida e mesmo assim a chance de detecção da doença é de 75% dos nascidos com a infecção, mesmo naqueles sintomáticos (38).

Deste modo o Ministério da Saúde recomenda que as crianças sejam acompanhada ao longo de um ano de vida por titulações de anticorpos, principalmente IgG, para saber se a origem é de infecção congênita ou anticorpos maternos que ultrapassaram a barreira placentária (38).

Um estudo de 1980 avaliou as sequelas da toxoplasmose, em crianças acompanhadas do nascimento até os oitos anos de idade, que não realizaram ou realizaram parcialmente o tratamento para a toxoplasmose. Em 26% destas crianças observou-se perda auditiva, de grau leve a moderado, com acometimentos uni ou bilateral (39). Em outro estudo, aonde os neonatos já iniciavam o tratamento (Sulfadiazina e Pirimetamina) ao nascimento, e seguiam em acompanhamentos, não se encontrou nenhum caso de perda auditiva (40).

No Brasil, Andrade e colaboradores, encontraram em 19 crianças com diagnóstico de toxoplasmose congênita, que iniciaram o tratamento ao nascimento, 4 casos de perda auditiva (21%), sendo que em dois casos o tratamento foi incompleto. Os graus de perda auditiva em dois casos eram leve, um caso moderado e um caso profundo. O acometimento da perda eram uni e bilateral (41).

Todos os estudos mencionam a importância do diagnóstico pré-natal o mais precoce possível para o início de tratamento tanto na gestante quanto no RN já ao nascimento (39,40,41).

O CMV é um vírus da família *Herpes Viridae* e a infecção congênita pode ocorrer quando a mãe adquire a infecção primariamente ou quando ocorre uma reativação do vírus anteriormente latente. Também pode haver a transmissão chamada de intraparto quando ocorre exposição à secreção do canal de parto e a

transmissão pós-natal precoce quando o RN se contamina com o leite materno ou recebe transfusão de sangue de doadores soropositivos para o CMV (42).

Apenas 15% das crianças apresentam-se sintomáticas ao nascimento, podendo apresentar alterações hematológicas, hepáticas, hiperbilirrubinemia, microcefalia, calcificações periventriculares e perda auditiva neurosensorial (42). O melhor exame para detectar a presença do CMV congênito é a identificação do DNA viral pelo PCR, colhendo amostra da saliva ou da urina, que são fluídos com mais presença de vírus nos neonatos. O resultado negativo exclui CMV congênito e a presença de DNA após a quarta semana de vida até a décima segunda podem indicar que se trate de uma infecção peri ou pós-natal (42).

Foulon e colaboradores, em um estudo na Bélgica com 14.021 RNs triados encontraram 0,53% de pacientes portadores de CMV congênito. Os autores realizaram follow up de 10 anos e constataram que 22% dos portadores da CMV congênita desenvolveram perda auditiva neurosensorial, 13,3% eram bilaterais e 8,3% unilaterais, de graus que variavam entre leve a profundo. Cinco por cento dessas crianças tiveram progressão da perda, em 16% a perda se mostrou do tipo flutuante e 5% desenvolveram perda auditiva tardia (43). Fowler, 2005, em um estudo de revisão observou perda auditiva neurosensorial em 22 a 65% das crianças portadoras da CMV sintomáticas e 6 a 23% nas que nasceram assintomáticas. As crianças com CMV congênita sintomáticas possuem mais tendência a terem perda auditiva bilateral e menos perda em altas frequências ou flutuantes quando comparada as crianças assintomáticas (44).

Em um estudo que rastreou 12.195 RNs brasileiros para CMV congênita, 121 neonatos apresentaram resultados confirmatórios através da avaliação do DNA viral na saliva. Foi possível a monitorização auditiva em 102 pacientes, com diagnóstico de perda auditiva neurosensorial em 10. Em relação à caracterização da perda auditiva 5 possuíam perda auditiva bilateral e 5 perda auditiva unilateral. Nos casos bilaterais, 4 possuíam perda auditiva profunda e 1 apresentava grau moderado, neste grupo de 5, quatro nasceram com sintomas do CMV, nas perdas unilaterais o grau variou entre moderado e severo e 3 dos casos eram assintomáticos. A autora reforça a importância da triagem do CMV, mesmo em um país como o Brasil, onde se supõe que a população em geral já seja na sua maioria imune, pelo fato do CMV ser

fator de risco para perda auditiva e a infecção ocorrer na reativação ou na reinfecção do vírus na gestação (45).

Um estudo com 97 crianças com CMV congênita em acompanhamento audiológico por 6 anos, encontrou 27 pacientes (11 assintomáticos e 16 sintomáticos) com perda auditiva. Metade dos pacientes sintomáticos para o CMV congênito realizou o tratamento com Gangliociclovir. Esta medicação tem por ação inibir o DNA viral, mas possui efeitos colaterais como, por exemplo, a mielosupressão. O grau de melhora nos limiares auditivos foi superior no grupo de sintomáticos (37,5%) que realizaram uso do antiviral do que nos grupos sintomático sem medicação (12,5%) e no grupo de assintomáticos (9,1%). Por sua vez, a perda progressiva foi também mais verificada nos pacientes sintomáticos sem tratamento (37,5%) e nos pacientes assintomáticos (18,2%), o grupo que teve menos perda auditiva progressiva foi os pacientes sintomáticos para o CMV que fizeram o tratamento com Gangliociclovir (12,5%) (46). A perda auditiva nos pacientes com CMV congênita sintomática é uma das indicações para uso do Gangliociclovir, desde que o paciente tenha idade inferior a 1 mês do diagnóstico (42).

Os autores dos estudos acima apresentados reforçam a importância do acompanhamento audiológico, uma vez que as perdas por CMV congênito possuem a característica de serem progressivas (43,44,46).

O Vírus da Imunodeficiência Humana, o HIV, é um retrovírus que causa a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida- AIDS. A transmissão vertical pode ocorrer via intrauterina, no parto e no período pós-natal pela amamentação. Trinta e cinco por cento ocorre na gestação e 65% peri-parto (47).

As perdas auditivas nas crianças decorrem tanto de doenças oportunistas, medicações ototóxicas ou pela própria infecção do vírus. Palacios, em 2008, encontrou alterações de perda auditiva condutiva, neurosensorial e alterações vestibulares nas crianças infectadas pelo HIV tipo 1 (48).

Um estudo africano, 2013, em 370 crianças com HIV e ou AIDS, encontrou 33% de perda auditiva, sendo 36% condutiva e 64% neurosensorial. Correlacionando a perda auditiva com os graus clínicos da AIDS, o autor descreve que no pior grau da doença, todas as crianças tinham algum tipo de perda auditiva. Quanto ao grau de perda auditiva neurosensorial, o autor encontrou 44% perda leve; 14% moderado e

6% de grau severo. Os autores sugerem a reabilitação o mais precoce possível, cuidado no uso de drogas ototóxicas e tratamento adequado das infecções de vias aéreas superiores, principalmente as otites e suas complicações que podem causar a perda auditiva, principalmente do tipo condutiva (49).

3.3.2. Causa adquirida: intercorrências neonatais

As intercorrências neonatais são consideradas quando ocorrem do momento do parto até 28 dias. O *Joint Committee on Infant Hearing (JCIH)* considera, na mais recente recomendação, em 2007, as intercorrências neonatais de uma maneira mais abrangente: todas as crianças, com ou sem indicadores de risco, admitidos na UTI neonatal por mais de 5 dias, seguidos por circulação extracorpórea, ventilação assistida, antibióticos ototóxicos (gentamicina, tobramicina) e diuréticos de alça (furosemida), hiperbilirrubinemia (que requer transfusão) independentemente do tempo (5). O baixo peso foi retirado como fator de risco único, uma vez que foi verificado que este fator se mostra importante quando acompanhado de outros fatores, como permanência na UTI (50). Os estudos aqui apresentados demonstram que as intercorrências neonatais encontram-se muito associadas.

Um estudo brasileiro, de 2003, com 96 RNs de UTI com baixo peso, menor que 1500 gramas encontrou 6,3% de perda auditiva bilateral, não especificando o tipo. Porém estes pacientes realizaram inicialmente teste e reteste pelas OEA e só naqueles que permaneceram com as alterações auditiva foi realizado o PEATE. Neste estudo houve uma tendência, porém não significativa estatisticamente, da idade gestacional e o apgar de quinto minuto abaixo ou igual a seis estarem associados com a acuidade auditiva alterada. O próprio autor reconhece que é possível ter subestimado os RNs com perda do tipo retrococlear, porém os RNs seguiriam no acompanhamento. Importante mencionar que 57,3% dos RNs deste estudo fizeram uso de aminoglicosídeo e um terço necessitou de ventilação mecânica (51).

Um estudo comparando RNs prematuros que permaneceram na UTI daqueles a termo, mostrou que a prevalência de perda auditiva neurossensorial foi de 0,82% nos termos, enquanto nos prematuros de UTI encontrou-se 3,1% de perda neurossensorial. Esta diferença foi estatisticamente significativa e o risco de um RN prematuro apresentar perda auditiva é de 1,82 vezes mais que o RN a termo. O autor verificou que os fatores correlacionados com a perda auditiva mais frequentes nos

prematturos eram: baixo peso para idade gestacional, ototóxicos e ventilação mecânica. Nos RNs termos os fatores mais relacionados com a perda auditiva eram infecção congênita, antecedente familiar, ototóxicos e baixo peso para idade gestacional (52).

Crianças que permaneceram na UTI, com baixo peso e idade gestacional menor de 34 semanas foram acompanhadas periodicamente com exames audiológicos: PEATE, avaliação audiológica comportamental, audiometria em campo, timpanometria e audiometria infantil (tonal). Neste estudo excluíram as causas: síndromes genéticas e história familiar de perda auditiva, fatores estes não ambientais. Os autores observaram que baixo peso, longa permanência na UTI, ventilação mecânica, transfusão sanguínea, hemorragia interventricular e meningite foram fatores mais associados com perda auditiva. De 146 pacientes com perda auditiva, 52 apresentaram perda auditiva bilateral: 13 de grau moderado, 27 grau severo e 12 de grau profundo. Os autores chamaram atenção para os audiogramas dos pacientes, cuja maioria apresentava audiogramas de padrões descendentes, sugerindo perda auditiva nas frequências mais agudas. Segundo os autores, os aminoglicosídeos e a hiperbilirrubinemia causariam injúrias em regiões específicas coclear, lesando as células ciliadas preferencialmente nas regiões responsáveis pelas altas frequências (53).

Robertson e colaboradores apresentaram um estudo onde acompanharam por 30 anos 1.279 RNs com idade gestacional abaixo de 28 semanas e peso menor de 1250 gramas que permaneceram na UTI. Quarenta pacientes (3,1%) desenvolveram perda auditiva permanente bilateral e o fator de risco observado como o mais associado com a perda auditiva foi a necessidade de oxigênio (54).

Um estudo holandês, verificou quais fatores etiológicos independentes estariam mais associados com a perda auditiva naqueles que permaneceram na UTI e comparou RNs de UTI com perda auditiva com aqueles que também estiveram na UTI e não evoluíram com perda. A porcentagem de pacientes que estiveram na UTI e que tiveram perda auditiva foi de 1,7%, a maioria apresentava perda auditiva neurossensorial de grau severo para profundo. Os fatores associados com a perda auditiva independente de permanência na UTI foi baixo apgar, características dismórficas sugerindo síndrome, sepse, meningite e sangramento e isquemia cerebral (55).

Um estudo com a possibilidade de realização de exames moleculares genéticos para a surdez nos neonatos de UTI e que falharam na triagem auditiva verificou apenas a presença de causas ambientais. Neste mesmo estudo os neonatos a termo apresentaram perda auditiva mais significativa do que os prematuros. A justificativa para tal circunstância é que os RNs a termos quando necessitaram de UTI, precisaram por apresentarem quadros mais graves: anóxia, malformação congênita, síndromes e infecções congênitas. Dos 38 RNs que completaram a pesquisa, 10 pacientes apresentaram perda auditiva: 1 de grau moderado, 4 de grau severo e 5 de grau profundo. Os indicadores mais presentes na história clínica foram hiperbilirrubinemia, anóxia perinatal e ventilação mecânica e permanência na UTI maior que 5 dias (56).

A hiperbilirrubinemia ou icterícia neonatal é a predisposição para produção de bilirrubina (não conjugada) com limitada excreção da mesma. O termo Kernicterus se refere a icterícia severa com manifestações no sistema nervoso central (57). O núcleo do nervo coclear e o colículo inferior são os primeiros a sofrerem injúrias com a toxicidade da bilirrubina, seguido posteriormente do nervo coclear. A cóclea não parece ser afetada diretamente pela hiperbilirrubinemia, mas acredita-se que sua atividade seja prejudicada secundariamente pela falta de atividade do nervo coclear (58).

A hiperbilirrubinemia e ou a anóxia neonatal podem estar associadas ao espectro da neuropatia auditiva, que é uma desordem auditiva caracterizada pela função anormal do nervo coclear (representado no PEATE por ondas alteradas ou ausentes), com função coclear preservada (presença de sinais de microfonismo no PEATE ou OEA presentes). O espectro da neuropatia também está associado com alterações genéticas (59).

Oysu, 2002, verificou que de 30 crianças que apresentavam apenas como único fator de risco a hiperbilirrubinemia severa (24.4 ± 8.8 mg/dL), todos tinham algum comprometimento auditivo: 20 casos foram considerados de grau profundo, 6 casos apresentavam grau severo e 4 de grau leve a moderado; 28 eram bilaterais e 2 unilaterais. Como foi realizado OEA e PEATE, o autor encontrou em 4 casos considerados profundos a presença de OEA “robustas” e chamou atenção para o fato de que se houvesse apenas feito como exame diagnóstico as OEA, esses casos não seriam diagnosticados (60).

Um estudo, de 1998, comparando perda auditiva em grupos de fatores de risco diferentes: hiperbilirrubinemia (maior que 20 mg/dL), prematuros com baixo peso (menores de 34 semanas), meningite neonatal bacteriana e neonatos com septicemia demonstrou que o maior número de casos de perda auditiva foi encontrado nos pacientes com hiperbilirrubinemia com 8 casos, seguidos de meningite e septicemia, cada um com 6 casos e em 3 casos o fator de risco presente era a prematuridade. A incidência de perda auditiva nos casos acometidos pela hiperbilirrubinemia foi de 61,5% (8/13), sendo 50% grau severo e 50% moderado (61).

Wong e colaboradores, em 2006, em um estudo prospectivo, de 1995 a 2000, acompanharam o desenvolvimento da audição pelo PEATE em grupos de pacientes com graus diferentes de hiperbilirrubinemia: grau moderado (bilirrubina sérica até 20mg/dl); severo (até 25mg/dl) e superbilirrubinemia (acima de 26mg/dl). Naqueles acima de 15mg/dl o protocolo do serviço era fototerapia e acima de 20 mg/dl o tratamento indicado era exsanguíneo transfusão. Inicialmente encontrou-se alteração no PEATE em 10% dos pacientes classificados com grau moderado de hiperbilirrubinemia ;7,9% no grau severo da doença e 16,7% no grau considerado superbilirrubinemia. Porém não havia diferença estatística significativa entre os grupos. Ao longo de 2 anos, apenas 2% mantiveram-se com o PEATE alterado: 2 pacientes do grupo superbilirrubinemia continuaram com os limiares acima de 50 dB. Os autores concluíram que a taxa de hiperbilirrubinemia pode ser transitória no tronco cerebral, desde que o diagnóstico e o tratamento sejam precoces (62).

3.3.3. Malformações de Orelha Interna

Aproximadamente 20% dos pacientes com perda auditiva congênita apresentam malformação na Tomografia Computadorizada (TC) de ossos temporais (63).

Chen, em um estudo que avaliou a utilidade do exame de TC para as malformações de orelha interna em portadores de perda auditiva encontrou 26% de alterações, sendo as mais frequentes: aqueduto vestibular alargado, displasia vestibulococleares e anomalias do conduto auditivo interno (64). Utilizando também a técnica da TC em 35 pacientes com perda auditiva unilateral, Bamio e colaboradores encontraram 31,4% de malformações de orelha interna, sendo 73% de grau profundo. Neste estudo 5 pacientes evoluíram com perda auditiva progressiva sendo que 4 eram

portadores de alterações nos exames de imagem. Deste modo, os autores concluíram que a presença de perda auditiva progressiva pode ser preditor de TC com anormalidades (65).

A Síndrome do Aqueduto Vestibular Alargado (SAVA) é a malformação de osso temporal mais comum, caracterizada por perda auditiva progressiva que pode ter sintomas vestibulares associados. A fisiopatologia é o alargamento ósseo as costas do alargamento do ducto e do saco endolinfático, o que ocasionaria uma alteração na homeostase da circulação endolinfática, com consequente dano ao neuroepitélio coclear. A SAVA pode estar associada com outras malformações de orelha interna. O aqueduto vestibular é considerado normal quando não ultrapassa o diâmetro do canal semicircular adjacente ou quando inferior a 1,5 mm na avaliação tomográfica (66,67).

Madden e colaboradores estudaram a SAVA na população pediátrica através de resultados tomográficos e audiológicos. Encontram nas crianças com perda auditiva, 13% de alterações da SAVA. No acompanhamento de 34 meses, 51% dos pacientes mantiveram quadro audiológico estável, 28% apresentaram flutuação nos limiares auditivo e 21% evoluíram com piora audiométrica. Os autores não encontraram correlação entre as medidas do alargamento do ducto endolinfático e o grau de severidade da perda auditiva (67).

O aqueduto vestibular alargado pode fazer parte da Síndrome de Pendred (SP) caracterizada por disfunção tiroideana e perda auditiva. A SP está associada com a mutação SLC26A4 e é a segunda mutação, segundo o autor, mais verificada em caucasianos após a mutação no gene *GJB2* (68).

As anormalidades de orelha interna encontradas nos exames radiológicos fornecem informações para o diagnóstico, para orientações, prognóstico e até aconselhamento genético (65,69).

3.3.4. Causa genética: perda auditiva de origem não síndrômica

A perda auditiva não síndrômica é responsável por 80% dos casos de surdez genética, sendo em 75 a 80% dos casos de origem recessiva, 20% autossômica dominante, 1 a 5% herança ligada ao X e 1% mitocondrial (11, 70).

Gene *GJB2* e as principais mutações neste gene

O gene *GJB2*, está localizado no braço longo do cromossomo 13 (13q11-q12), no *locus* DFNB1, ou seja, gene de padrão de transmissão recessiva, porém na literatura também é descrito como gene de padrão dominante no *locus* DFNA3. Porém poucas manifestações da forma dominante parecem ser consequência de mutação da Conexina 26 (Cx26) (14).

Os produtos formados por este gene são as conexinas, proteínas que fazem parte das junções intercelulares (gap junction) e que tem como função garantir a homeostase iônica da endolinfa, essencial para a audição normal. As conexinas são proteínas formadoras de canais iônicos que constituem o maior sistema intercelular de comunicação, importante para troca de metabólicos, segundo mensageiros e eletrólitos. A topologia da Cx26 consiste em 4 domínios transmembranas e duas alças extracelular com término citoplasmático; 6 subunidades de Cx26 formam um conexon, dois conexons se alinham e formam um canal intercelular completo (Figura 6) (71,72).

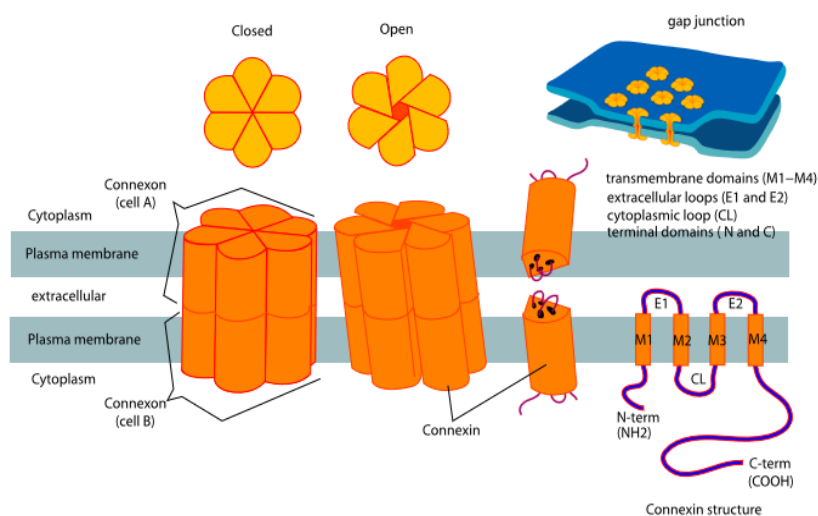


Figura 6- Ilustração da estrutura da Conexina (retirado do site: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Connexon_and_connexin_structure.svg)

Na orelha interna a conexina é expressa na estria vascular, na membrana basilar, no limbo e na proeminência espiral da cóclea humana. A perda da Cx26 no complexo de canais rompe a regulação de potássio das sinapses na base das células ciliadas através das células sustentadoras e fibroblastos, o potássio volta a ficar em alta concentração na endolinfa do ducto coclear, resultando na intoxicação local do Órgão de Corti pelo potássio, impedindo a deflagração dos potenciais de ação para o mecanismo de transdução, levando a perda auditiva (71).

Mutações no *GJB2* seriam responsáveis por 50% das perdas auditivas recessivas não sindrômicas na população europeia. Contudo as mutações mesmo sendo do mesmo gene, diferem em relação as populações afetadas: nos caucasianos a mais comum é a mutação c.35delG, nos judeus a c.167delT, nas populações indianas e paquistanesa c.W24X e na população japonesa c.235delC (73,74).

A mutação c.35delG é comum nas populações europeias, principalmente nas de origem mediterrânea, sendo responsável por 85% dos alelos recessivos que causam perda auditiva na população europeia mediterrânea (75). Também é a mutação mais verificada dentro das mutações da conexina em famílias do Reino Unido, França, Itália, Espanha, Tunísia, Líbano, Austrália e Nova Zelândia (76).

A mutação c.35delG é causada por deleção de uma guanina de uma série de seis guaninas que se encontram da posição 30 a 35 do gene. Esta mutação é do tipo frameshift, uma deleção que altera o quadro de leitura dos aminoácidos. Há formação de um stop códon na posição do códon 13 e como consequência tem-se a formação de um polipeptídeo de 12 aminoácido ao invés de 226 aminoácidos (77).

Em relação ao padrão de perda auditiva causada por essa mutação, Denoyelle, 1998, encontrou no seu estudo perda auditiva com acometimento pré-lingual, porém de graus que variavam de leve a profundo, sempre com acometimento bilateral. A perda auditiva pela mutação c.35delG pode afetar as altas frequências ou afetar todas as frequências na mesma extensão (14). Um estudo com a população italiana, encontrou 66,6% de mutação 35delG, sendo que nos casos de homozigose os pacientes apresentaram perdas que variavam entre grau moderado a profundo (78). Um estudo na Turquia, 2006, com 66 pacientes com mutações no gene *GJB2*, 44 eram homozigotos para mutação c.35delG, destes 88,6% apresentavam perda severa ou profunda bilateral simétrica (79).

Identificada por Denoyelle 1999 e Green, 1999 a mutação IVS1+1G>A ocorre na região não codificante do gene *GJB2*, no íntron. Nesta mutação há troca da guanina para a adenina, no sítio de splicing (80,81). Esta mutação perturba o processo de splicing (processo de remoção dos íntrons que ocorre depois da transcrição do RNA), deste modo não há função de mensagem do RNA (82).

Um estudo analisou os genótipos e fenótipos das mutações *GJB2* e concluiu que os genótipos com heterozigose complexa, incluindo a mutação IVS1+1G>A apresentam como fenótipo perda auditiva de graus menos severo do que a mutação 35delG em homozigose (83). Shubina-Oleinik, em 2014, encontrou a mutação IVS1+ 1G>A como a terceira mutação mais frequente na população bielorrussa, sendo que o padrão audiológico dos pacientes com esta mutação apresentou em sua maioria perda de grau severo e profundo (84).

Gene *GJB6*

O gene *GJB6* também está localizado no *locus* DFNB1 (assim como o gene *GJB2*) no cromossomo 13q11-q12 e é responsável por codificar a Conexina 30 (Cx30). O gene *GJB2* assim como o *GJB6* são expressos na mesma região da cóclea e os seus produtos, Cx26 e Cx30 são muito similares quanto à função (85).

Em 2001, Lerer, em um estudo com famílias de origem judias Ashkenazi, descreveu a presença de uma larga deleção da região telomérica em direção ao gene *GJB2*, mas que não afetaria o mesmo, provavelmente se tratando da del(*GJB6*-D13S1830) (86). Del Castillo e colaboradores descrevem em 2002 a deleção del(*GJB6*- D13S1830) e em 2005 a del(*GJB6*-D13S1854) (87,88). Segundo o próprio autor esta alteração seria segunda mais frequente na população espanhola, após a mutação c.35delG (87).

Na França, 2005, um estudo avaliou o genótipos destas mutações e as características audiológicas. A mutações mais frequentes foram a 35delG seguida pela deleção del(*GJB6*- D13S1830). Neste estudo não houve diferença estatística no grau de severidade das perdas auditiva entre os portadores homozigotos 35delG e os heterozigotos compostos 35delG/ del(*GJB6*- D13S1830) (89). Em 2014 um estudo para determinar as prevalências das mutações *GJB2/GJB6* em 140 portadores de perda auditiva bilateral pré-lingual no México encontrou uma baixa frequência tanto de homozigotos c.35delG, assim como de heterozigotos se comparados com a

população caucasiana. Um caso da mutação 35delG/del(GJB6- D13S1830) foi encontrado e tratava-se de perda auditiva de grau profundo (90).

Inicialmente os autores sugeriam como possíveis alternativas para explicar a perda auditiva em indivíduos duplamente heterozigotos os mecanismos de efeito de dosagem ou mecanismo regulatório da expressão do gene *GJB2*. O primeiro se trata da interação dos genes como um padrão complexo de herança digênica. O *GJB2* e o *GJB6* possuem funções sobrepostas e um poderia compensar a função do outro, interagindo entre si. O segundo mecanismo seria a existência de uma ou mais região regulatória da expressão do gene *GJB2* que estaria dentro da sequência que foi deletada, deste modo o gene *GJB2* estaria inativo e a explicação para a perda auditiva seria esta e não a deleção do segmento do *GJB6* (86,87).

Rodrigues-Paris e colaboradores, em um estudo de 2009, também verificaram que o provável mecanismo seria a deleção de áreas regulatórias da expressão do gene *GJB2*. Estes mesmos autores em 2011 investigaram a deleção del(GJB6-D13S1854), uma deleção menor e menos comum e observaram que a expressão da *GJB2* permanece com atividade mínima. O motivo seria o fato de uma deleção menor, manter preservado os elementos regulatórios ou os lócus de controle de expressão (91,92).

Gene Mitocondrial

A perda auditiva de herança mitocondrial representa 1% das perdas auditivas não sindrômicas (11), porém sua disfunção também está implicada em algumas síndromes que cursam com perda auditiva (93). Perda auditiva sindrômica causada por mutação nos genes mitocondriais estão associados com acidoses lácticas, encefalopatias, miopatias, diabetes mellitus, oftalmoplegias, ataxia e atrofia do nervo óptico. A herança mitocondrial é de origem materna (94).

O DNA mitocondrial humano tem 16.569 pares de nucleotídeos e caracteriza-se por ser uma molécula circular localizada no citoplasma da mitocôndria. Aproximadamente, há centenas de mitocôndrias em cada célula do corpo humano. Cada mitocôndria contém de 2 a 10 cromossomos mitocondrial e o DNA mitocondrial contém 37 genes (95).

As funções da mitocôndria na orelha interna, especificamente nas células ciliadas são de proporcionar ATP para fosforilação oxidativa, modulação da concentração de cálcio intracelular e controle da apoptose das células. Alta densidade mitocondrial, que é relacionada com grande atividade metabólica, é observada em grande proporção, na espira basal da cóclea e na região infra nuclear das células ciliadas. Locais estes importantes na transformação do impulso sonoro em impulso elétrico para o nervo coclear. Mas para que ocorra apenas injúria nas mitocôndrias (caracterizando-se como perda auditiva não sindrômica) da orelha interna acredita-se que as mutações sejam tecido específica ou que ocorra expressão fenotípica, até em decorrência de fatores ambientais como por exemplo aminoglicosídeos (93).

A primeira mutação mitocondrial descrita relacionada com perda auditiva não sindrômica foi a mutação A1555G localizada no gene mitocondrial, *MTRNR1*(96). Diversas publicações com outras populações também investigaram a mutação e sua relação com o uso do aminoglicosídeo. Nos asiáticos esta mutação parece ser mais frequente. Usami, 2000, em um estudo com a população japonesa encontrou 33% de perda auditiva induzida por aminoglicosídeo e 3% de pacientes com esta mutação, porém com perda auditiva esporádica (97). Na China, Li e colaboradores 2005, encontraram 13% de perda auditiva induzida por aminoglicosídeo enquanto 2,9% apresentavam de forma esporádica a perda auditiva (98). Zhang, 2007 também na China observou que a frequência para aqueles com a mutação induzida pelo antibiótico era de 10,9% em relação a 5,7% de casos de perda auditiva eventuais (99). Na Espanha encontrou-se uma frequência desta mutação associada com perda auditiva em 20%, sem uso de antibiótico (100).

A mutação consiste na troca do nucleotídeo adenina pela guanina no locus 1555 do gene 12S RNA ribossômico. Esta mutação faz com que este gene do RNA ribossômico se assemelhe ao RNA ribossômico da bactéria. O aminoglicosídeo tem como mecanismo de ação a interferência na síntese de proteínas das bactérias. Desta maneira o aminoglicosídeo causa codificação errada ou prematura no sítio do RNA mitocondrial. Neste caso o antibiótico seria um fator de interação com a mutação, causando a perda auditiva. Para aqueles que possuem a mutação e a perda auditiva mas nunca foram expostos ao aminoglicosídeo a explicação provavelmente se deve ao comprometimento de alguma das funções das mitocôndrias. Estas funções são

reguladas pelos genes nucleares e mitocondriais, são elas: produção de energia pela fosforilação oxidativa, regulação do estresse oxidativo e apoptose (101).

As características audiológicas, segundo a literatura da perda auditiva pela mutação A1555G seriam: perda auditiva bilateral, simétrica, com acometimento preferencial das altas frequências, com variação de graus até mesmo dentro da mesma família, associada com zumbido, usualmente apresenta graus mais severos nos expostos ao uso de antibiótico (102-104).

Uma meta análise realizada para verificar a prevalência global das mutações mitocondriais, com intuito de realizar triagem neonatal para estas mutações antes da terapia com aminoglicosídeos demonstrou que não é recomendada para a população geral, porém a triagem pode ser justificada para as populações de alto risco: chinesa e espanhola (105).

A variante A827G foi encontrada em uma família chinesa com alguns afetados, na linhagem materna. De 23 portadores da A827G, 10 desenvolveram perda auditiva, o que sugere que talvez haja uma penetrância incompleta e que a mutação A827G, por si só não seria patológica. Os autores mencionam as hipóteses de que a essa variante para desencadear perda auditiva necessitaria de fatores moduladores como aminoglicosídeos, diferentes haplótipos mitocondrial ou genes modificadores de origem nuclear. Justamente por ser encontrada em controles com audição normal, esta alteração tem sido considerada polimórfica (104, 106, 107).

3.3.5. Causa genética: perda auditiva de origem não sindrômica no Brasil

A identificação das primeiras mutações no gene *GJB2* pela comunidade científica internacional ocorreu no final da década de 90 (13). As primeiras publicações brasileiras sobre os genes responsáveis pela perda auditiva não sindrômica iniciaram em 2000: Sartorato e colaboradores em um estudo com 620 neonatos, relatou a frequência de portador da mutação m.35delG em 0,97% ou seja 1 em cada 103 neonatos (108).

Oliveira e colaboradores, em 2002, investigou a frequência da mutações do gene *GJB2* em indivíduos de dois grupos: portadores de perda auditiva congênita com história familiar e portadores de perda auditiva congênita esporádica, sendo os resultados, 22% e 11,5% respectivamente. De onze paciente com mutações no gene,

seis apresentavam a c.35delG em homozigose, mostrando a necessidade da investigação através dos exames moleculares, principalmente para a mutação c.35delG nos portadores de perda auditiva congênita (109).

Em 2003, o Brasil participa de um estudo multicêntrico na investigação da mutação no *GJB2* associado a deleção *GJB6*, del(*GJB6*-D13S1830) e apresenta a frequência desta mutação de 22,2%, uma frequência intermediária, uma vez que Espanha, França, Israel e Reino Unido foram os países com maiores ocorrência desta mutação (110). Em 2005 é realizado um novo consórcio para investigação da del(*GJB6*-D13S1854), o Brasil é o terceiro país do estudo em frequência, com 6,3% desta mutação, depois da Espanha (25,5%) e o Reino Unido (22,2%) que apresentaram maiores prevalência da del(*GJB6*-D13S1854) (88).

Na tentativa de investigar não só a presença da mutação c.35delG mas também das mutações mitocondriais A1555G e A7445G, um estudo com 75 pacientes portadores de perda auditiva mas sem causa definida encontrou 2 portadores da c.35delG em homozigose, 2 portadores em heterozigose, 1 mutação nova (W172X/W172X) e uma mutação mitocondrial, A7445G. Com exceção desta última paciente portadora de perda auditiva unilateral profunda, todos os demais eram portadores de perda auditiva bilateral de grau moderado a profundo (111).

Piato, 2004, investigou a prevalência da mutação no gene *GJB2* e a deleção no *GJB6*, a del(*GJB6*-D13S1830). Essa deleção foi inicialmente descrita em 2002, por Castillo (87). Trinta e três portadores de perda auditiva não sindrômica foram investigados para as mutações, doze pacientes apresentaram mutações no gene *GJB2*, sendo cinco portadores da mutação homozigose c.35delG e 2 pacientes eram heterozigotos compostos: 35delG/V37I e 35delG/ del(*GJB6*-D13S1830) (112).

Um estudo com 223 recém nascidos em São José do Rio Preto, cidade do Estado de São Paulo, em 2005, encontrou 2,24% de portadores da mutação c.35delG (113). Em 2010 um outro estudo, na cidade de Jundiaí, pertencente ao Estado de São Paulo, com 8.974 neonatos da TANU verificou entre os 17 portadores de perda auditiva, 4 pacientes homozigotos para c.35delG (114). Um estudo de 2011, na cidade de Campinas com 38 recém-nascidos que permaneceram na UTI e que realizaram exame molecular para os principais teste da surdez, diagnosticou 8 portadores de perda auditiva, nenhum apresentou alteração molecular (56).

Pacientes brasileiros implantados também foram estudados com exames moleculares para perda auditiva. Em um estudo com pacientes implantados ou candidatos ao implante coclear, portadores de perda auditiva bilateral de grau severo a profundo, 12% eram homozigotos para c.35delG e 19% heterozigotos. O autor reforça a importância do rastreamento de mutações no gene da conexina nos pacientes supostamente com perda auditiva de origem idiopática (115). Outro estudo com 49 pacientes que se submeteram ao implante coclear, 19 pacientes apresentaram mutações *GJB2* e *GJB6*; 8 eram portadores da mutação c.35delG em homozigose e 1 paciente era homozigoto del(*GJB6-D13S1830*) (116). Motta, 2012, também estudou a prevalência da mutação c.35delG na população com perda auditiva de causa indeterminada e que foi submetida ao implante sendo a ocorrência da mutação de 11% (117).

Também estudou-se a frequência da mutação c.35delG em diversas regiões do Brasil, uma vez que o país tem várias origens étnicas na sua composição populacional. O resultado encontrado foi que esta mutação estava presente em todas as regiões sem diferenças significativas (118). Considerando estudos em regiões específicas do Brasil, Cordeiro Silva encontrou no Espírito Santo 3,9% de homozigotos c.35delG, 6,5% de portadores da mutação e 1,3% de heterozigoto composto 35delG/del(*GJB6-D13S1830*); Castro em estudo na população da região Amazônica verificou 1,3% de homozigotos m.35delG, 7,8% de heterozigotos (119,120).

As mutações mitocondriais também são estudadas na população brasileira: Maniglia e colaboradores, 2008, realizaram um estudo para rastreio da mutação mitocondrial A1555G em pacientes com perda auditiva de origem idiopática e em recém-nascidos normo ouvintes, usados como controle; em nenhum dos grupos a mutação foi encontrada. O autor relata que a prevalência desta mutação não é comum nas Américas (121). Outro autor no mesmo ano, descreve um relato desta mutação em uma família onde 9 indivíduos realizaram exames otorrinolaringológicos, audiológicos e genéticos. Nove possuíam a mutação e oito tinham perda auditiva neurosensorial. As características mais comumente observada em relação ao padrão audiológico foi: perda auditiva bilateral, simétrica mas de vários graus de perda com uma tendência maior para as perdas auditivas nas frequências agudas (122). Nos dois estudos citados os autores mencionam a preocupação em determinar a real

frequência desta mutação na população brasileira, principalmente pela relação desta com os antibióticos aminoglicosídeos (121,122).

Os estudos aqui apresentados verificam e confirmam a importância do rastreamento das mutações no *GJB2* e *GJB6* na população brasileira. Batissoco e colaboradores encontraram em 300 pacientes com história de perda auditiva, excluindo apenas os portadores de perda auditiva síndrômica, 7,5% de portadores da c.35delG em homozigose, 1,7% em heterozigose e 1% de heterozigoto composto para c.35delG/ del(D13S1830). Quanto ao grau de perda, os homozigotos para a mutação c.35delG apresentaram grau de perda entre moderado a profundo, com mais da metade dos casos com grau profundo. Os três casos c.35delG/ del(D13S1830) apresentavam perda auditiva de grau profundo (123). Em 2014, Esteves e colaboradores analisaram a presença de mutação no gene *GJB6* nos pacientes com heterozigose no gene *GJB2*. Seus resultados foram 6,93 % de heterozigotos 35delG e 1% de heterozigoto compostos 35delG/delGJB6 (D13S1830). Os achados audiológicos foram de que os heterozigotos para a *GJB2* possuíam graus variados com manifestações pré e pós lingual enquanto o heterozigoto composto apresentou perda de grau profundo (124).

Estudos genético com outros genes relacionados a surdez também foram realizados no Brasil: de Moraes e colaboradores, 2013, realizaram análise molecular de 20 exóons do gene *SLC26A4* (gene relacionado com Aqueduto Vestibular Alargado e Síndrome de Pendred) em 23 indivíduos previamente investigado para mutações *GJB2*, *GJB6* e mitocondrial A1555G. Este pacientes tinham perda auditiva severa para profunda e apresentavam o aqueduto vestibular alargado (anteriormente diagnosticado por exame de imagem). Apresentaram mutação em 1 ou 2 alelos 3,9% dos pacientes, demonstrando que essa mutação possui uma alta frequência na população brasileira (125).

A mutação mitocondrial A827G é citada com grande frequência nos estudos brasileiros. Em um estudo com 17 deficientes auditivos, esta mutação foi encontrada em 3 pacientes, porém em 2 pacientes havia outras causas ambientais que também poderiam justificar a perda auditiva (114). Um estudo de avaliação de possíveis mutações mitocondriais relacionadas à perda auditiva induzida por ruído mostrou que a mutação também foi encontrada em indivíduos normoouvintes (126).

Os autores acreditam que se trate de um polimorfismo com alta ocorrência na população do Brasil.

3.3.6.Causa genética: outros genes envolvidos na perda auditiva não sindrômica

Gene *SLC26A4*

A mutação no gene *SLC26A4* é a segunda causa mais frequente de perda auditiva não sindrômica, após as mutações no *GJB2*. O *SLC26A4* é um gene localizado no braço longo do cromossomo 7q31.1, no *locus* DFNB4, que codifica a proteína pendrina (68).

Esta proteína também é responsável pela homeostase coclear, uma vez que atua no transporte de cloretos, iodetos, bicarbonatos e formiatos. É expressa nos tecidos da orelha interna, rim e tireoide. A falta da ação da Pendrina, na orelha interna leva a acidificação da endolinfa e inibe a atividade dos canais de cálcio, resultando no aumento da concentração de cálcio na endolinfa, levando a ausência de potencial endolinfático, uma vez que este meio precisa estar em equilíbrio de íons para deflagar um potencial de ação (68,127).

Quando esta mutação causa perda auditiva associada a tiroideopatia (bócio) que geralmente aparece na segunda década e malformação de orelha interna como Aqueduto Vestibular Alargado e/ou Mondini é chamado de Síndrome de Pendred. Geralmente a característica da perda auditiva por esta mutação é bilateral, frequentemente severa para profunda, pré-lingual ou pós-lingual precoce e de variada evolução (68).

Gene *OTOF*

Gene localizado no cromossomo 2p23-p22, no *locus* DFNB9, o gene *OTOF* codifica a otoferlina (128). Na cóclea adulta, a otoferlina só é expressa nas células ciliadas internas aonde estão localizadas as sinapses aferentes, sugerindo que esta molécula realmente tenha o papel no controle de neurotransmissores (129).

A mutação *OTOF* causa perda auditiva pré-lingual profunda, com características de neuropatia auditiva, ou seja, inicialmente com presença de OEA e ausência de ondas no PEATE (130).

Um estudo com 37 pacientes com a mutação *OTOF* observou que os afetados são fenotipicamente homogêneos: possuem perda auditiva profunda, de início precoce e não possuem nenhuma anormalidade de orelha interna aos exames de imagem. Os autores sugerem investigar o gene *OTOF* quando há perda auditiva profunda com características de neuropatia. O autor chama atenção que a realização do exame OEA, muitas vezes o único exame realizado nos programas de TANU pode não diagnosticar a neuropatia (130).

Gene *MYO15A*

Este gene faz parte da família dos genes da miosina. As miosinas possuem muitas funções: transporte intracelular de organelas, fagocitose, função secretória, contração muscular e de movimento celular. O gene *MYO15A* está localizado no cromossomo 17p11.2, locus DFNB3. As miosinas hidrolisam a Adenosina Trifosfato (ATP) para gerar energia para mover se ao longo dos filamentos de actina (131,132). O padrão audiológico dos pacientes com essa mutação costuma ser severa para profunda, ou perda em altas frequências (132).

3.3.7. Causa genética: perda auditiva sindrômica

Representa de 15 a 30% das perdas hereditárias (11). Mais de 400 síndromes relacionadas a perda auditiva já foram descritas. Na perda auditiva sindrômica os padrões hereditários podem ser classificados como síndrome genéticas de anomalias cromossômicas, síndrome de herança monogênica ou síndrome multifatorial, onde o fenótipo é resultado de uma combinação de fatores genéticos e ambientais (133). A seguir estão descritas as principais síndromes que cursam com perda auditiva associada.

Síndrome de Pendred

Os genes responsáveis são *SLC26A4* e *FOXXII*, a síndrome cursa com perda auditiva, bócio que geralmente inicia na puberdade e alterações no exame radiológico com aqueduto vestibular alargado ou Mondini. Geralmente a característica da perda auditiva por esta mutação é bilateral, frequentemente severa para profunda, pré-lingual ou pós-lingual precoce de variada evolução (68,133).

Síndrome de Waanderburg (SW)

Caracterizada por epicanto ocular, anormalidades pigmentares no cabelo, na íris e na pele e que cursam com perda auditiva. A síndrome é dividida em subtipos, tipo I é quando ocorre epicanto ocular associado a síndrome, no tipo II não há este tipo de apresentação, tipo III e o tipo I associado com anomalias de membros superiores e no tipo IV é o tipo II acrescido da doença de Hirschsprung. Vários genes em diferentes cromossomos estão associados a esta síndrome (133).

Um estudo de revisão com 417 pacientes correlacionou a perda auditiva nos diferentes subtipos da Síndrome de Waanderburg; a prevalência foi de SW tipo 1:52,3%; SW tipo 2: 91,6%; SW tipo 3: 57,1% e SW tipo 4:83,5%. Em relação as mutações, observou-se que: *SOX10* (96,5%), *MITF* (89,6%) e *SNAI2* (100%) possuíam mais pacientes com perda auditiva associada. Em 71% a perda auditiva foi neurossensorial e bilateral. Os autores sugerem a importância do diagnóstico molecular na possibilidade de orientar os pacientes sobre os riscos de perda auditiva (134).

Síndrome de Usher

Caracterizada por perda auditiva e retinose pigmentar. Nesta síndrome, vários genes estão envolvidos no mesmo subtipo. O tipo I da síndrome de Usher é a mais severa, os pacientes já nascem com perda auditiva congênita de grau profundo, com início pré- púbere da retinose pigmentar e com sintomas vestibulares. No tipo II é caracterizado por perda auditiva de grau moderado para severo e a retinose pigmentar começa na primeira ou segunda década. No tipo III, que é a menos comum, com prevalência de 2 a 4%, os pacientes podem ter perda auditiva progressiva e os sintomas em relação a vertigem e a retinose pigmentar podem ser variáveis (133,135).

Síndrome de Alport

É caracterizada pela associação disfunção renal, perda auditiva e anormalidades oculares. Inicialmente o sinal clínico é a hematuria, mas pode progredir para falência renal. A perda auditiva é progressiva, simétrica e de intensidade variável. Os genes envolvidos nessa síndrome são responsáveis pelo colágeno, em especial o tipo IV, que é o principal constituinte da membrana basal. As cadeias α_3 , α_4 e α_5

expressam-se nas membranas basais seletivamente do rim, cóclea e nos olhos. Mutações nestes genes produzem defeitos nessas cadeias (133,136).

Síndrome Oto-Branquio- Renal

Síndrome autossômica dominante com anomalias branquiais, otológicas e malformação renal. Está presente em 2% das crianças com perda auditiva profunda. As manifestações mais frequentes são: perda auditiva, anomalias renais, deformidades no pavilhão auditivo e estenose de conduto auditivo externo (133).

Síndrome Jervell- Lange- Nielsen

Caracterizada por síncope, causadas por alterações cardíacas (intervalo QT longo no eletrocardiograma) e perda auditiva neurossensorial profunda. Ocorre em 0,25% das perdas auditivas profundas bilaterais (133).

Síndrome de Treacher Collins

O gene envolvido é o *TCOF1* que codifica a proteína chamada de treacle, e acredita-se que atue no transporte de outras proteínas do citoplasma para o núcleo. A mutação provavelmente ocorre pela introdução de um stop códon, com terminação prematura do produto formado. A expressão fenotípica resulta em malformações congênitas envolvendo o primeiro e segundo arco branquial. As manifestações mais comuns são: hipoplasia da região malar, hipoplasia de mandíbula, coloboma de pálpebra inferior, malformação dos pavilhões auriculares, atresia do conduto auditivo externo e surdez de condução (133,137).

Síndrome CHARGE

Caracterizada por coloboma ocular, defeitos cardíacos, atresia de coanas, retardo de crescimento e/ou desenvolvimento, anomalias genitais e/ou urinárias e anormalidades das orelhas e surdez, além de outros defeitos. Em dois terços dos casos diagnosticados como CHARGE, em dois terços são verificados mutação no gene *CHD7* no cromossomo 8. O paciente pode apresentar perda auditiva condutiva, mista ou neurossensorial. Um pequeno número de casos evolui para perda auditiva profunda (138).

Em um estudo com implantes cocleares nos pacientes com esta síndrome e perda auditiva profunda, verificou que o procedimento é muito dificultoso uma vez

que a anatomia de orelha média é anormal e o nervo coclear muitas vezes é hipoplásico. Os autores concluíram que a TANU é mais ainda importante nestes casos, para intervenção precoce, e mesmo com dificuldade para o procedimento em virtude da anatomia anormal, os autores orientam implante coclear. Também orientam nestes casos o trabalho de aprendizagem de linguagem de sinais e oral (138).

3.4. Espectro da Neuropatia Auditiva

Inicialmente chamada de Neuropatia Auditiva, descrita em 1996, foi caracterizada em pacientes que apresentavam OEA e ausência de respostas no exame de PEATE (139).

Os autores perceberam alguns padrões associados a neuropatia como presença de microfonismo coclear, perda auditiva permanente ou flutuante, exames radiológicos sem anormalidades, ausência de reflexo estapediano, audiograma com incompatibilidade entre os limiares tonais e o índice de reconhecimento de fala (59).

A partir de 2008, o termo neuropatia auditiva passou para espectro da neuropatia auditiva, uma vez que há várias manifestações clínicas da neuropatia (140).

Kaga, 2015, descreve uma classificação para os tipos clínicos da neuropatia, Tipo I: desenvolvimento auditivo é normal, com dois subtipos, IA ao nascimento OEA estão presentes e PEATE sem respostas, após um tempo as OEA se mantêm e aparece ondas no PEATE. No tipo IB ao nascimento as OEA estão presentes e PEATE tem apenas onda I e III, após um tempo, no acompanhamento, as OEA se mantêm e aparece todas ondas no PEATE.

O tipo II são neuropatias que vão progredir para a perda auditiva: as OEA somem e mantêm se a ausência no PEATE. O tipo III é a verdadeira neuropatia auditiva, as OEA se mantêm presentes e o PEATE é sem resposta. No tipo III A mesmo com estas alterações, o paciente tem comportamento de deficiente auditivo e no tipo III B o comportamento é de ouvinte. O tipo III é o que ocorre com menos frequência entre os três tipos. Os melhores tipos para o implante coclear, segundo o autor, seria os tipos II e III A (141).

A causa exata na neuropatia não está esclarecida, mas já existem hipóteses para sua ocorrência. São citados desordens de origem pré ou pós-sináptica

entre as células ciliadas e o nervo coclear; dessincronização do nervo auditivo por desmielinização ou por atrofia axonal. Algumas mutações em genes também já foram identificados no espectro da neuropatia auditiva como o *OTOF* e o *OPA1*, mas existe a possibilidade de haver mais mutações relacionadas com a neuropatia em outros genes (59,131).

Alguns fatores de risco para a perda auditiva como a hiperbilirrubinemia e anóxia neonatal podem causar neuropatia auditiva (59,141).

Bielecki e colaboradores, em 2012, por meio de um estudo com neonatos da triagem auditiva em um período de 9 anos, verificaram que de 352 neonatos, 5,1% (n=18) possuíam espectro de neuropatia auditiva, sendo que em 78% destes tinham história de complicações neonatais e os outros 22% com espectro de neuropatia não tinham nenhum fator de risco. Os autores chamam atenção para o fato de que a neuropatia não é uma condição rara e que para o melhor screening da neuropatia é importante considerar as OEA, reflexo do estapédio e o PEATE (142).

3.5. Fatores de riscos história familiar e consanguinidade

O fator de risco história familiar de perda auditiva é controverso, no JCIH ele é mencionado (5). Por outro lado, mencionam que este fator também está presente em pacientes sem perda auditiva como no estudo de Cone- Welsson, onde encontrou 26,7% de história familiar em neonatos com deficiência auditiva, mas também encontrou 6,8% deste fator em neonatos ouvintes (5,143).

Em um estudo retrospectivo com prontuários de 301 crianças, em 1999, encontrou 11% (33 casos) de causa atribuída a história familiar, sendo em 26 casos perda auditiva bilateral severa profunda (144). Em outro estudo, de 2000, o índice de perda auditiva como causa a história familiar foi verificada em 18% da casuística de 106 crianças (145).

Na Austrália, um estudo avaliou a validade do risco história familiar (avaliado como fator de risco único) em um Programa de TANU. A prevalência de crianças com história familiar e perda auditiva congênita foi de 7,29%, porém aquelas que tinham este fator de risco e que desenvolveram perda pós-natal foi de 36,84%. Nos casos congênitos os familiares com história familiar eram mãe e irmãos, enquanto nos casos pós-natal está relacionado com história familiar dos pais. Os autores

chamam a atenção para importância de acompanhar as crianças com estes fatores de risco pelo fato de desenvolverem perda auditiva após a TANU (146).

A consanguinidade é a união entre casais que descendem de um ou mais ancestral em comum. O efeito da consanguinidade é proporcional ao grau de parentesco dos familiares. Consanguinidade após o segundo grau de parentesco apresenta risco na prole próximo ao da população geral (147).

Os índices para consanguinidade são baixos em países da Europa Ocidental, América do Norte e Oceania. Na Europa Oriental, América do Sul e Japão, de 1 a 5% dos casamentos são consanguíneos dependendo da localização geográfica e os costumes sociais. A prevalência é mais alta na Ásia, Norte da África e Oriente Médio, com casamentos de primos de segundo grau representando mais de 50% dos casamentos. A prole de um casamento consanguíneo pode aumentar o risco das desordens genéticas por causa da expressão de genes recessivos mutados herdados de um ancestral em comum (148).

Em estudo de 2004, com crianças judias com perda auditiva, a frequência para consanguinidade foi de 7%, frequência esta considerada alta para os autores, indicando que a herança recessiva nesta população continua sendo uma causa importante de perda auditiva neurossensorial (149).

Bener, 2005, verificou em recém-nascidos da triagem neonatal, no Qatar, que a consanguinidade era mais comum nos portadores de perda auditiva (60,5%) do que naqueles que eram ouvintes (25,3%). Também identificou e relacionou com grande significância a consanguinidade com pais e mães com menor grau de escolaridade (150). Outro estudo, no mesmo país, em 2013, demonstrou que mesmo em um grupo homogêneo e com grande hábito de casamentos consanguíneos, há uma heterogenicidade genética (151).

3.6. Triagem auditiva neonatal

Os esforços para criar a triagem auditiva neonatal iniciam-se em 1969, nos Estados Unidos, com a criação do *Joint Committe on Infant Hearing* (JCIH), comitê este formado por representantes da Academia Americana de Pediatria, Academia Americana de Oftalmologia e Otorrinolaringologia e da Associação Americana de Linguagem e Audição, cujo objetivo inicial era fazer recomendações sobre as crianças com risco de perda auditiva e orientações sobre a triagem para os profissionais (152).

Em 1972/73 o JCIH determinou os primeiros fatores de risco para a perda auditiva e recomendou o monitoramento da audição nas crianças portadoras dos fatores de risco: história familiar de perda auditiva na infância, anomalia craniofacial, peso ao nascer menor que 1500 gramas, hiperbilirrubinemia com nível maior que 20 mg/dl e infecção congênita ou perinatal. Dez anos depois, em um novo consenso os fatores de risco meningite bacteriana e asfixia severa foram acrescentados como indicadores de risco para perda auditiva (153,154). O posicionamento do comitê até 1990 era do uso das medidas comportamentais para monitorização audiológica, sendo que em alguns casos orientava-se a associação com o potencial auditivo de tronco encefálico (PEATE). Nas recomendações de 1990 foram acrescentados os fatores de risco ototóxicos, ventilação mecânica prolongada e trauma craniano (155).

David Kemp, no final da década de 80 desenvolveu a técnica de captação das OEA, que são sons registrados no conduto auditivo externo, gerados pela atividade fisiológica dentro da cóclea, especificamente pelas células ciliadas externas (156,157). O exame da OEA é um teste rápido e não invasivo e por isso passou a ser utilizado para a triagem da perda auditiva neonatal.

No ano de 1993 o *National Institute of Health* concluiu e orientou que a triagem auditiva neonatal deve ser para todos os recém-nascidos e antes do três meses de idade (158). O JCIH, 1994, se posiciona da mesma maneira e orienta o uso das OEA e PEATE como medidas eletrofisiológicas para a perda auditiva. O JCIH incentiva as pesquisas de metodologias de diagnóstico e intervenção da perda auditiva com intuito de otimizá-las (159).

No ano de 2000, o novo consenso do JCIH protocola o uso combinado das OEA e PEATE para o diagnóstico da perda auditiva, orienta a triagem auditiva preferencialmente antes da alta e até os três meses de idade assim como intervenção

até os seis meses de idade com acompanhamento de equipe multidisciplinar. Também fazem parte deste consenso alguns outros princípios como monitoramento auditivo com menção as patologias que possam afetar as vias auditivas ou distúrbios de condução neural, garantia a família e a criança triada o respeito na escolha das decisões, a garantia de sigilo das informações individuais, monitoramento dos programas, avaliação das informações (sem exposição do paciente) para medir a eficácia dos serviços de triagem neonatal (160).

No ano de 2007 o JCIH publica seu último consenso até o momento. Este consenso, por ser o mais atual, será descrito com mais detalhes (5).

Princípios gerais do Programa de Diagnóstico de Intervenção da Perda Auditiva Precoce, JCIH, 2007:

1-Todas as crianças devem ter acesso a triagem auditiva através de uma medida eletrofisiológica antes de 1 mês de idade;

2- Todas as crianças que falharem na triagem auditiva e no reteste devem ter avaliação médica e fonoaudiológica até os três meses de idade para confirmar a presença da perda auditiva;

3-Todas as crianças com perda auditiva confirmada devem receber intervenção audiológica antes dos 6 meses de idade;

4- O programa deve garantir a criança e a família privacidade garantida através da escolha das informações, tomada de decisões compartilhadas e consentimentos dos pais. As famílias devem ter acesso as informações sobre todas as intervenções, opções de tratamento e aconselhamentos sobre a perda auditiva;

5- A criança e a família devem ter acesso imediato à tecnologia de alta qualidade, incluindo aparelho auditivos, implantes cocleares e outros dispositivos de apoio, quando apropriado;

6- Todos os recém nascidos devem ser monitorizados para a perda auditiva no atendimento médico domiciliar. A avaliação contínua do desenvolvimento da comunicação deve ser realizada por profissionais qualificados para todas as crianças, independente de apresentarem fatores de risco para a perda auditiva;

7- Programas de intervenção interdisciplinares apropriados para as crianças com perda auditiva e sua família devem ser oferecidos e acompanhados de profissionais com conhecimentos em perda auditiva na infância. Os programas de intervenção devem reconhecer e respeitar as escolhas informadas, tradições e crenças culturais da família;

8- Os sistemas de informações devem ser projetados para interagir com registros de saúde eletrônicos e devem ser usados para medir e relatar resultados da eficácia dos serviços de Programa de Detecção e Intervenção da Perda Auditiva Precoce na comunidade, nível estadual e federal.

As principais mudanças entre o JCIH de 2000 e 2007 foram:

A inclusão da neuropatia auditiva como um tipo de perda auditiva infantil. O comitê passa a considerar perda auditiva, as perdas sensoriais congênita uni ou bilaterais, a perda condutiva permanente e a perda auditiva do tipo neuronal.

O comitê também recomenda alguns protocolos audiológicos específicos: 1- crianças com mais de 5 dias de UTI devem realizar o PEATE- A para a possibilidade de diagnóstico de perda auditiva neuronal, quando falham devem ser reencaminhados para nova avaliação em serviço de audiologia e se necessário nova avaliação por PEATE; 2- criança (oriundas anteriormente de UTI neonatal ou enfermaria) readmitida no hospital por condições associadas a perda auditiva como hiperbilirrubinemia, cultura positiva para sepse e outras infecções, deverão repetir a triagem antes da alta.

Na avaliação audiológica toda criança deve ter um exame PEATE como parte do diagnóstico audiológico até os três anos de idade. As avaliações audiológicas devem ser personalizadas e avaliadas individualmente. As crianças com fatores de risco devem ser avaliadas com 24 e 30 meses.

Avaliações mais precoces e frequentes podem ser indicadas nas crianças com infecção pelo citomegalovírus, síndromes associadas com perda auditiva progressiva, desordens neurodegenerativas, traumas, culturas positivas para infecções associadas à perda auditiva, crianças que receberam oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO) ou quimioterapia e quando existe a preocupação de um cuidador ou história familiar. Na avaliação médica o paciente portador de perda

auditiva deve ser avaliado por oftalmologista e deve ser oferecido a família consulta genética.

Triagem auditiva no Brasil

As primeiras ações em relação a triagem auditiva neonatal iniciam-se a partir de 1987, com um programa implantado pela fonoaudióloga Dra. Marisa Frason de Azevedo na cidade de São Paulo, que realizava triagem auditiva em recém nascidos oriundos de UTI. Neste mesmo ano, a fonoaudióloga Dra. Tania Tochetto, em Santa Maria, no estado do Rio Grande do Sul, conduzia um projeto de detecção precoce da perda auditiva infantil (161). Ambos os projetos consistiam em avaliação audiológica por meio de respostas comportamentais. As observações sobre as respostas comportamentais para os sons não são um teste objetivo e são úteis para o acompanhamento audiológico (e não para o diagnóstico) ou para complementar os procedimentos objetivos da avaliação da audição.

Em 1988 a fonoaudióloga Monica Jubran Chap Chap iniciou a triagem auditiva, em um hospital particular, inicialmente utilizando o PEATE, em RN com indicadores de risco para a surdez, ampliando posteriormente para RN de UTI. Em 1996 a triagem passou a ter caráter universal. A partir de 1998 iniciou-se várias ações: a triagem auditiva passou a ser realizada pelo exame das OEA, os programas de TANU no Brasil começaram a se expandir e surgiu no país a necessidade de divulgação da TANU. O grupo de Apoio a Triagem Auditiva Neonatal- GATANU é criado, com objetivos iniciais de divulgar os benefícios do diagnóstico precoce assim como estimular a TANU de qualidade no Brasil (161).

O Comitê Brasileiro sobre Perda Auditiva na Infância, formado pelos Conselhos de Fonoaudiologia, Sociedades de Otorrinolaringologia e Pediatria emite a primeira resolução (01/99) a qual orienta triagem auditiva em todos os recém-nascidos ao nascimento, de preferência antes da alta da maternidade, visando o diagnóstico e a intervenção o mais precoce possível (162).

Considerando a magnitude do impacto da perda auditiva na população brasileira assim como suas consequências, em 2004, o Ministério da Saúde criou a Política Nacional de Atenção à Saúde Auditiva. Esta política consiste em propor uma rede hierarquizada e integrada em diferentes níveis de atenção procurando desta maneira otimizar não só o diagnóstico da perda auditiva mas também a reabilitação

auditiva (163). A triagem auditiva neste contexto é umas das principais ações porque envolve subseqüentemente o diagnóstico, o tratamento e a reabilitação (4).

Criado em 2007, o Comitê Multiprofissional em Saúde Auditiva (COMUSA) é composto de integrantes das áreas de Otorrinolaringologia, Fonoaudiologia e Pediatria que visam discutir e referendar ações voltadas para saúde auditiva. Esta mesma comissão no ano de 2010 elabora um parecer sobre a triagem auditiva neonatal. As diretrizes são semelhantes ao JCIH de 2007, porém com algumas adaptações para a condição sócio econômica brasileira (6).

A lei Federal número 12.303 sancionada em agosto de 2010 torna obrigatório o teste das OEA em todos os hospitais e maternidades para a crianças nascidas em suas dependências (164).

No ano de 2012 o ministério da saúde aprova as Diretrizes de Atenção à Triagem Auditiva Neonatal no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) com intuito de orientar as equipes multidisciplinares para os cuidados com a saúde auditiva infantil, ampliar a integração e articulação dos serviços de reabilitação com a rede de atenção básica e outros serviços de atenção especializada (165).

Os indicadores de qualidades para um programa de triagem auditiva são utilizados para avaliar a eficácia de um programa de triagem. No Brasil a COMUSA orienta as mesmas recomendações do JCIH 2007, as principais são (6):

- Porcentagem de recém-nascidos triados com até 1 mês de idade deve ser mais que 95% (aceitável correção da idade para os prematuros);
- Porcentagem de recém nascidos que falharam na triagem e nas avaliações subseqüentes antes da avaliação audiológica global ou seja o índice de neonatos encaminhados para o diagnóstico deve ser inferior a 4%;
- Das crianças que falharam na triagem e nas avaliações subseqüentes, 90% devem ter a conclusão diagnostica até os 3 meses de vida;
- Recomenda-se que 95% das crianças com perda auditiva bilaterais permanentes iniciem o uso de amplificação sonora no prazo de um mês após o diagnóstico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Tipo de estudo

Estudo retrospectivo por meio da análise de 31 prontuários de pacientes que falharam na TANU, com diagnóstico de perda auditiva concluído na Instituição ATEAL- Associação Terapêutica de Estimulação Auditiva e de Linguagem.

Iniciou-se uma investigação etiológica com pacientes que falharam na TANU e que também concluíram o diagnóstico de perda auditiva na Instituição ATEAL. Os exames laboratoriais e de imagem já são rotineiramente solicitados na Instituição. Para a avaliação genética realizou-se o convite para os responsáveis pelos menores para participar da pesquisa. Após o consentimento dos responsáveis, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi realizada a coleta de sangue na Maternidade da Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ) e na ATEAL (Figura 7).

4.2. Casuística

De janeiro de 2003 a dezembro de 2014, foram triados 43.230 recém-nascidos, no Hospital e Maternidade da Faculdade de Medicina de Jundiaí, São Paulo. Destes, 85 recém-nascidos falharam na triagem auditiva neonatal e foram encaminhados para o processo diagnóstico na ATEAL. O processo diagnóstico foi constituído de avaliação médica otorrinolaringológica e procedimentos audiológicos.

Após o processo diagnóstico, já na Instituição, a perda auditiva neurossensorial se manteve presente em 56 pacientes, em 22 pacientes a perda auditiva era do tipo condutiva e em 4 a perda era do tipo mista. Três pacientes após os exames diagnósticos apresentaram exames audiológicos normais. Foi possível investigar a etiologia em 31 pacientes que seguiram o critério de inclusão. Os demais pacientes não participaram do estudo por não completarem a realização dos exames ou por não aceitarem participar da pesquisa. Considerou-se como critério de inclusão: recém-nascidos que falharam na triagem auditiva e que no processo diagnóstico apresentaram perda auditiva, do tipo neurossensorial, que tenham realizado entrevistas médicas, exames laboratoriais, de imagem e teste genético. Foram

excluídos pacientes que apresentavam perda auditiva do tipo condutiva, ou mista, e pacientes que não realizaram todos os exames.

A casuística para o estudo compreende 19 pacientes do sexo masculino e 12 do sexo feminino. Vinte e dois pacientes eram portadores de perda auditiva bilateral e 9 de perda unilateral.

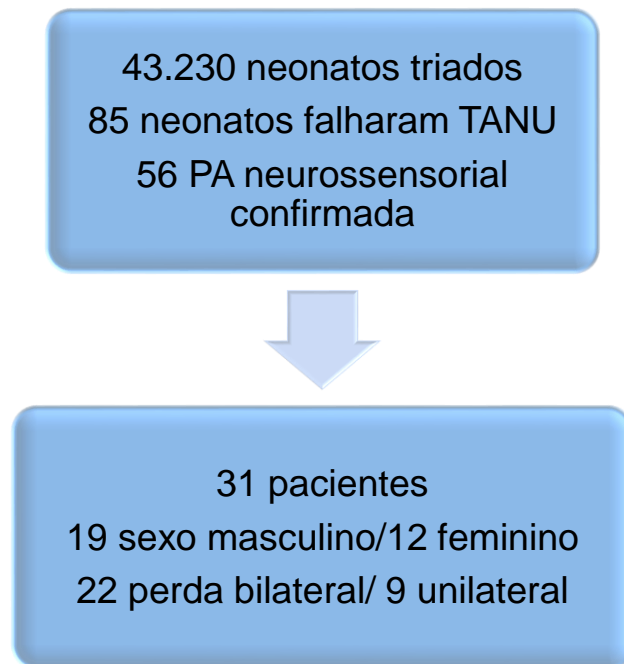


Figura 7- Fluxograma resumo da constituição da casuística.

4.3.Métodos

4.3.1.Procedimentos audiológicos na triagem auditiva

Janeiro de 2003 a setembro de 2009

A TANU foi realizada na maternidade do Hospital da Faculdade de Medicina de Jundiaí através das OEA por estímulo transientes e pesquisa do reflexo cócleo-palpebral (RCP). O equipamento utilizado para a realização das OEA foi o modelo Echocheck Hand Held ILo OAE Screener da marca Otodynamics. Para a pesquisa do RCP foi utilizado o instrumento musical agogô, percutido em forte intensidade.

Outubro de 2009 a dezembro de 2014

Foi inserido ao processo da TANU, o PEATE-A que é realizado em todos os recém-nascidos da maternidade. O equipamento utilizado foi o Accuscreen da marca GNOtometrics, utilizado na intensidade de 35 dBNA.

4.3.2.Procedimento após a triagem auditiva

As crianças com fatores de risco, determinados pelo JCIH 2000 e 2007 que passaram na triagem seguiram em acompanhamento no Programa de Acompanhamento Auditivo da ATEAL e as crianças que falhavam seguiam para o processo diagnóstico na mesma Instituição (5,160). Apesar de não ser considerado um fator pelo JCIH, RN com história de consanguinidade também foram acompanhados.

4.3.3.Processo diagnóstico da perda auditiva

As crianças encaminhadas por falha na TANU, foram submetidas à avaliação otorrinolaringológica a ao exame de PEATE por via aérea e via óssea (equipamento Navigator Pro da marca Biologic Systems Corp e Eclipse EP 25 da Interacoustics). Complementou-se avaliação diagnóstica com medidas de imitânciometria acústica (modelo AZ-7, Interacoustics) e OEA por estímulos transientes e por produto de distorção (ILO 292 DP Echoport, Otodynamics). A partir de janeiro de 2014 o Exame de Estado Estável (EE) foi adicionado ao processo diagnóstico. O modelo utilizado foi o Eclipse EP 25 da Interacoustics.

4.3.4. Classificação do grau de perda auditiva

Nos RN que foram reabilitados na Instituição foi possível obter limiares psicoacústicos quando estas crianças realizaram audiometria. O grau de perda auditiva segue a classificação de Northern and Downs, 1984 (166). Nesta classificação considera-se a média das frequências em 500,1000 e 2000Hz. Considerou-se grau normal limiares menores ou iguais a 25 dBNA; grau leve de 26-40 dBNA; grau moderado de 41-55 dBNA; moderadamente severo de 56-70 dBNA; severo de 71-90 dBNA e grau profundo limiares auditivos maiores ou iguais a 91 dBNA. Quando não foi possível obter respostas através dos limiares auditivos acústicos, considerou-se o menor valor do exame eletrofisiológico do PEATE.

4.3.5. Avaliação Otorrinolaringológica

Na avaliação otorrinolaringológica foi realizada anamnese detalhada, investigando dados relacionados aos indicadores de risco para a perda auditiva segundo o JCIH 2000 e 2007, acrescido do fator de risco consanguinidade (5,6,160).

Fatores de risco considerados no JCIH 2000 (160):

- condição que exija admissão por 48 horas ou mais na UTI neonatal;
- sinais ou achados associados a síndrome que incluam perdas auditivas neurosensoriais e/ou condutivas;
- história familiar de perda auditiva neurosensorial na infância;
- anormalidades crânio-faciais incluindo anormalidades morfológicas do pavilhão e canal auditivo;
- infecção intraútero como rubéola, toxoplasmose, citomegalovirose ou herpes;
- queixa dos pais ou tutores sobre atraso no desenvolvimento de fala, linguagem e audição;
- infecções pós natais associadas a perda auditiva neurosensorial, incluindo a meningite bacteriana

- indicadores neonatais como: hiperbilirrubinemia que requer exsanguíneo transfusão, hipertensão pulmonar persistente do RN associada a ventilação mecânica ou que requeira oxigenação extra corpórea;

- síndromes associadas a perda auditiva progressiva como neurofibromatose, osteopetrose e síndrome de Usher;

- desordens neurodegenerativas como Síndrome de Hunter, neuropatia sensório motora como ataxia de Friedreich e Síndrome de Charcot-Marie- Thooth;

- otite média secretora persistente ou recorrente por pelo menos 3 meses.

Fatores de risco considerados no JCIH 2007 (5):

- observação dos cuidadores a respeito da audição, fala, linguagem e/ou atraso no desenvolvimento;

- história familiar de perda auditiva neurosensorial na infância;

- permanência na UTI por mais de cinco dias, ou ventilação mecânica, uso de medicações ototóxicas como antibióticos (gentamicina, tobramicina) e diuréticos de alça (furosemida), hiperbilirrubinemia com exsanguíneo transfusão; ventilação extracorpórea;

- infecções intraútero como CMV, herpes, rubéola, sífilis e toxoplasmose;

- anomalias craniofaciais

- achados físicos associados a síndromes com perda auditiva neurosensorial ou condutivas permanentes;

- síndromes associadas a perda auditiva progressiva ou de início tardio como Usher, Waardenburg, Alport, Pendred;

- desordens neurodegenerativas; como Síndrome de Hunter, neuropatia sensório motora como ataxia de Friedreich e Síndrome de Charcot-Marie- Thooth;

- infecções pós natais confirmadas de meningite bacteriana ou viral;

- traumatismo craniano;

- quimioterapia.

Também foram registrados dados referentes ao cartão pré-natal da mãe e o cartão da criança ao nascimento e quaisquer outros documentos relacionados à saúde do RN, como por exemplo, carta de alta da UTI Neonatal. Foi realizado o exame físico e otoscopia, com grande atenção em alterações craniofaciais, anomalias de orelhas e sinais dismórficos que poderiam sugerir perda auditiva associada a síndromes. Nesse caso, o paciente foi encaminhado ao atendimento com geneticistas.

Foram solicitados exames laboratoriais (sorologias para Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus e Sífilis), tomografia de ossos temporais e mastoide e coleta de sangue para o teste genéticos da surdez.

4.3.6.Exames laboratoriais

Os exames laboratoriais foram realizados no pré-natal da gestante e no momento do parto através do exame de sangue conforme recomendações do Ministério da Saúde do Brasil (34,38,42,47,167,168).

Quando havia suspeita de infecções também era realizado exames no RN.

Sífilis congênita

Na sífilis congênita recomenda-se inicialmente o VDRL no primeiro trimestre (geralmente já na primeira consulta pré natal) e no início do terceiro trimestre, sendo repetido na admissão para parto ou aborto.

A mãe com sorologia VDRL positiva deverá realizar os testes mais específicos: FTA-Abs ou TPHA.

Se mãe for positiva para sorologia FTA-Abs ou TPHA e tratada adequadamente, mas o recém-nascido for sintomático, o mesmo deverá ser tratado.

Se o RN for assintomático, o mesmo deverá realizar novo VDRL, se negativo pouco provável que haja infecção. Se o VDRL for positivo o RN será tratado para sífilis (Penicilina Benzatina) e/ou neurosífilis (Penicilina Cristalina).

Se mãe não tiver sido tratada ou tratada de forma inadequada o RN seja sintomático ou não, deverá ser tratado.

Se FTA-Abs ou TPHA negativos, provavelmente trata-se de falso positivo e não será necessário reavaliar o RN.

Toxoplasmose Congênita

Os testes sorológicos de pesquisa de anticorpos IgM e IgG são os mais utilizados, porém a interpretação dos resultados é um tanto complexa e exige a necessidade de repetição dos exames ao longo da gestação.

Na presença de IgG positivo na gestante a sorologia deve ser repetida em um intervalo de 3 semanas e se houver um aumento de títulos significa que a gestante foi infectada recentemente. O teste de avidéz de IgG pode ser utilizado para estimar o momento que ocorreu a infecção aguda. Um índice de avidéz elevado (maior que 60%) indica que a infecção aguda ocorreu há mais de 3 a 4 meses. Porém índices entre 31 a 59% são inconclusivos e devem ser repetidos ao longo da gestação.

O anticorpo IgM pode ser detectado também na primeira ou segunda semana após a infecção aguda e permanecer com títulos elevados por 2 a 3 meses. Desta forma sorologia positiva para IgM durante a gravidez não necessariamente significa que a infecção foi adquirida na gestação.

O diagnóstico sorológico no RN precisa também ser interpretado adequadamente pelo fato de que o anticorpos maternos da classe IgG atravessam a barreira placentária. Títulos deste anticorpos, nos RN quatro vezes ou mais que os títulos materno podem sugerir infecção congênita.

Por sua vez a presença de IgM nos RN sugerem infecção congênita, uma vez que estes anticorpos não ultrapassam a barreira placentária. A pesquisa do anticorpo, via punção de sangue periférico, deverá ocorrer de 2 a 5 dias de vida e mesmo assim a chance de detecção da doença é de 75% dos nascidos com a infecção, mesmo naqueles sintomáticos.

Deste modo recomenda-se que as crianças sejam acompanhada ao longo de um ano de vida por titulações de anticorpos, principalmente IgG, para saber se tratava-se de infecção congênita ou anticorpos maternos que ultrapassaram a barreira placentária.

Citomegalovírus

Para o diagnóstico materno considerou-se a soro conversão durante a gestação, ou seja a gestante era não reagente e adquiriu o anticorpo IgM e IgG na sequência. Já na infecção recorrente (reativação da infecção latente ou a reinfeção com nova cepa) considerou-se a elevação de títulos e /ou detecção de IgM.

Os testes sorológicos nos recém nascidos também são mais utilizados na prática médica, porém estes apresentam baixa sensibilidade e especificidade. O padrão ouro é a cultura de fibroblastos utilizando como material a urina ou a saliva do RN. Outra alternativa é a detecção do DNA viral através do PCR. Neste estudo apenas a sorologia foi realizada.

Rubéola

A presença de anticorpos IgM para a rubéola significa que o paciente estava na vigência de infecção aguda, enquanto a presença de anticorpos do tipo IgG corresponderia a imunidade adquirida pelo paciente para tal doença, fosse de forma ativa (paciente teve contato com a infecção, mas a doença não é mais ativa) ou de forma passiva (como as vacinas).

A ausência dos anticorpos no exame de sorologia significa que o paciente não foi exposto a doença, nem foi imunizado passivamente contra ela ou que o paciente ainda não adquiriu anticorpos por se encontrar na “janela imunológica”.

4.3.7.Exames de imagem

Foram solicitados tomografia de ouvido e mastoide para todos os pacientes e para aqueles com perda unilateral, assimétrica ou candidato a implante coclear também foi realizado o exame ressonância magnética de crânio com ênfase no ângulo ponto cerebelar.

Os exames de imagem foram realizados em hospital conveniado aos serviço de saúde do município e foram realizados sob sedação, na grande maioria das vezes.

4.3.8. Teste Genético: Estudo molecular dos principais genes da surdez

Nos pacientes do estudo retrospectivo foram colhidos amostra de sangue em papel FTA no mesmo período da coleta de sangue para o teste do pezinho.

Nos pacientes do estudo prospectivo foram colhidas amostras de sangue periférico, armazenadas em tubos Vacutainer contendo EDTA 10%.

Todas as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Genética Molecular Humana, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp.

Inicialmente foram pesquisadas alterações genéticas por meio: do rastreamento da mutação c.35delG no gene *GJB2*, da identificação das deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*- D13S1854) no gene *GJB6* e da investigação da presença das mutações m.827A>G e m.1555A>G no gene mitocondrial *MT-RNR1*. Também foi realizada a pesquisa de mutações no gene da Cx 26 mediante sequenciamento direto de Sanger da região codificante do gene.

A pesquisa da mutação m.827A>G, no segundo período do estudo, o prospectivo, não foi realizado por ser verificado que se tratava de um polimorfismo.

Descrição dos procedimentos moleculares

Extração do DNA genômico de sangue periférico

A extração do DNA genômico ocorre a partir dos leucócitos, provenientes do sangue periférico coletado. O sangue periférico, logo após a coleta é armazenado em tubos Vacutainer contendo 10% do anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetracético dissódico). Foi empregado o método de extração com fenol e clorofórmio, padronizado no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG.

Para a lise das hemácias utilizou-se a Solução A (Triton-X 100 a 1%; MgCl₂ 5 mM; Sacarose 0,32 M; Tris- HCl 10 mM pH 8,0) no sangue coletado, até atingir o volume de 50 mL. Após ser homogeneizado, o material foi mantido no gelo por 30 minutos. Posteriormente o material foi centrifugado a 2.000 rpm por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi novamente acrescentado 35 ml da solução A. Novamente foi realizado os processos no gelo e centrifugação, até obtenção de um precipitado branco, livre de hemácias.

Foi adicionado ao precipitado 1ml da solução B 1 X(Na₂EDTA 20 mM; NaCl 20 mM; Tris HCl 20 mM pH 8,0) e 250 µL de solução C (para cada 1 mL de solução C:0,5 mL de solução B 1X, 1 mg de proteinase K [Boehringer MannheimGmbH, Mannheim, Alemanha] e 0,5 ml de SDS 10%). O material foi incubado em banho maria a 56° por aproximadamente 2 horas, ou em alguns casos, a 37° por 18 horas.

Após o período de incubação, a etapa de purificação do DNA genômico é realizado com fenolclorofórmio. É adicionado ao material 1 ml de TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e quantidade suficiente de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM pH 8,0 até dobrar o volume da amostra. Foi feita a homogeneização por inversão lentas dos tubos durante 5 minutos, e para a separação e recuperação do sobrenadante do precipitado, o tubo foi centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.

O procedimento é repetido mais duas vezes, na primeira o fenol é substituído por uma solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1; v:v:v) e na segunda vez por uma solução clorofórmio: álcool isoamílico (24;1; v:v).

Para a precipitação do DNA, foi acrescentado 0,1 do volume da amostra de acetato de sódio 3 M pH 5,5 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado foi recuperado com o auxílio de uma haste plástica esterilizada e lavado com etanol 70%, para a retirada do excesso de sal, antes de ser ressuspendido em um volume de 200 µL de TE 1X.

Procedimento para triagem dos principais genes envolvidos na surdez

Rastreamento da mutação c.35delG no gene *GJB2*

A mutação c.35delG no gene *GJB2* foi rastreada pela técnica de PCR alelo específico (AS-PCR), utilizando ARMS primers (do inglês *Amplification Refractory Mutations System*) para a detecção de mutações de ponto (169). Esta técnica foi desenvolvida no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG, a qual se encontra patenteada (Patente Nº P10005340-6; Método de teste para surdez de origem genética – UNICAMP, 2002).

Amplificação no gene *GJB2*

Por se tratar de um éxon de tamanho muito grande – 681 pb, o éxon codificante do gene *GJB2* foi dividido para amplificação pela técnica de PCR em dois pares, de acordo com condições previamente descritas na literatura (13,76). As sequências dos primers utilizados para amplificação do gene *GJB2* e tamanho dos fragmentos gerados são mostrados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1- Sequências dos primers e o tamanho dos fragmentos utilizados para amplificação do gene *GJB2*.

Par	Primers 5' →3'	Tamanho (pb)
1	Cx1F – CTC CCT GTT CTG TCC TAG Cx1R – GAC ACG AAG ATC AGC TGC	284
2	Cx2F – GCT ACG ATC ACT ACT TCC C Cx2R – GGT TGC CTC ATC CCT C	520

Para um volume de 50 µL de reação, foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 µL de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada primer (direto e reverso), 2.5 U da enzima Taq DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8), 25 mM de MgCl₂, completando com água até o volume final.

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Condições de amplificação: 30 ciclos de aquecimento a 94° C para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 60° C para anelamento dos primers e então 72° C para a extensão de novas fitas.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1%, após coloração com brometo de etídio (Sigma) (Figura 8). Os fragmentos amplificados serão sequenciados para a verificação de mutações.

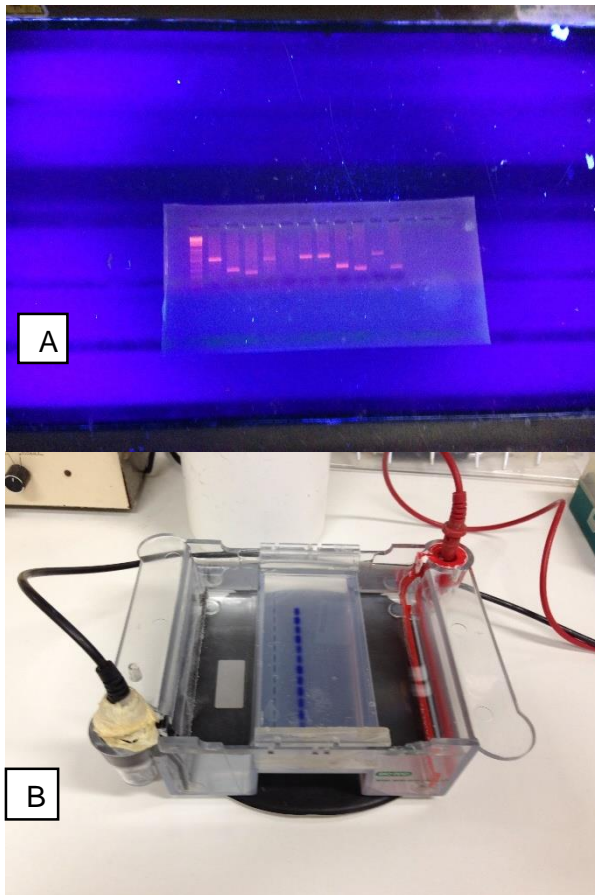


Figura 8- Ilustrações do processo de eletroforese em gel de agarose (A) e dos produtos da amplificação visualizados após coloração com brometo de etídio (B).

Reação para o sequenciamento

As reações para o sequenciamento foram realizadas no sequenciador automático ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer utilizando-se o BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Foram utilizados: 40 a 80ng de DNA genômico, 2µL do mix BigDye, 1 µL do primer direto ou reverso, água deionizada para completar 10 µL.

Condições de amplificação: 30 ciclos de aquecimento a 96° C para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 60° C para anelamento dos primers e então 72° C para a extensão de novas fitas.

Após a amplificação as reações de sequenciamento foram purificadas. Inicialmente foi acrescentados 2,5µL de EDTA 125 mM e 25µL de etanol (100%), após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, a placa foi centrifugada por 45

minutos a 3.700 rpm (4°C). O etanol foi descartado e foi acrescentado o 30 µL de etanol 70%. Foi realizada uma nova centrifugação por 10 minutos a 3.700 rpm e o etanol foi novamente descartado. Antes da colocação da placa no sequenciador, foram adicionados 10µL de formamida seguida de homogeneização e centrifugação rápida. A amostra foi desnaturada (5 minutos a 95 °C) e em seguida colocada no gelo por 10 minutos.

Análise das sequências obtidas

As análises das sequências obtidas foram analisadas no programa Chromas Lite® ([http:// www.technelysium.com.au/chromas_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)) e também foram comparadas com sequências normais dos genes através do programa CLC Sequence Viewer 6.5.2 (CLC bio A/S).

Rastreamento da mutação IVS1+ 1G>A no gene *GJB2*

Para o rastreamento da mutação foi utilizada a técnica de RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorfism*). Para a amplificação foram utilizadas as condições descritas na literatura e utilizado o par de primers descritos na tabela abaixo (Tabela 2) (80).

Tabela 2- Sequência do par de primers utilizados no rastreamento da mutação IVS1+1G>A.

Par	Primers 5' →3'
1	Cx26 EX1 F –TCC GTA ACT TTC CCA GTC TCC GAG GGA AGA GG Cx26 EX1 R – CCC AAG GAC GTG TGT TGG TCC AGC CCC

Para um volume final de 50 µL foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada primer (direto e reverso), 2,5 U de enzimas Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) em tampão de PCR 10 X(Tris- HCl 10 mM pH 8,8), 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 µL de DMSO completando com água até o volume final. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Condições de amplificação: 30 ciclos de aquecimento a 94° C para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 72° C para anelamento dos primers e então 72°C para a extensão de novas fitas.

Após a amplificação pela técnica de PCR, foram gerados fragmentos de 361 pb. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à análise de restrição utilizando a enzima H_pH I (Invitrogen) por 3 horas a 37°C. Para o preparo da reação de digestão foram utilizados: 17,5 µL do produto de PCR, 2,0 µL do tampão da enzima e 0,5 µL da enzima H_pH I (5000U/µL). Para a análise dos produtos gerados, os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados e visualizados sob luz ultravioleta.

Dessa forma:

1. Indivíduos não portadores desta mutação apresentarão dois fragmentos de peso molecular diferente: um de 117 pb e outro de 244 pb.
2. Os portadores da mutação possuem o sítio de restrição abolido, gerando apenas um fragmento de 361 pb. Para confirmar esta mutação realiza-se ainda o sequenciamento no produto da PCR.

Rastreamento das deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*- D13S1854) no gene *GJB6*

O rastreamento destas mutações foi realizado através de uma PCR multiplex, que investiga a presença de ambas as deleções em apenas uma reação. O protocolo realizado para este rastreamento foi descrito por Del Castillo, 2005 (88). As sequências dos primers e tamanhos estão demonstrados na tabela abaixo (Tabela 3). Os fragmentos de DNA resultantes da PCR contêm os pontos de quebra de ambas as deleções e um segmento do éxon 1 do gene *GJB6*, que é usado como controle para verificar a eficiência da reação assim como para diferenciar os alelos heterozigotos e homozigotos para qualquer uma das duas deleções.

Tabela 3- Sequência dos pares de primers e tamanhos dos fragmentos utilizados no rastreamento das deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*- D13S1854) no gene *GJB6*.

Par	Posição	Primers 5' →3'	Tamanho (pb)
1	Ponto de quebra del(<i>GJB6</i> -D13S1830)	GJB6- TTT AGG GCA TGA TTG GGG TGA TTT BKR1- CAC CAT GCG TAG CCT TAA CCA TTT T	460
2	Ponto de quebra del(<i>GJB6</i> - D13S1854)	DeIBK1-TCA TAG TGA AGAACT CGA TGC TGT TT DeIBK2-CAG CGG CTA CCC TAG TTG TGG T	564
3	Éxon 1 do gene <i>GJB6</i>	Ex1A- CGT CTT TGG GGG TGT TGC TT EX1B- CAT GAA GAG GGC GTA CAA GTT AGA A	333

Para um volume de 30 µL de reação, foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada primer (direto e reverso), 2.5 U da enzima Taq DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8), 25 mM de MgCl₂, completando com água até o volume final. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Condições de amplificação: 35 ciclos de aquecimento a 95° C para a desnaturação do DNA, seguidos de temperatura de 62° C para o anelamento dos primers e 72° C para a extensão de novas fitas.

Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5% após coloração com brometo de etídio (Sigma).

Dessa forma:

1. Paciente sem deleções apresentam a banda controle – o exón 1 do gene *GJB6* de 333 pb.
2. Pacientes portadores da del (*GJB6-D13S1830*) em heterozigose apresentam a banda de controle e a banda de 460 pb.
3. Pacientes portadores da del (*GJB6- D13S1854*) em heterozigose apresentam a banda de controle e a banda com um fragmento de peso 564 pb.

Rastreamento da mutação m.1555A>G no gene mitocondrial MTRNR1

Para rastreamento desta mutação também foi utilizado protocolo já descrito na literatura (170,171). O par de primers utilizados encontra-se na tabela abaixo (Tabela 4).

Tabela 4- Par de primers utilizados no rastreamento da mutação m.1555A>G no gene mitocondrial MTRNR1.

Primers 5' →3'
MIT F –GTC GAA GGT GGA TTT AGC AGT
MIT R- CAG AAG GTA TAG GGG TTA GTC

Para um volume de 50 µL de reação, foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada primer (direto e reverso), 2.5 U da enzima Taq DNA polimerase em tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8), 25 mM de MgCl₂, completando com água até o volume final. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems).

Condições de amplificação: 30 ciclos de aquecimento a 94°C para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 54°C para anelamento dos primers e então 65°C para a extensão das novas fitas.

Após a amplificação foram gerados fragmentos de DNA mitocondrial de 2060 pb. Estes produtos foram submetidos a enzima de restrição (enzima BsmAI da Invitrogen) por duas horas a 55°C. Para o preparo da reação de digestão foram

utilizados: 17,5 µL do produto da PCR, 2,0 µL do tampão da enzima e 0,5 µL da enzima BsmAI (5000 U/µL). A análise dos produtos gerados foi realizado em gel de agarose 1,5% com posterior coloração com brometo de etídio (Sigma).

Dessa forma:

1. Não portadores desta mutação apresentarão no resultado da eletroforese em gel de agarose 3 fragmentos de diferentes peso molecular: 1100,516, e 444 pb.
2. Portadores da mutação terão um dos sítios de restrição abolido e por isso apresentarão no resultado 2 fragmentos: 1616 e 444 pb.

4.3.9. Classificação dos resultados

Após análise dos dados, as causas para a perda auditiva foram classificadas em cinco grupos: causa desconhecida, causa de origem ambiental, causa genética, causa não esclarecida e causa de múltiplos fatores, esta última assim chamada por apresentar fatores de risco de origem ambiental e não ambiental (com componentes hereditário), independentes entre si.

A causa de origem desconhecida foi definida no presente estudo para aqueles pacientes que não possuíam nenhum fator de risco para perda auditiva, sem nenhuma alteração na história clínica, exame físico assim como exames laboratoriais, de imagem e testes moleculares e sem evidência de doenças, mal formações e mutações respectivamente que sugerissem a causa da perda auditiva.

A causa ambiental é aquela em que há presença de fatores de risco e/ou a presença na história clínica de dados que indique que a perda auditiva é de origem ambiental, como por exemplo doenças infecciosas adquiridas no período gestacional e/ou intercorrências neonatais e pós-natais. Nos exames laboratoriais as sorologias podem ser positiva. Pode haver alteração radiológica: malformações por doenças infecciosas, teratogênicos ou qualquer outras injúrias de origem ambiental com prejuízo para a formação do sistema auditivo nas crianças. No teste molecular para a pesquisa de alterações nos genes da surdez não há mutações.

No caso da etiologia de origem genética pode haver fatores de risco ou não para a perda auditiva, alterações laboratoriais ou mesmo malformação radiológica (e em alguns casos associado), porém no teste molecular há presença de mutação

conhecida como a responsável pela perda auditiva, como por exemplo, nas mutações em homozigose c.35delG no gene *GJB2*.

No grupo chamado causa de múltiplos fatores os pacientes possuem fatores de risco ambientais e não ambientais (como história de perda auditiva na família e/ou consanguinidade), estes fatores são independentes entre si. Neste grupo os exames laboratoriais ou radiológico podem apresentar alterações e nos testes moleculares dos principais genes para a surdez não há indícios de mutações.

O grupo de causa não esclarecida é constituído de pacientes que possuem fatores de risco não ambientais como consanguinidade e história familiar de perda auditiva mas que não apresentaram alterações laboratoriais, radiológicas ou mutações. Neste grupo foi considerado relação de parentesco até segundo grau. Este grupo difere do “causa desconhecida” pela presença do fator de risco história familiar, uma vez que no JCHI este fator é motivo de monitoramento da perda auditiva.

4.3.10. Análise das perdas auditivas

Como já descrito, foi classificada de acordo com a classificação de Northern and Downs, 1984, porém as perdas auditivas bilaterais assimétricas, quando possível, para efeito de análise, foi classificada de acordo com o grau de perda auditiva e sua funcionalidade (166).

Exemplo: perda auditiva moderada em uma orelha e em outra moderadamente severa, para efeito de análise foi classificada como grau moderado. Neste estudo dois pacientes precisaram ser reclassificados para análise.

4.3.11. Metodologia Estatística

A avaliação estatística foi feita por estatístico e compreendeu os testes:
Teste de Igualdade de Duas Proporções

O Teste de Igualdade de duas Proporções é um teste não paramétrico que compara se a proporção de respostas de duas determinadas variáveis e/ou seus níveis é estatisticamente significantes.

Intervalo de Confiança para Média

O intervalo de confiança para a Média é uma técnica utilizada quando queremos ver o quanto a média pode variar numa determinada probabilidade de confiança. Neste estudo os intervalos de confiança foram de 95% de confiança estatística.

Teste de Qui-Quadrado

O Teste Qui-Quadrado é um teste utilizado para se verificar se duas variáveis e seus níveis possuem ou não uma dependência (associação) estatística.

Correção de Yates

Ao aplicar o teste de χ^2 (Qui- quadrado) supõe-se que o tamanho das amostras seja "grande". Mas em situações práticas, o valor de χ^2 calculado é aproximado, pois utiliza-se amostras de tamanho finito e o valor da frequência observada só assume os valores de números inteiros, ou seja nunca haverá por exemplo 2,73 indivíduos observados.

Quando se obtém um valor de χ^2 significativo mas nota-se que a amostra é pequena e/ou que a frequência esperada em uma das classes é pequena (tipicamente, quando for menor que 5) a fórmula de obtenção de χ^2 poderá produzir um valor maior que o real.

Alguns autores, entre eles Ronald Fisher, recomendam que se observe a seguinte restrição:

O teste de χ^2 pode ser usado se o número de observações em cada casela da tabela for maior ou igual a 5 e a menor frequência esperada for maior ou igual a 5. Em caso contrário, em cada classe deve ser utilizada a correção de Yates:

$$\chi^2 = \sum \left[\frac{(|o - e| - 0,5) * 2}{e} \right]$$

Evidentemente, não é preciso usar a correção de Yates se o valor de χ^2 obtido for menor que χ^2 , pois o novo valor será menor que o primeiro, continuando a não ser significativo. Apesar do assunto ser controverso, de modo geral, usa-se a correção de Yates quando:

- o valor de Qui Quadrado obtido é maior que o crítico
- há pelo menos uma classe com número de esperados menor que 5

P-valor

É o resultado estatístico de cada comparação. Caso esse valor seja maior que o nível de significância adotado conclui-se que a hipótese é nula (H_0), ou seja as variáveis são independentes ou não estão associadas. Caso o p-valor seja menor que o nível de significância adotado a hipótese alternativa (H_1) é a hipótese verdadeira, ou seja as variáveis são dependentes ou estão associadas entre si. Neste estudo o nível de significância foi de 0,05% (5%). Nesta análise foram utilizados os softwares: SPSS V17, Minitab 16 e Excel Office 2010.

4.4. Aspecto Ético

Este estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Estadual de Campinas, na linha de pesquisa do Estudo Molecular da Perda Auditiva que se encontra sob o número de parecer: 396/2006.

5. RESULTADOS

5.1. Características gerais da população do estudo

De 43.230 RNs, entre janeiro de 2003 e dezembro de 2014, foram triados 85 bebês com perda auditiva na TANU. Foi confirmada a perda auditiva de origem neurosensorial (uni ou bilateralmente) em 56 RNs. Vinte dois pacientes apresentaram perda auditiva condutiva, 4 apresentavam perda auditiva do tipo mista e três pacientes tiveram seus exames audiológicos normais. Participam deste estudo 31 crianças que possuíam todos os critérios de inclusão. A quantidade de falso positivos no primeiro exame da TANU se deve principalmente as perdas de origem condutivas, que no processo diagnóstico na Instituição são diagnosticadas e posteriormente tratadas (Figura 9).

Dos 31 pacientes do estudo, 61,3% (n= 19) eram do sexo masculino e a maioria apresentavam perda auditiva neurosensorial bilateral, 71% (n=22). Não há diferença estatística significativa entre os sexo (61,3% masculino e 38,7% feminino- p valor 0,075), porém a recorrência da perda auditiva bilateral mostrou-se com um percentual significativo em relação a perda unilateral (71% bilateral e 29% unilateral, p valor <0,001).

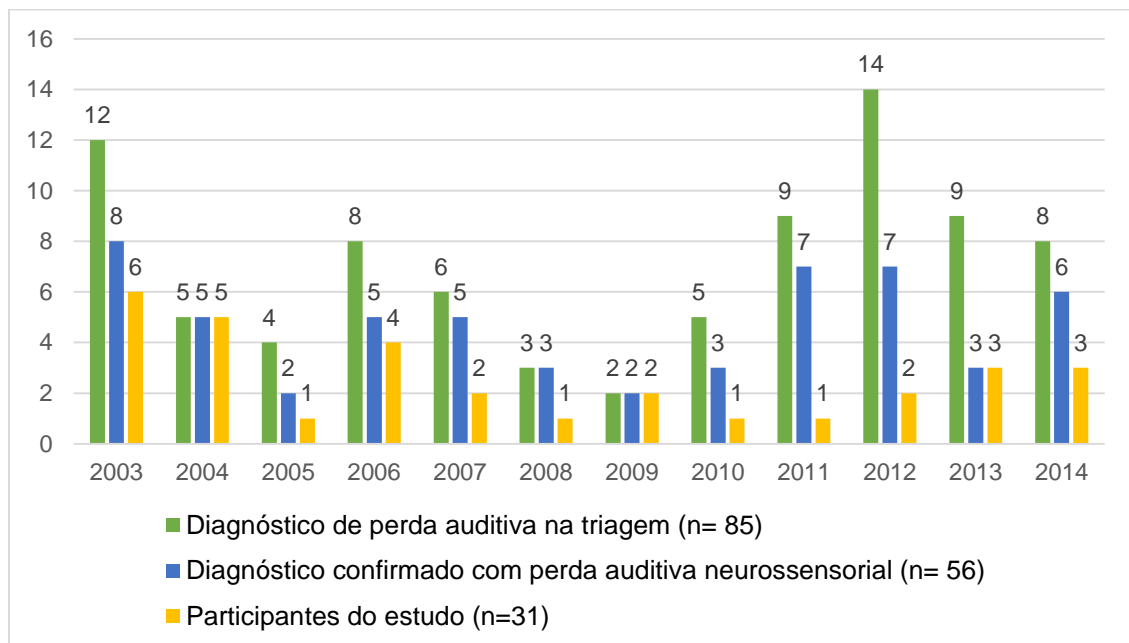


Figura 9- Gráfico com a distribuição das crianças diagnosticadas na TANU, crianças com perda auditiva neurosensorial confirmada e crianças participantes do estudo conforme o ano.

A média de idade atual da amostra (uma vez que o estudo iniciou-se em 2003) é de 7,5 anos (intervalo de confiança de $\pm 1,4$; desvio padrão de 4 e mediana 9) variando entre 1 ano e 12 anos.

A idade para o diagnóstico audiológico confirmado, ou seja da TANU até o diagnóstico na Instituição mais precoce foi de 2 meses e o tardio de 60 meses, com média de 13,3 meses de idade (com intervalo de confiança de $\pm 4,3$ meses; desvio padrão de 12,1 e mediana de 10) (Figura 10).

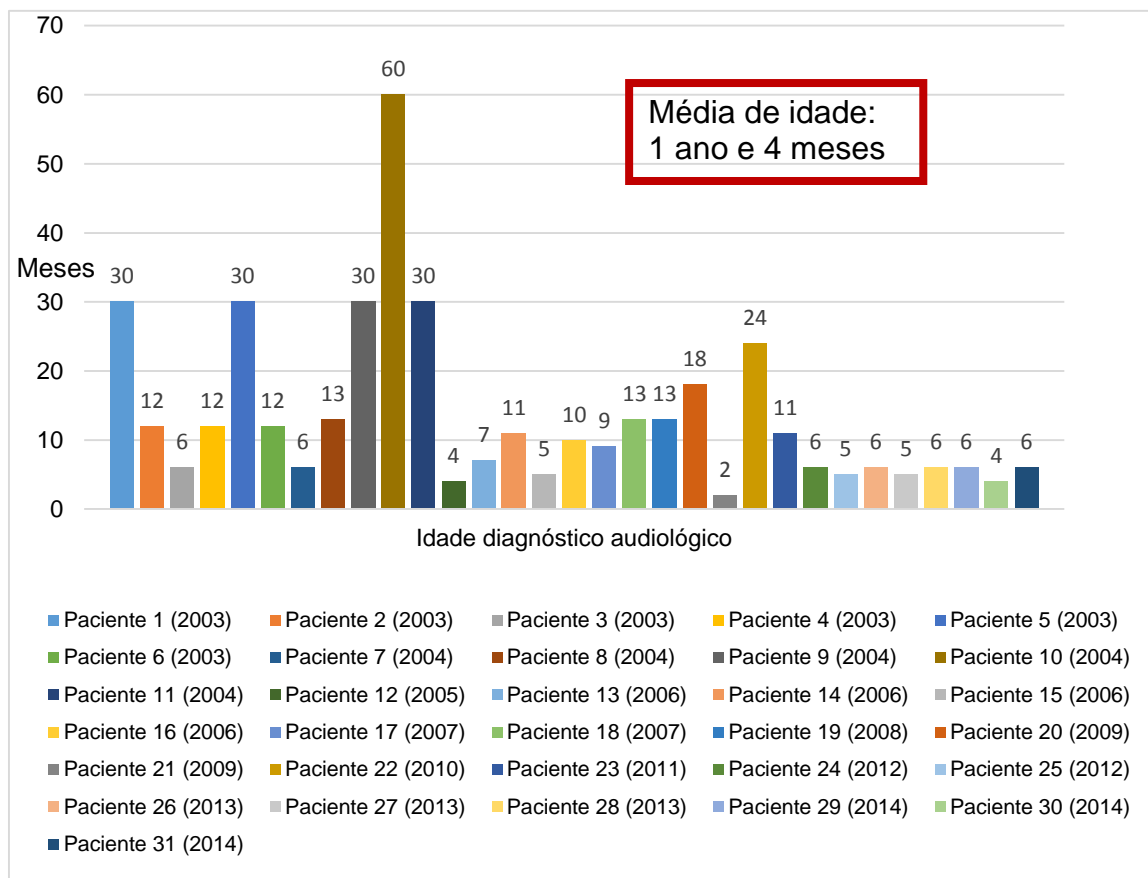


Figura 10- Gráfico com demonstração da idade do diagnóstico audiológico em meses nos pacientes conforme ordem cronológica de nascimento dos pacientes.

A menor idade para qual o diagnóstico etiológico foi realizado foi aos 6 meses de idade (paciente 12) e o mais tardio aos 84 meses (paciente 18) com média de 37,4 meses de idade (intervalo de confiança de $\pm 7,7$ meses; desvio padrão de 21,8 e mediana de 36) (Figura 11).

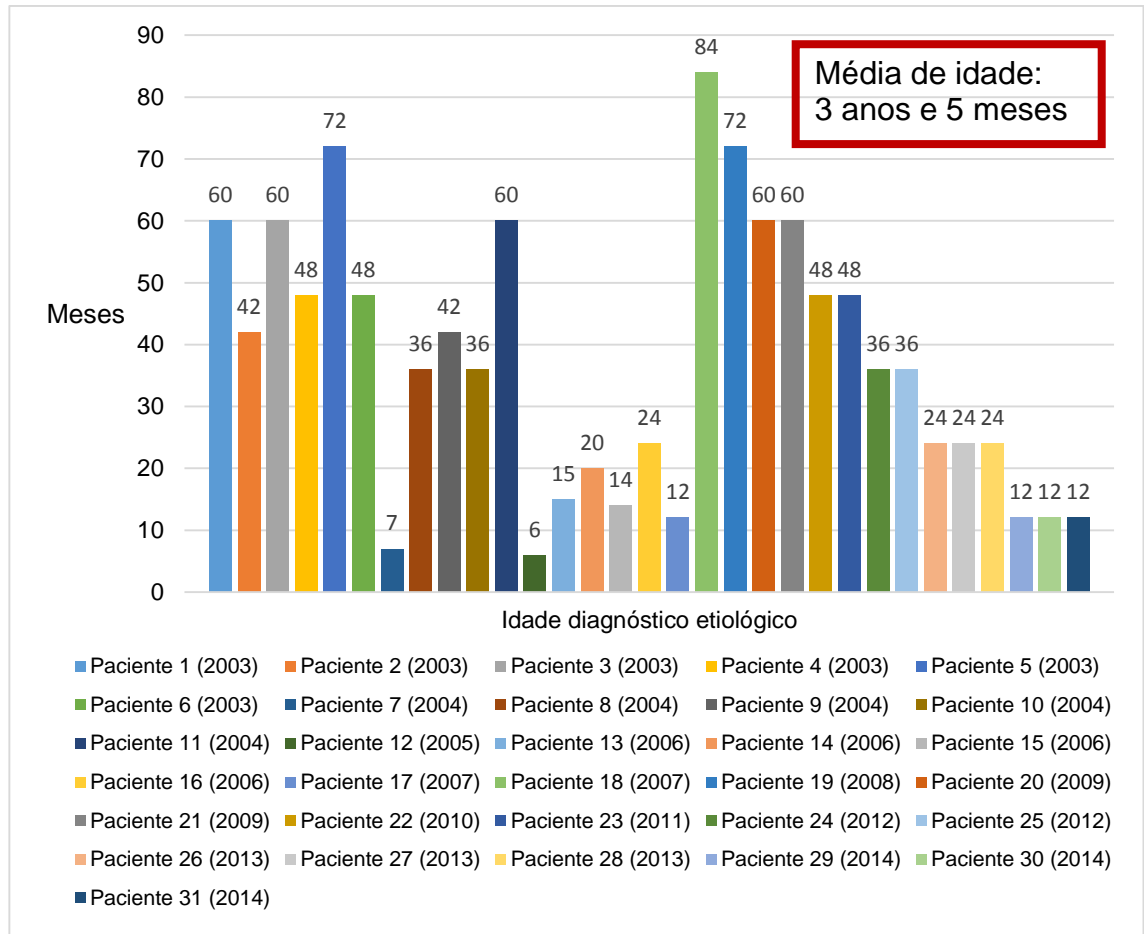


Figura 11 Gráfico demonstrando a idade do diagnóstico etiológico em meses nos pacientes conforme ordem cronológica de nascimento dos pacientes.

Não há mais informações sobre 2 crianças (6,5%) em relação ao fato de realizar reabilitação auditiva, uso de dispositivos auditivos e a forma de comunicação. Os demais 29 pacientes seguem em acompanhamento otorrinolaringológico, audiológico e/ou de reabilitação auditiva com equipe multidisciplinar (Figura 12).

Onze pacientes (35,5%) utilizam AASI e realizam terapia de reabilitação auditiva na Instituição, 5 pacientes (16,1%) possuem implante coclear unilateral e AASI no ouvido não implantando e fazem reabilitação na ATEAL. Onze pacientes (35,5%) estão em uso de aparelho auditivo e mantem apenas o acompanhamento na Instituição (Figura 12).

O motivo para apenas acompanhar na Instituição incluem desde alta do setor de reabilitação da Instituição, realização de terapias nas cidades de origem dos pacientes e impossibilidade de frequentar as terapias na Instituição que consistem de

1 a 2 vezes na semana, com vários atendimentos nas áreas de fonoaudiologia, psicopedagogia, psicologia e se necessários fisioterapia e de terapia ocupacional.

No acompanhamento na ATEAL são realizados: avaliação da audição, verificação do aparelho auditivo e dos moldes, assim como a situação do paciente em relação as terapias realizadas nos seus municípios. As consultas de acompanhamento podem ocorrer de 2 a 6 meses, de acordo com a necessidade do caso do paciente.

Dois pacientes (6,5%) só fazem acompanhamento sem uso de AASI; o primeiro por apresentar perda auditiva unilateral com linguagem oral e não obter nenhum ganho com uso do AASI e o segundo caso é um paciente portador de autismo, com terapia em outra Instituição, mas que não se adaptou com AASI e que não desenvolveu nenhum tipo de comunicação até o momento.

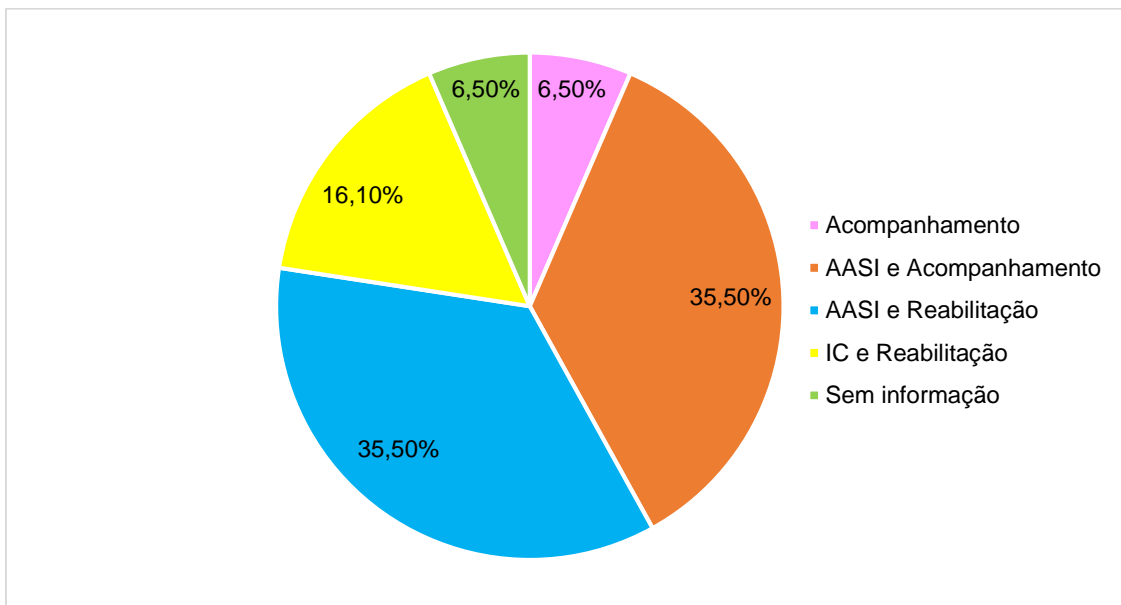


Figura 12- Gráfico representando a situação do paciente em relação ao acompanhamento, uso de dispositivo auditivo (AASI ou IC) e reabilitação.

O tempo em que as crianças se encontram em reabilitação (na Instituição ou em outro município) e/ou acompanhamento é em média de 61 meses (intervalo de confiança $\pm 15,9$; desvio padrão de 43,6 e mediana 63). O maior tempo de reabilitação é de 132 meses.

Em relação a forma de comunicação dos pacientes, a grande maioria, 22 pacientes (71%) apresentam ou estão em trabalho fonoaudiológico (no caso dos menores de 2 anos) para a comunicação na forma oral. Quatro pacientes (12,9%) se comunicam por Libras, a língua brasileira de sinais. Dois pacientes (6,5%) não se tem informações e 1 paciente (3,2%) não apresenta nenhum tipo de comunicação, possivelmente pelo autismo (Figura 13).

Dois pacientes (6,5%) utilizam a abordagem oral e libras ao mesmo tempo. O paciente 19 é portador de Implante Coclear, mas apresentou muitas faltas nas terapias, dificultando o trabalho de reabilitação, assim como também não houve participação importante da família no processo de reabilitação na Instituição. Já o paciente 26, portador de perda auditiva profunda, aguarda o Implante Coclear e na terapia é realizada abordagem oral, mas como sua mãe é portadora de perda auditiva profunda (com oralidade e libras), a criança também utiliza libras para se comunicar (Figura 13) (Quadro 1).

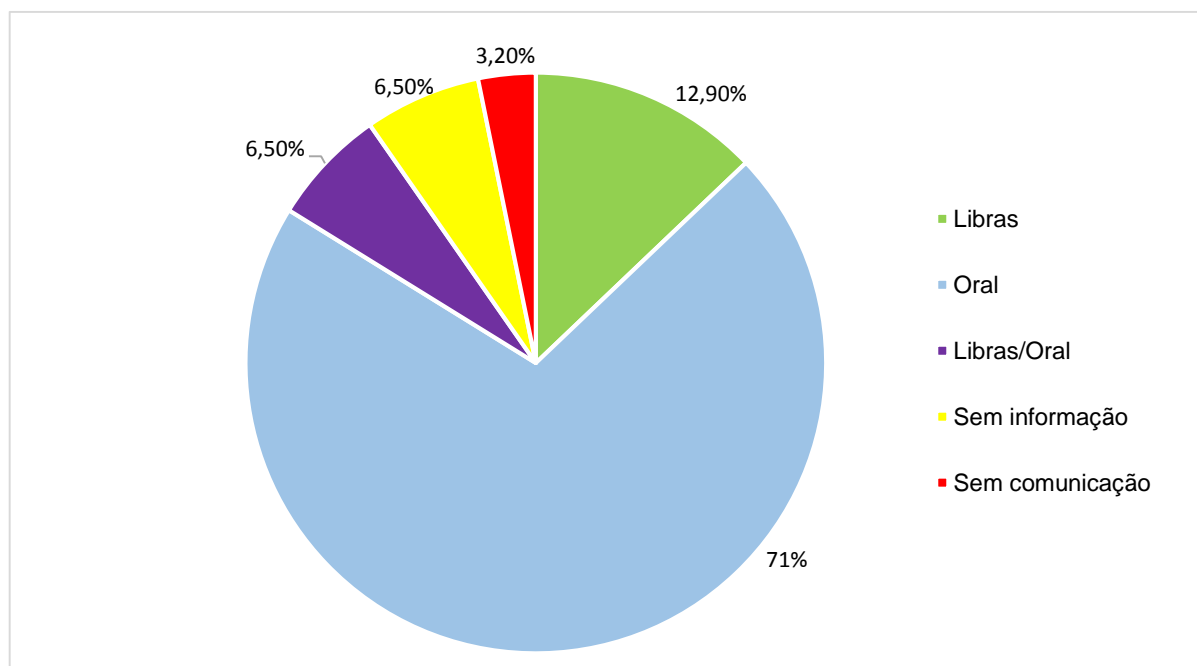


Figura 13- Gráfico com a distribuição da forma de comunicação dos pacientes portadores de perda auditiva do estudo.

5.2. Fatores de risco presentes na amostra estudada

Foram verificados fatores de risco em 19 pacientes (61,3%) do estudo. Os fatores de risco mais encontrados, de acordo com o JCIH 2007, foram permanência na UTI neonatal em 10 pacientes (32,2%), história familiar em 9 pacientes (29%), prematuridade em 6 pacientes (19,4%) e anóxia ou hipóxia neonatal em 3 pacientes (9,7%). Hiperbilirrubinemia, ototóxicos e infecção congênita apresentaram dois casos (6,5%) cada fator de risco (Figura 14).

Os dois casos de infecções congênicas no estudo são por sífilis e outro por CMV, ambos casos confirmados por sorologias durante o pré-natal da gestante e depois no próprio neonato.

Doze casos (38,7%) do estudo não possuíam nenhum fator de risco para a perda auditiva. No estudo foi acrescentado o fator consanguinidade, encontrado em 3 casos (9,67%) da amostra (Figura 14).

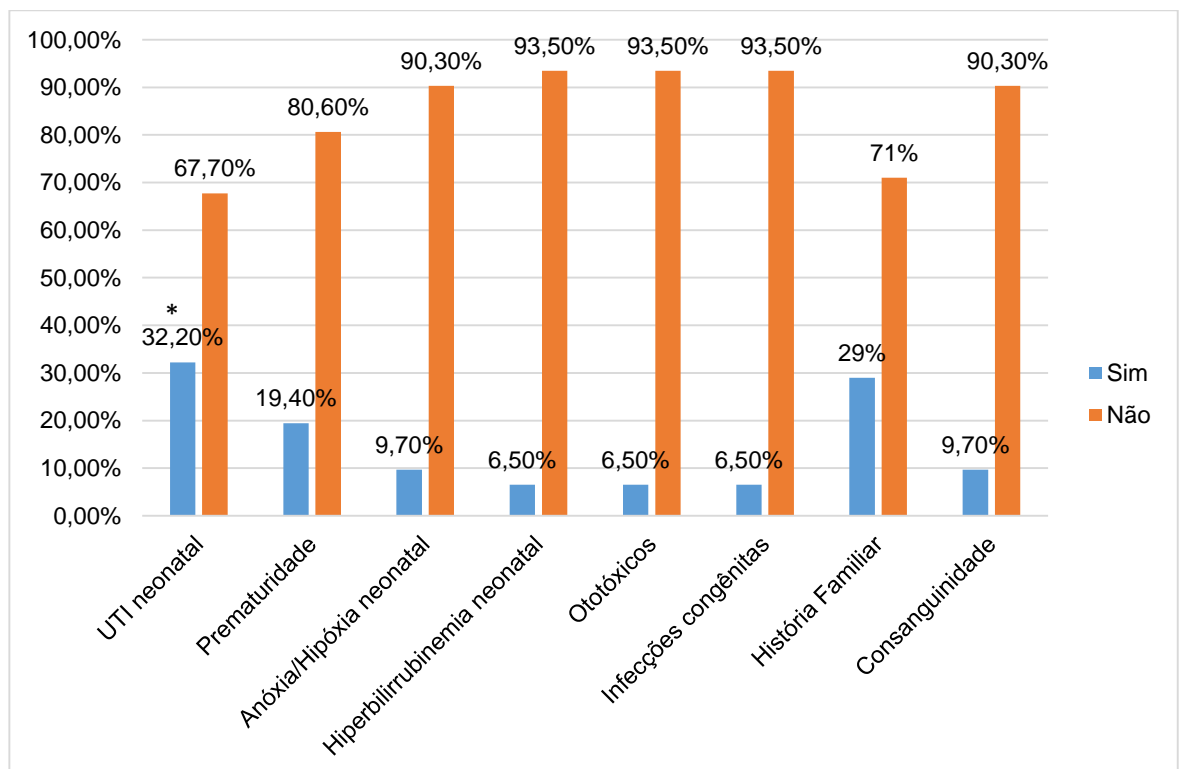


Figura 14- Gráfico dos fatores de risco para perda auditiva encontrado em 19 pacientes do estudo. Obs: o paciente pode ter associado mais de um fator de risco. Legenda: * significância no teste de igualdade de proporções.

Quando realizado o teste Qui Quadrado para avaliação do fato de ter ou não cada fator de risco constata-se que a ausência de cada fator de risco na população é estatisticamente significativa em relação ao fato de ter o fator de risco, com exceção do fator de risco UTI neonatal (tabela 5). Ou seja a presença deste fator UTI neonatal quando comparado ao fato de não apresentá-lo não apresenta diferença estatística como nos demais fatores.

Tabela 5- Distribuição da presença de fator de risco.

Fatores de Risco	Não		Sim		P-valor
	N	%	N	%	
Anóxia	28	90,3%	3	9,7%	<0,001
Consanguinidade	28	90,3%	3	9,7%	<0,001
Hiperbilirrubinemia	29	93,5%	2	6,5%	<0,001
História Familiar	22	71,0%	9	29,0%	<0,001
Infecção Congênita	29	93,5%	2	6,5%	<0,001
Ototóxicos	29	93,5%	2	6,5%	<0,001
Prematuridade	25	80,6%	6	19,4%	<0,001
UTI neonatal	21	67,7%	10	32,3%	0,005

Por outro lado quando é realizado o teste de Igualdade de Duas Proporções, tomando o fator de risco mais prevalente que é UTI neonatal, o mesmo se mostra estatisticamente significativo, com diferença estatística entre UTI neonatal e demais fatores ($p < 0,05$), com exceção de história familiar e prematuridade (tabela 6).

Tabela 6- Distribuição dos P valores no teste de igualdade de duas proporções para os fatores de risco do estudo.

Fatores de Risco	
Anóxia	0,029
Consanguinidade	0,029
Hiperbilirrubinemia	0,010
História Familiar	0,783
Infecção Congênita	0,010
Ototóxicos	0,010
Prematuridade	0,246
UTI neonatal	Ref.

5.3. Resultados do estudo molecular dos principais genes da surdez

Encontrou-se em 5 pacientes (16,1%) a presença da mutação c.35delG em homozigose. Em 4 pacientes (12,9%), encontrou-se alterações consideradas não patogênicas: 3 (9,7%) pacientes apresentaram alterações A827G no gene mitocondrial e 1 (3,2%) V27I no gene *GJB2*.

5.4. Resultados dos exames de imagem

Não houve nenhuma alteração nos exames radiológicos: tomografia de ossos temporais e ressonância magnética de ouvidos nos 31 pacientes do estudo.

Após análise dos fatores de risco, exames laboratoriais, radiológicos e genético foi possível determinar uma etiologia (Quadro 1).

Quadro 1- Apresentação dos fatores de risco, exames laboratoriais, radiológicos, genéticos e etiologia.

Paciente	Sexo	Lateralidade	Grau da perda auditiva	Fator de risco pré-natal	Fator de risco neonatal	Fator de risco não ambiental		Etiologia
1	M	B	Profundo	-	-	História Familiar Tio paterno	-	Não esclarecida
2	M	U	Moderadamente severo	Infecção congênita: sífilis	-	-	Sorologia positiva sífilis	Ambiental
3	M	B	Severo	-	-	Consanguinidade Primos de primeiro grau		Não esclarecida
4	F	B	Severo	-	UTI neonatal-8 d Prematuridade- 32 s *anóxia/hipóxia- 3/6	-	-	Ambiental
5	M	U	Profundo	-	UTI neonatal- 17 d Prematuridade-34 s	-	-	Ambiental
6	M	U	Moderado	-	UTI neonatal- 6 d	-	-	Ambiental
7	M	B	Profundo	-	-	-	Exame molecular: c.35delG/35delG	Genético
8	F	B	Leve	-	UTI neonatal- 13 d prematuridade- 34 s *anóxia/hipóxia-2/6	-	-	Ambiental
9	M	B	Profundo	-	UTI neonatal-18 d	História Familiar Irmã	-	Múltiplos fatores
10	M	B	Moderado	-	UTI neonatal-9 d ototóxicos- amicacina *anóxia/hipóxia-4/5	Consanguinidade Primos de primeiro grau	-	Múltiplos fatores
11	M	B	Severo	-	UTI neonatal- 6 d Prematuridade - 32 s Hiperbilirrubinemia	-	-	Ambiental
12	F	B	Profundo	-	-	-	Exame molecular: c.35delG/35delG	Genético
13	M	B	Profundo	-	-	-	Exame molecular: c.35delG/35delG	Genético

14	M	B	Profundo	Infecção Congênita: Citomegalovírus	-	Consanguinidade Primos de primeiro grau	Sorologia positiva citomegalovírus	Múltiplos fatores
15	M	B	Profundo	-	-	-	Exame molecular: c.35delG/35delG	Genético
16	F	U	Profundo	-	-	-	-	Desconhecida
17	F	U	Profundo	-	-	História familiar pai	-	Não esclarecida
18	F	B	Moderado	-	-	História familiar Primos de primeiro grau e tios (família paterna)	-	Não esclarecida
19	F	B	Profundo	-	-	-	-	Desconhecida
20	M	B	Moderado	-	-	História Familiar pai	-	Não esclarecida
21	F	B	Profundo	-	-	-	Exame molecular: m.35delG/35delG	Genético
22	M	U	Moderadamente severo	-	-	História Familiar Tia paterna	-	Não Esclarecida
23	M	U	Profundo	-	-	-	-	Desconhecida
24	F	U	Moderado	-	UTI neonatal-15 d Prematuridade- 31 s	História Familiar Tio paterno	-	Múltiplos fatores
25	M	U	Moderado	-	-	-	-	Desconhecida
26	M	B	Profundo	-	-	História Familiar mãe	-	Não esclarecida
27	F	B	Moderado	-	-	-	-	Desconhecida
28	F	B	Moderado	-	UTI neonatal-32 d prematuridade-33 s hiperbilirrubinemia	-	-	Ambiental
29	M	B	Moderadamente severo	-	-	-	-	Desconhecida

30	F	B	Moderado	-	-	-	-	Desconhecida
31	M	B	Profundo	-	UTI neonatal-20 d	História Familiar	-	Múltiplos fatores
					Ototóxicos-	Primos de primeiro		
					Furosemida	grau e tios (origem materna)		

Legenda: M- Masculino, F- Feminino, U- Unilateral, B- Bilateral, d- dias, s- semana

5.5. Etiologia da perda auditiva

A causa ambiental foi responsável por 22,6% (n=7) dos casos de perda auditiva da população do estudo. A causa genética confirmada através das alterações nos exames moleculares dos principais genes da surdez foi responsável por 16,1% (n=5) dos casos. Em 22,6% (n=7) dos casos atribui-se causa não esclarecida, pelo fato dos pacientes possuírem como únicos fatores de risco; história familiar e/ou consanguinidade, porém sem alteração nos exames moleculares dos principais genes da surdez (Figura 15).

Em 16,1% (n=5) da casuística a causa da perda auditiva se compõe tanto de fatores ambientais como de fatores que presumem origem genética (sem alteração no exame molecular), aqui chamado de grupo de fatores múltiplos. A causa desconhecida, em que os pacientes não apresentam nenhum fator de risco, ausência de alterações genéticas nos testes moleculares, laboratorial e de imagem representa 22,6% (n=7) das crianças dos estudo (Figura 15). Não há diferença estatística entre os grupos (teste de Igualdade de Duas Proporções).

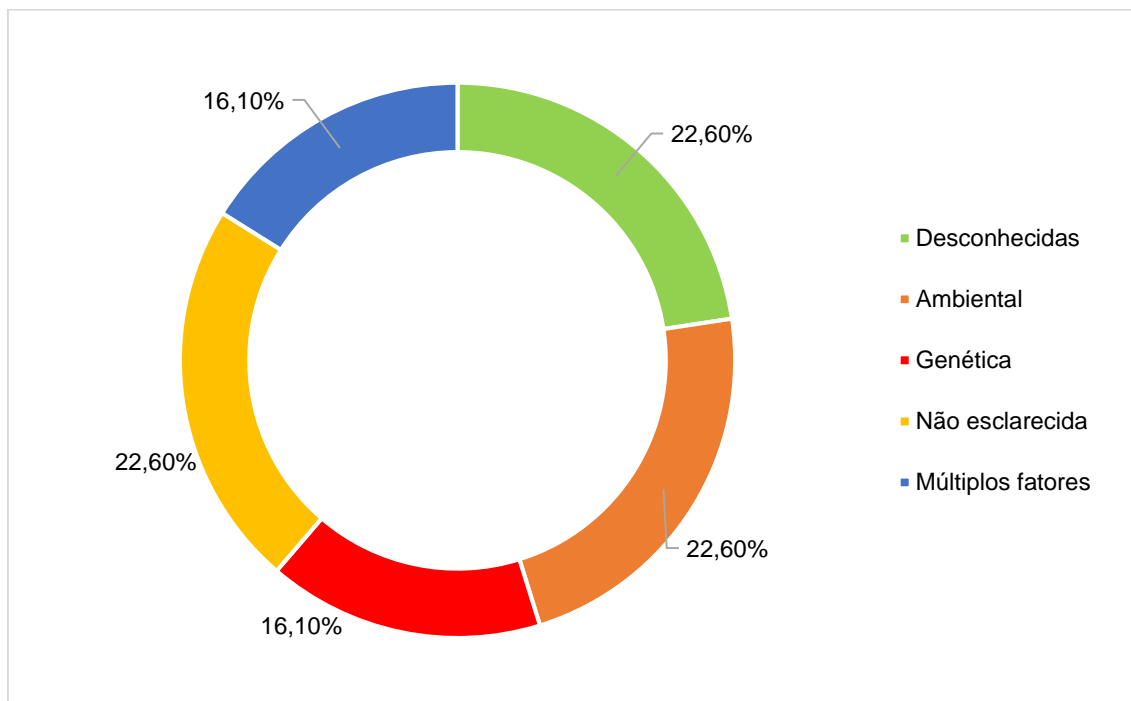


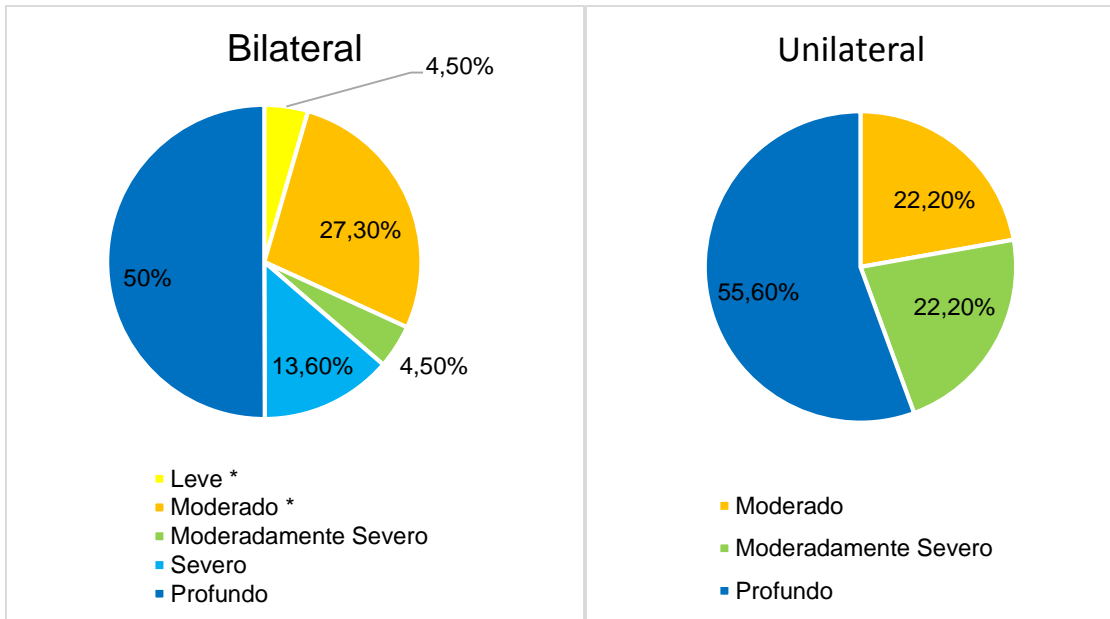
Figura 15- Gráfico da distribuição das etiologias da perda auditiva nas crianças (n=31) do estudo.

5.6. Caracterização audiológica da perda auditiva

Apenas as perdas auditivas neurossensoriais foram incluídas neste estudo. Considerando a lateralidade da deficiência auditiva, perda auditiva bilateral esteve presente em 22 pacientes (71%) e unilateral foi verificado em 9 pacientes (29%).

Dois pacientes (casos 8 e 20, 9%) apresentaram perda auditiva bilateral assimétrica; o paciente de identificação número 8 tem perda auditiva leve na orelha direita e perda auditiva nas frequências agudas (grau normal) e o paciente 20 apresenta grau moderado na orelha direita e grau moderadamente severo na orelha esquerda. Para efeito de análise o paciente 8 foi reclassificado como perda auditiva leve e paciente 20 como perda auditiva moderada (Quadro 1). Esta classificação foi realizada após discussão dos casos com as fonoaudiólogas dos pacientes em relação a funcionalidade da perda auditiva.

Deste modo, os pacientes com acometimento bilateral (n=22) apresentaram perda auditiva de graus: leve em 4,5% (n=1), moderado em 27,3% (n=6); moderadamente severo em 4,5% (n=1); severo em 13,6%(n=3) e de grau profundo em 50% (n=11) dos casos (Figura 16). Em relação a perda auditiva unilateral: 22,5% (n=2) dos pacientes apresentaram grau moderado, a mesma proporção, 22,5% (n=2) foi encontrada para o grau moderadamente severo e 55,6% (n=11) grau profundo (Figura 17).



Figuras 16 e 17- Gráfico da caracterização da perda auditiva da população do estudo quanto a lateralidade bilateral e unilateral e o grau. * Casos de perda auditiva assimétricas reconsideradas para efeito de análise.

No teste de igualdade de proporções o grau profundo para a perda bilateral é significativo em relação aos outros graus ($p < 0,05$) com exceção do grau moderado ($p = 0,122$), no unilateral nenhum grau foi mais significativo que outro ($p = 0,147$).

5.7. Correlação etiologia da Perda Auditiva e o Gênero

A grande maioria das crianças deste estudo são do sexo masculino, 61,3% (n=19). No gráfico abaixo encontra-se a distribuição por gênero e etiologia (Figura 18). Não houve nenhuma associação estatística significativa entre algum tipo de causa e o gênero (p valor= 0,718).

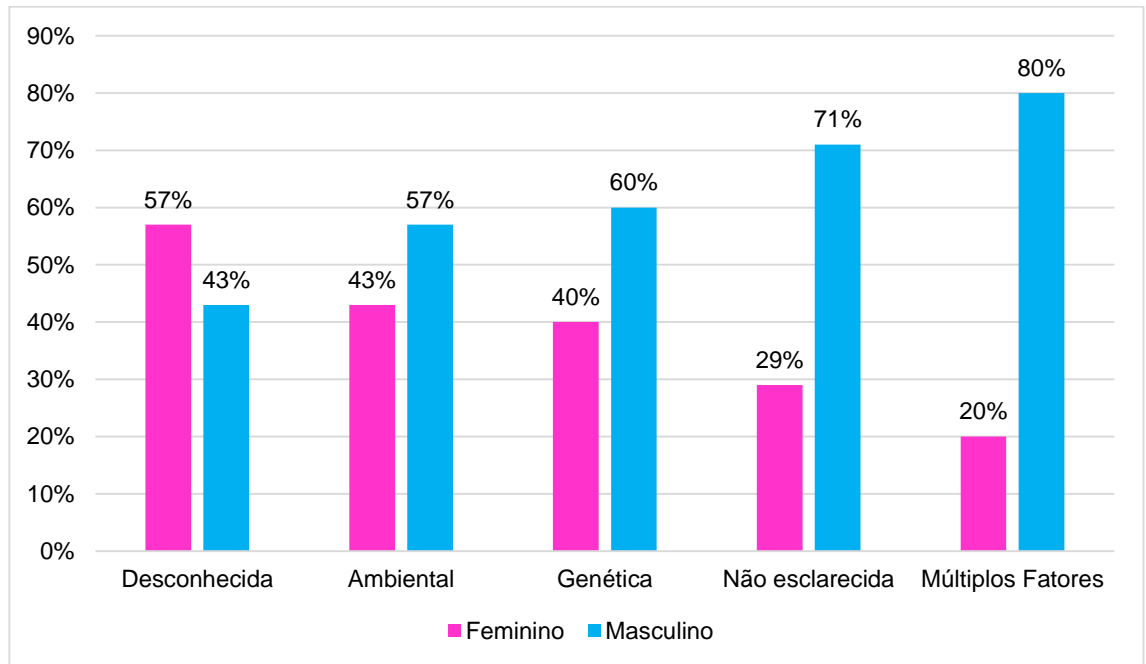


Figura 18 – Gráfico com distribuição do gênero em relação a etiologia da perda auditiva na população do estudo.

5.8. Correlação etiologia da Perda Auditiva e Lateralidade

Apesar da bilateralidade ser significativa em relação a unilateralidade neste estudo, quando a lateralidade é comparada com alguma causa específica de perda auditiva não se verifica nenhuma associação estatística ($p=0,471$) (Figura 19).

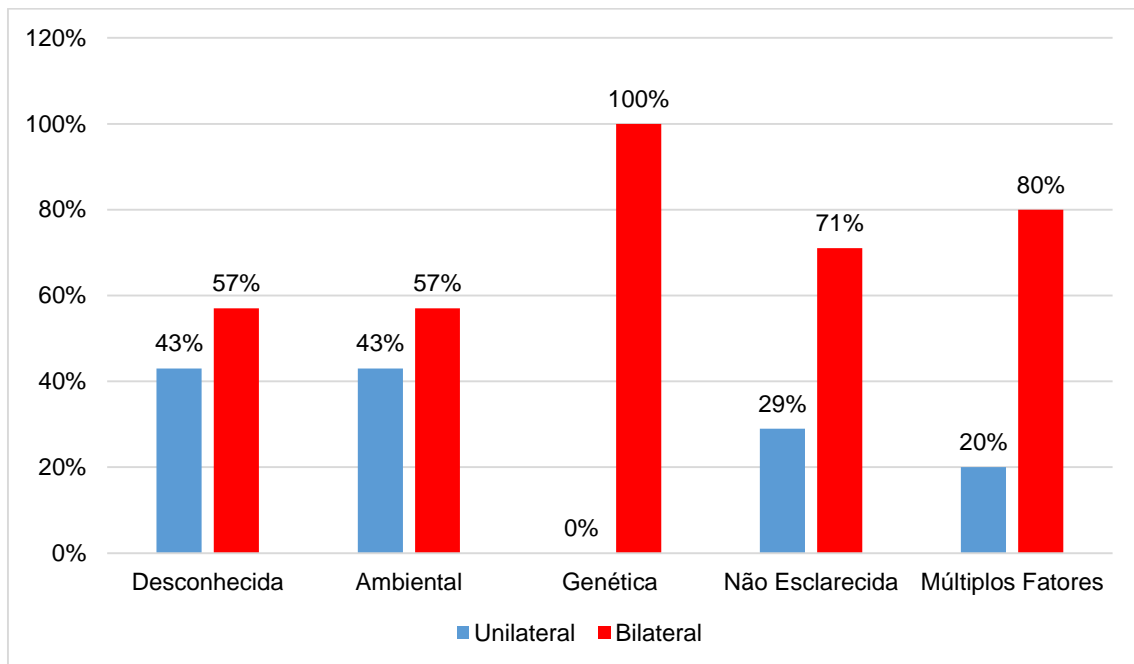


Figura 19- Gráfico da distribuição da lateralidade das perdas auditivas da população do estudo quanto as etiologias das perdas auditivas.

5.9. Correlação etiologia da Perda Auditiva, Lateralidade e Grau de perda

Correlacionando as etiologias com a lateralidade e grau nas perdas auditivas unilaterais, não há diferença significativa ($p=0,490$), pelo teste de Igualdade de Proporções (Figura 20).

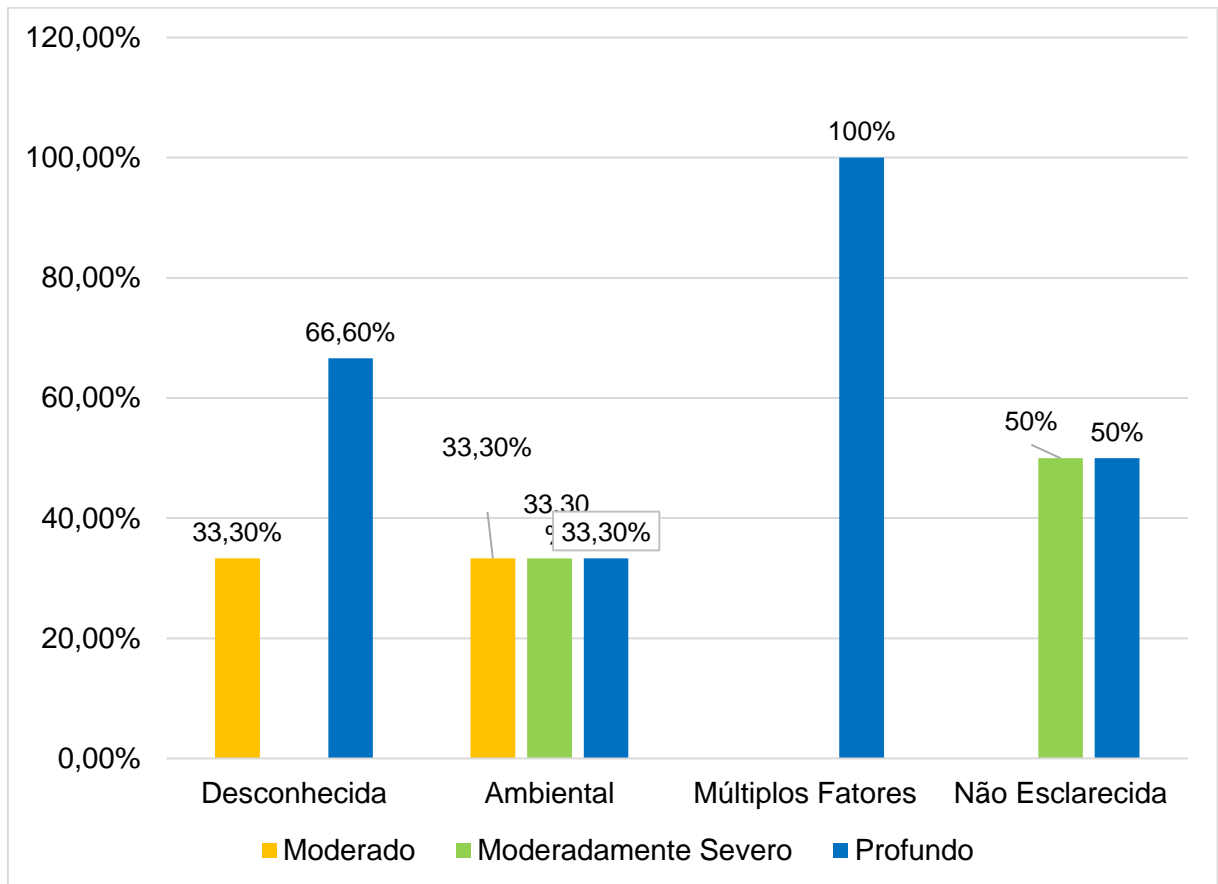


Figura 20- Gráfico da distribuição do grau de perda auditiva unilateral conforme a etiologia.

Para as perdas bilaterais, no teste de igualdade de proporções o grau profundo se mostrou significativo para a causa genética em relação às causas ambiental ($p=0,001$) e desconhecida ($p=0,007$), mas não para as causas de múltiplos fatores ($p=0,210$) ou não esclarecida ($p=0,052$). O grau leve da perda auditiva é significativo para a etiologia ambiental em relação às outras causas para este mesmo grau ($p=0,046$) (Figura 21).

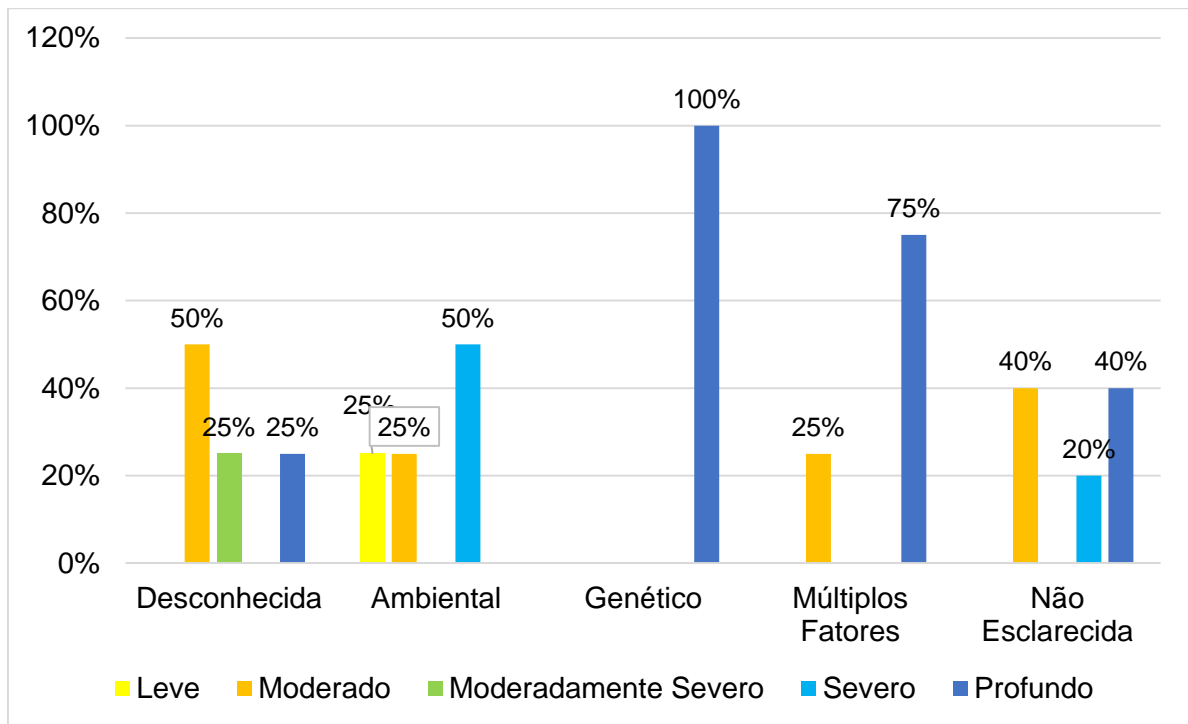


Figura 21- Gráfico da distribuição do grau de perda auditiva bilateral conforme a etiologia.

5.10. Avaliação dos meios diagnósticos utilizados na investigação etiológica

Neste estudo a história clínica possibilitaria o diagnóstico de 54,8% dos casos (n=17); o exame molecular para investigação dos principais genes da surdez favoreceria o diagnóstico em 16,1% dos casos (n=5); o exame laboratorial por si só favoreceria o diagnóstico em 3,2% dos casos (n=1) e este exame associado a história clínica também possibilitaria o diagnóstico em 3,2% dos casos (n=1) (Figura 22).

Os exames de imagem utilizados neste estudo tiveram rendimento de 0%, uma vez que não foi encontrado alterações nos exames. Os casos desconhecidos (n=7) representam 22,6% da casuística (Figura 22).

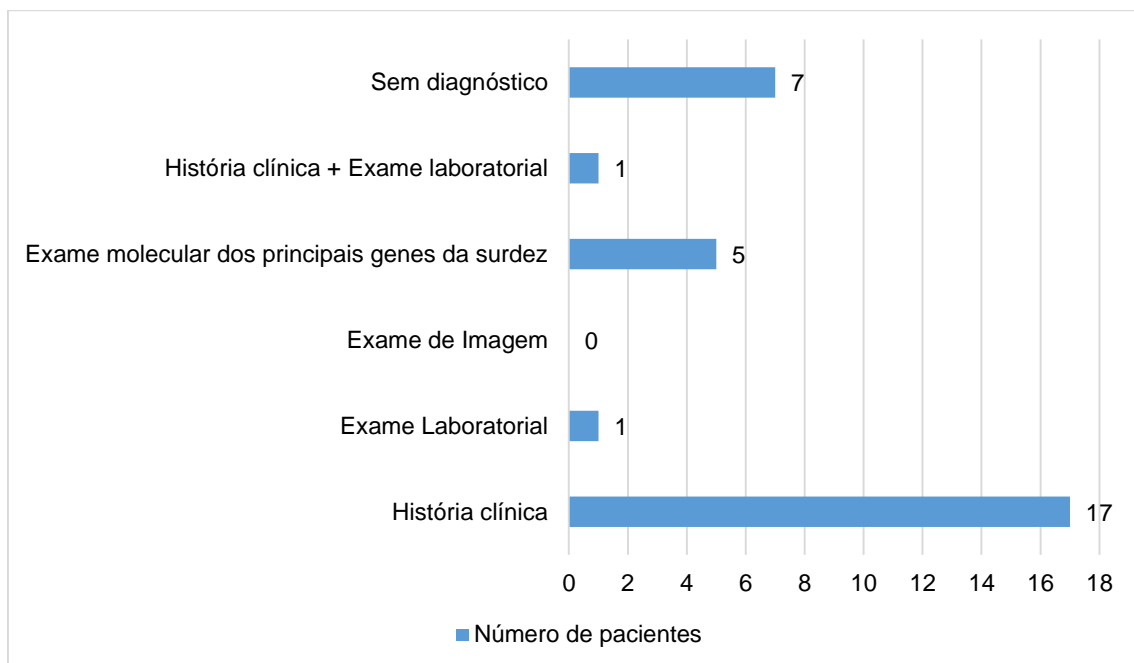


Figura 22-Gráfico relação pacientes do estudo e o meio utilizado para o diagnóstico da etiologia da perda auditiva.

5.11. Correlação meios diagnósticos para investigação etiológica e fator de risco

Para os pacientes com fator de risco (n=19) somente a história clínica seria suficiente para o diagnóstico em 89% dos casos (n=17), o exame laboratorial apresentaria um rendimento de 5% (n=1) e ambos em conjunto definiriam 5% dos casos (n=1) (Figura 23).

Ao considerar os pacientes sem fatores de risco (n=12), 42% (n=5) apresentariam diagnóstico com o exame molecular para os genes da surdez (Figura 23).

Através do teste de Qui-Quadrado foi possível medir o grau de relação meio diagnóstico e o fato de ter ou não o fator de risco. A história clínica foi o meio significativo para aqueles que tinham fator de risco para perda auditiva.

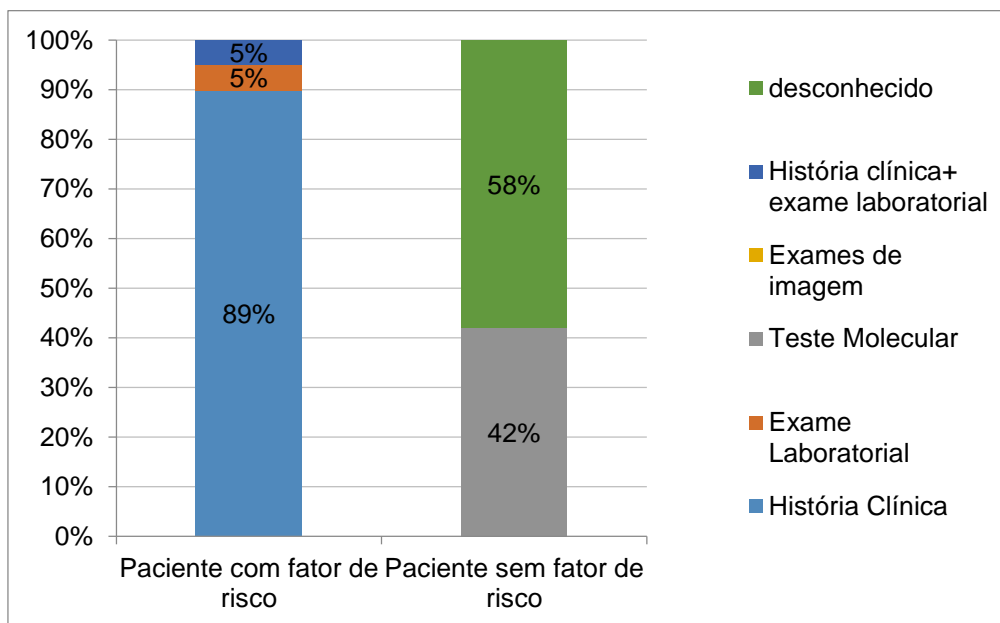


Figura 23- Gráfico correlação meios diagnósticos e pacientes com ou sem fator de risco.

6. DISCUSSÃO

A prevalência da perda auditiva neurosensorial, durante os 12 anos deste estudo, foi de 1,2 a cada mil recém-nascidos. No Brasil, em 2007, Tiensoli e colaboradores encontraram 1,8% de perda auditiva neurosensorial em 798 neonatos; Bevilacqua e colaboradores, em 2010, 0,98 a cada mil neonatos (4,172). Em um estudo de revisão sobre triagem auditiva no Brasil, a prevalência da perda auditiva foi mencionada de 0 a 1,09% (173). A incidência da perda auditiva varia de acordo com as amostras e regiões estudadas.

Os fatores de risco mais encontrados neste estudo foram: permanência na UTI neonatal (32,2%), história familiar (29%) e prematuridade (19,4%).

No presente estudo as frequências destes fatores de risco são altos, provavelmente pelo fato da maternidade onde é realizada a triagem ser considerada um serviço de saúde de alta complexidade, com UTI neonatal e que é referência para os casos graves da região. A história familiar foi o segundo fator de risco mais verificado, 29% dos pacientes. Nos estudos brasileiros com neonatos encontram-se índices de 12,5% a 20% de história familiar entre os portadores de perda auditiva (172,174). Nos estudos internacionais 5,5% a 18% (144,145,175,176). Uma hipótese para esta alta incidência neste estudo talvez se deva a uma maior investigação do histórico familiar.

A causa desconhecida foi verificada em 22,6% dos casos. Na literatura encontra-se uma prevalência de 15% a 52% (7,15,28,144,149,177-181). Acredita-se a incidência menor da causa desconhecida neste estudo se deva ao fato da possibilidade da realização de todos os exames, mas principalmente os teste moleculares para os principais genes da surdez.

A causa ambiental neste estudo representou 22,5% dos pacientes. Considerou-se neste grupo pacientes com fatores de risco pré e perinatais que não tenham histórico familiar de perda auditiva e consanguinidade. Os estudos mostram valores entre 21 a 39,6% (15,149,178,179). Menciona-se um estudo brasileiro com 8 neonatos de UTI portadores de perda auditiva que realizaram exame molecular para os principais genes da surdez. Todos os neonatos da pesquisa apresentaram causa exclusivamente ambiental, sem nenhum fator genético associado (55).

O grupo causa ambiental é constituído de seis pacientes portadores de causas perinatais e um paciente com história de sífilis congênita, cuja perda é unilateral de grau moderadamente severo. Os demais apresentam perda uni ou bilateral em vários graus. Os pacientes com causas perinatais podem apresentar graus diferentes de perda auditiva pelo fato de serem submetidos aos diferentes tipos de injúrias, como hipóxia e anóxia, desordens metabólicas, prematuridade, hiperbilirrubinemia, infecções, medicamentos ototóxicos, ruídos da UTI neonatal acrescido de susceptibilidade individual (50).

A causa genética foi encontrada em 16,1% dos indivíduos deste estudo e estes não apresentavam fatores de risco prévios para a perda auditiva. Todos possuíam perda auditiva bilateral de grau profundo. A alteração genética encontrada foi a mutação c.35delG no gene *GJB2*.

O gene *GJB2* é o principal gene envolvido nas perdas auditivas hereditárias não sindrômicas, sendo a mutação c.35delG a mais frequente em diferentes populações (73,74).

Pacientes homocigotos para c.35delG geralmente apresentam perda auditiva pré-lingual, de grau severo a profundo, não progressiva (80,183). Tendo em vista a importância e o envolvimento desse gene na deficiência auditiva, mutações no gene *GJB2* constituem o primeiro passo na triagem de mutações relacionadas à perda auditiva.

A perda chamada de não esclarecida neste estudo é constituída de 22,6% de pacientes (n=7) com fatores para perda auditiva como história familiar e/ ou consanguinidade, fatores estes de origem não ambiental, mas que não podem ser totalmente comprovados. Dos sete pacientes, apenas um (3,2%) tinha como único fator de risco consanguinidade (primos de primeiro grau) como provável explicação para perda auditiva. Outros dois pacientes com história de consanguinidade apresentavam outros fatores ambientais que poderiam também justificar a perda auditiva.

No Oriente Médio, onde os casamentos consanguíneos são muito comuns, menciona-se prevalência entre 20 a 25% (150). Nos estudos brasileiros encontram-se índices de 1,3 a 5,84% (8,9,28). Não há um padrão audiológico específico na literatura para a consanguinidade, mas os casamentos consanguíneos predisõem a doenças

de origem recessiva, que no caso da surdez, geralmente apresenta um padrão de perda severa a profunda, bilateral e pré-lingual (148). No presente estudo, história familiar como único fator de risco foi verificada em 19,3% dos pacientes, na literatura sua frequência é relatada entre 5,55% e 18% (144,145,175,176,178).

Um estudo, avaliando somente o fator de risco história familiar com recém-nascidos com perda auditiva já diagnosticados na triagem auditiva neonatal demonstrou que os graus de perda estavam distribuídos igualmente entre os graus de leve a profundo. Por outro lado as crianças que possuíam esse fator, mas que desenvolveram a perda auditiva pós-natal, os casos eram predominantemente de grau leve (146). O JCIH, em suas recomendações, orienta o acompanhamento audiológico dos pacientes que possuem o fator de risco história familiar.

O grupo constituído de fatores múltiplos (ambiental e não ambiental) para a perda auditiva representou 16,1% neste estudo, quatro pacientes tinham perda auditiva bilateral e um unilateral, 80% são grau profundo. Um estudo também presumiu que 17% das causas das perdas auditivas tratavam-se de causa constituída de vários fatores etiológicos (177).

Em relação aos meios diagnósticos, em 55% dos casos seria possível o diagnóstico etiológico avaliando a história clínica e fatores de risco. Billings e Ohlms consideram primordial para início da investigação etiológica a história clínica e o exame físico completos (144,183).

O exame molecular contribuiu em 16,1% da população deste estudo para o diagnóstico etiológico; os cinco pacientes com mutação *GJB2* não possuíam nenhum fator de risco para a perda auditiva. Deste modo dos 12 pacientes sem fatores de risco, o exame contribuiu para o diagnóstico de 41,6%. O exame genético, principalmente em relação as mutações no gene *GJB2*, apresenta um alto rendimento de diagnóstico e muitas vezes possuem indicação de investigação etiológica em casos de perda auditiva isolada (184,185).

Quanto aos testes laboratoriais para investigação das TORCHS (Toxoplasmose, Rubéola, CMV, Herpes e Sífilis) é recomendado a realização destes exames uma vez que pode se perder a possibilidade de tratar os pacientes, como por exemplo a sífilis e o CMV (144,183). Neste estudo o exame laboratorial diagnosticou o paciente portador da sífilis e de citomegalovírus. O paciente portador de sífilis teve

o tratamento intraútero e também após o nascimento. O paciente portador da CMV não fez tratamento.

Em relação ao exame de imagem, Billings considerou a TC em seu estudo como o exame com maior rendimento, 26%, para o diagnóstico. Ohlms encontrou 25% de anormalidade na sua casuística, e Mafong 39% (144,183,186). No presente estudo, o exame de imagem não colaborou para o diagnóstico.

Este estudo apresenta algumas limitações como o número de participantes uma vez que nem todos participaram do estudo por não comparecerem com os pedidos solicitados ou na coleta do sangue para o exame genético.

Outro fato é que tendo em vista o grande número de genes envolvidos na perda auditiva, é possível que nos grupos das causas desconhecidas e não esclarecidas existam pacientes com etiologia genética, que poderiam ser identificados com um rastreamento molecular mais abrangente. Contudo os testes moleculares ainda apresentam alto custo e não são realizados rotineiramente na prática clínica médica.

7. CONCLUSÃO

No programa de TANU de uma cidade do estado de São Paulo foi possível encontrar após a identificação dos fatores de risco e exames realizados neste estudo as etiologias: ambiental em 22,6% dos casos, genético em 16,1%, causa de múltiplos fatores em 16,1%, causa não esclarecida, onde há presença de fatores hereditários, em 22,6% e causa desconhecida em 22,6%.

Os fatores de risco mais verificados nestes pacientes foram: permanência em UTI, história familiar de perda auditiva e prematuridade.

Para a etiologia genética a caracterização audiológica (lateralidade e grau) da perda auditiva pela mutação c.35delG foi de acordo com o esperado, ou seja, bilateral de grau profundo, mas nas demais categorias não foi possível observar um padrão característico.

Ao longo deste 12 anos do Programa de TANU da cidade de Jundiaí a frequência de perda auditiva neurossensorial encontrada foi de 1,2 a cada mil recém-nascidos.

A história clínica possibilitaria o diagnóstico em mais da metade da casuística, com significância para aqueles que possuem fatores de risco, porém ao considerar os pacientes sem fatores de risco o exame molecular identificou 42% a causa da perda auditiva. O rastreamento molecular dos demais genes responsáveis pela surdez não sindrômica podem contribuir para o diagnóstico etiológico.

8. REFERÊNCIAS

1. American Academy of Pediatrics, Task Force on Newborn and Infant Hearing. Newborn and infant hearing loss: detection and intervention. *Pediatrics*. 1999;103(2):527–530.
2. Dodson KM, Georgolios A, Barr N, Nguyen B, Sismanis A, Arnos KS, et al. Etiology of unilateral hearing loss in a national hereditary deafness repository. *Am J Otolaryngol Head Neck Med Surg*. 2012;33(5):590–4.
3. Mehra S, Eavey RD, Keamy DG. The epidemiology of hearing impairment in the United States: Newborns, children, and adolescents. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;140(4):461–72.
4. Bevilacqua MC, Alvarenga KDF, Costa OA, Moret ALM. The universal newborn hearing screening in Brazil: From identification to intervention. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2010;74(5):510–5.
5. JCIH. Year 2007 Position Statement: Principles and Guidelines for Early Hearing Detection and Intervention Programs. *Pediatrics*. 2007;120:898-921.
6. Lewis DR, Marone SAM, Mendes BCA, Cruz OLM, de Nóbrega M. Multiprofessional committee on auditory health - COMUSA. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76(1):121–8.
7. Dahl HHM, Ching TYC, Hutchison W, Hou S, Seeto M, Sjahalam-King J. Etiology and Audiological Outcomes at 3 Years for 364 Children in Australia. *PLoS One*. 2013;8(3).
8. Butugan O, Santoro PP, de Almeida ER, da Silveira JAM, Grasel SS. Early diagnosis of hearing loss in high-risk infants using auditory brainstem respons. *Pediatrics*. 2000;22:115-122.
9. Lima AS, Salles AMM, Barreto AP. Congenital and acquired deafness in childhood. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2000;66(5):486-92.
10. Cecatto SB, Garcia RID, Costa KS, Abdo TRT, Rezende CEB, Rapoport PB. Analysis of the main etiology of hearing loss at “Escola Especial Anne Sullivan”. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2003;69(2):235-240.
11. Smith RJH, Bale JF, White KR. Sensorineural hearing loss in children. *Lancet*. 2005;365(9462):879–90.
12. Rehm HL. A genetic approach to the child with sensorineural hearing loss. *Semin Perinatol*. 2005;29(3):173–81.

13. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*. 1997; 378:80–3.
14. Denoyelle F, Lina-Granade G, Plauchu H, Bruzzone R, Chaib H, Levi-Acobas F, et al. Connexin 26 gene linked to a dominant deafness [letter]. *Nature*. 1998; 393:319-320.
15. Riga M, Psarommatis I, Lyra C, Douniadakis D, Tsakanikos M, Neou P, et al. Etiological diagnosis of bilateral, sensorineural hearing impairment in a pediatric Greek population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2005; 69(4): 449–55.
16. Morzaria S, Westerberg BD, Kozak FK. Systematic review of the etiology of bilateral sensorineural hearing loss in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2004;68(9):1193–8.
17. Gruss I, Berlin M, Greenstein T, Yagil Y, Beiser M. Etiologies of hearing impairment among infants and toddlers: 1986-1987 versus 2001. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007;71(10):1585–9.
18. Baroch K. Universal newborn hearing screening: fine-tuning the process. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;424–7.
19. US Preventive Services Task Force. Universal Screening for Hearing Loss in Newborns: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Pediatrics*. 2008;122(1):143–8.
20. Munhoz MSL, da Silva MLG, Frazza MM, Caovilla HH, Ganança MM, Carvalho P. Otoemissões Acústicas. “In”: Munhoz MSL, Caovilla HH, da Silva MLG, Ganança MM. *Audiologia Clínica*. São Paulo. Editora Atheneu. 2003, p121-48, série Otoneurológica.
21. Suppiej A, Rizzardi E, Zanardo V, Franzoi M, Ermani M, Orzan E. Reliability of hearing screening in high-risk neonates: comparative study of otoacoustic emission, automated and conventional auditory brainstem response. *Clin Neurophysiol*. 2007;118(4):869–76.
22. Munhoz MSL, Silva MLGS, Caovilla HH, Ganança MM, Frazza MM. Neuroanatomofisiologia da Audição. “In”: Munhoz MSL, Caovilla HH, da Silva MLG, Ganança MM. *Audiologia Clínica*. São Paulo. Editora Atheneu. 2003, p19-43, série Otoneurológica.
23. Lépori LR. *Miniatlas Vertigem*. 2005. São Paulo. Editora Soriak.

24. Miniti A, Bento RF, Butugan O. Otorrinolaringologia Clínica e Cirúrgica. Embriologia, Anatomia e Fisiologia do Ouvido. Segunda edição. São Paulo. Editora Atheneu.2001, p 83-100.
25. Ilustrações retiradas do site: < <https://audiology.wordpress.com>>
26. World Health Organization (2012). Deafness and hearing loss. Fact Sheet nº 300. Update March 2015. <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en>. Acessado 24 de julho de 2015.
27. Oliveira P, Castro F. Childhood hearing impairment. Braz J Otorhinolaryngol. 2002;68(3):417–23.
28. Nobrega M, Weckx LLM, Juliano Y. Study of the hearing loss in children and adolescents, comparing the periods of 1990-1994 and 1994-2000. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2005; 69: 829-838.
29. Banatvala JE, Brown DWG. Rubella. Lancet. 2004; 363(9415):1127–37.
30. Best JM. Rubella. Semim Fetal Neonatal Med. 2007; 12: 182e192
31. Roizen NJ. Etiology of Hearing Loss in Children. Pediatr Clin North Am. 1999; 46(1):49-64.
32. Lanzieri TM, Pinto D, Prevots D R. Impacto da vacinação contra rubéola na ocorrência da síndrome da rubéola congênita. J Pediatr. (Rio J). 2007; 83(5):415-421.
33. Westerberg BD, Atashband S, Kozak FK. A systematic review of the incidence of sensorineural hearing loss in neonates exposed to Herpes simplex virus. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2008; 72(7):931-37.
34. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretrizes para o controle da sífilis congênita. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/>>Acessado em 03 de julho de 2015.
35. De Santis M, De Luca C, Mappa I, Spagnuolo T, Licameli A, Straface G, et al. Syphilis Infection during pregnancy: fetal risks and clinical management. Infec Dis Obstet Gynecol. 2012; article ID430585, 5 pages.
36. Gleich LL, Urbina M, Pincus RL. Asymptomatic congenital syphilis and auditory brainstem response. Int J Pediatr Otorhinolaryngol.1994; 30 (1):11-13.
37. Chau J, Atashband S, Chang E, Westerberg BD, Kozak FK. A systematic review of pediatric sensorineural hearing loss in congenital syphilis. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2009; 73(6): 787-792.

38. Ministério da saúde (BR), Secretaria de atenção à saúde. Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde. Toxoplasmose Congênita. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/>. Acessado em 03 de julho de 2015.
39. Wilson CB, Remington JS, Stagno S, Reynolds DW. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital Toxoplasma infection. *Pediatrics*. 1980;66(5):767–74.
40. McLeod R, Boyer K, Karrison T, Kasza K, Swisher C, Roizen N, et al. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study. *Clin Infect Dis*. 2006;42(10):1383–94.
41. Andrade GM, Resende LM, Goulart EM, Siqueira AL, Vitor RWA, Januario JN. Hearing loss in congenital toxoplasmosis detected by newborn screening. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008; 74(1): 21-28.
42. Ministério da Saúde (BR), Secretária de atenção à saúde. Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde. Infecção pelo Citomegalovírus. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível: em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/> . Acessado em 03 de julho de 2015.
43. Foulon I, Nassens A, Foulon W, Casteels A, Gordts F, et al. A 10-year prospective study of sensorial hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*, 2008;153(1): 84-88.
44. Fowler KB, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *J Clin Virol*. 2006;35(2):226–31.
45. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Isaac M de L, Amaral FR, Carneiro CG, Aragon DC, et al. Congenital cytomegalovirus infection as a cause of sensorineural hearing loss in a highly immune population. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(12):1043–6.
46. Liesbeth R, Christian D, Frans D, Ermelinde R. Hearing Status in children with congenital cytomegalovirus: Up-to-6-years audiological follow-up. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2011; 75(3):376-382.
47. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de vigilância em saúde, Programa Nacional de DST e AIDS. Protocolo para prevenção de transmissão vertical de HIV e Sífilis. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

48. Palacios GC, Montalvo MS, Fraire MI, Leon E, Alvarez MT, Solorzano F. Audiologic and vestibular findings in a sample of Human Immunodeficiency Virus type-1-infected Mexican children under Highly Active Antiretroviral Therapy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2008;72(11):1671–81.
49. Christopher N, Edward T, Sabrina BK, Agnes N. The prevalence of hearing impairment in the 6 months-5 years HIV/AIDS-positive patients attending paediatric infectious disease clinic at Mulago Hospital. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2013;77(2): 262-5.
50. Núñez-Batalla F, Trinidad-Ramos G, Sequí-Canet JM, Alzina De Aguilar V, Jáudenes-Casabón C. Risk factors for sensorineural hearing loss in children. *Acta Otorrinolaringol.* 2012;63(5):382–90.
51. Uchôa NT, Procianoy RS, Lavinsky L, Sleifer P. Prevalence of hearing loss in very low birth weight neonates. *J Pediatr (Rio J).* 2003;79 (2):123–8.
52. Pereira PKS, Martins ADS, Vieira MR, Azevedo MF De. Programa de triagem auditiva neonatal: associação entre perda auditiva e fatores de risco. *Pró-Fono Rev Atual Cient.* 2007;19(3):267–78.
53. Martínez-Cruz CF, Poblano A, Fernández-Carrocer LA. Risk factors associated with sensorineural hearing loss in infants at the neonatal intensive care unit: 15-year experience at the National Institute of Perinatology (Mexico City). *Arch Med Res.* 2008;39(7):686–94.
54. Robertson CMT, Howarth TM, Bork DLR, Dinu IA. Permanent bilateral sensory and neural hearing loss of children after neonatal intensive care because of extreme prematurity: a thirty-year study. *Pediatrics.* 2009;123(5):e797–807.
55. Coenraad S, Goedegebure A, van Goudoever JB, Hoeve LJ. Risk factors for sensorineural hearing loss in NICU infants compared to normal hearing NICU controls. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2010;74(9):999–1002.
56. Colella-Santos MF, Françoço MFC, do Couto CM, Lima MCMP, Tazinazzio TG, Castilho AM, et al. Audiological and genetics studies in high-risk infants. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2011;77(6):784–90.
57. Dennery PA, Seidman DS, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia. *N Engl J Med.* 2001; 344(8):581-590.
58. Olds C, Oghalai JS. Audiologic impairment associated with bilirubin-induced neurologic damage. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2015;20(1):42–6.

59. Rance G. Auditory neuropathy/dys-synchrony and its perceptual consequences. *Trends Amplif.* 2005;9(1):1–43.
60. Oysu C, Aslan I, Ulubil A, Baserer N. Incidence of cochlear involvement in hyperbilirubinemic deafness. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002;111(11):1021–5.
61. Singh KB, Gupta AK, Mann SBS, Narang A. Comparative ABR profile in high risk infants. *Auris Nasus Larynx.* 1998;25(2):143–8.
62. Wong V, Chen WX, Wong KY. Short- and long-term outcome of severe neonatal nonhemolytic hyperbilirubinemia. *J Child Neurol.* 2006; 21(4):309–15.
63. Sennaroglu L. Cochlear implantation in inner ear malformations - a review article. *Cochlear Implants Int.* 2010;11(1):4–41.
64. Chen JL, Gittleman A, Barnes PD, Chang KW. Utility of temporal bone computed tomographic measurements in the evaluation of inner ear malformations. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 134(1):50-6.
65. Bamiou DE, Savy L, O'Mahoney CO, Phelps P, Sirimanna T. Unilateral sensorineural hearing loss and its aetiology in childhood: the contribution of computerised tomography in aetiological diagnosis and management. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1999; 51(2):91-9.
66. Pinto JA, Mello Junior CF, Marqui ACS, Perfeito DJ, Ferreira RDP, Silva RH. Enlarged vestibular aqueduct syndrome: report of 3 cases and literature review. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2005; 71 (3):386-391.
67. Madden C, Halsted M, Benton C, Greinwald J, Choo D. Enlarged vestibular aqueduct syndrome in the pediatric population. *Otol Neurotol.* 2003; 24 (4):625–632.
68. Albert S, Blons H, Jonard L, Feldmann D, Chauvin P, Loundon N, et al. SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian population. *Eur J Hum Genet.* 2006;14 (6):773-9.
69. Masuda S, Usui S, Matsunaga T. High prevalence of inner-ear and/or internal auditory canal malformations in children with unilateral sensorineural hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2013;77 (2):228-32.
70. Kenna MA, Wu BL, Cotanche DA, Korf BR, Rehm HL. Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001; 127:1037-1042.

71. Lefebvre PP, Van De Water TR. Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain Res Rev.* 2002; 32:159-162.
72. Ilustração de:
(https://commons.wikimedia.org/File:Connexon_and_connexin_structure.svg).
Acessado 15 de julho de 2015.
73. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brøndum-Nielsen K, et al. High frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic analysis consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet.* 2000; 8(1):19-23.
74. Chan DK, Chang KW. GJB2-Associated hearing loss: systematic review of worldwide prevalence, genotype and auditory phenotype. *Laryngoscope.* 2014; 124: E34-E53.
75. Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth LG, Friderici K, Fisher R, et al. Mutation in the connexin 26 gene (GJB2) among ashkenazi jews with nonsyndromic recessive deafness. *New Engl J Med.* 1998; 339 (21): 1500-5.
76. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Linch NJ, Allen-Powell DR, et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet.* 1997; 6 (12): 2173-7.
77. Reardon W. Connexin 26 gene mutation and autosomal recessive deafness. *Lancet.* 1998; 351(9100): 383-4.
78. Picciotti PM, Pietrobono R, Neri G, Paludetti G, Fetoni AR, Cianfrone F, Pomponi MG. Correlation between GJB2 mutations and audiological deficits: personal experience. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009; 266 (4):489–494.
79. Hişmi BO, Yilmaz ST, Incesulu A, Tekin M. Effects of GJB2 genotypes on the audiological phenotype: variability is present for all genotypes. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2006; 70 (10):1687–1694.
80. Denoyelle F, Marlin S, Weil D, Moatti L, Chauvin P, Garabédian EN. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin- 26 gene defect: implications for genetic counseling. *Lancet.* 1999; 353(9161):1298–1303.
81. Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC, Smith RJH. Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *JAMA* 1999; 281(23):2211–6.

82. Shahin H, Walsh T, Sobe T, Lynch E, King MC, Avraham KB, Kanaan M. Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East. *Hum Genet.* 2002; 110(3):284–9.
83. Cryns K, Orzan E, Murgia A, Huygen PLM, Moreno F, del Castillo I, et al. A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin26) deafness. *J Med Genet.* 2004; 41(3):147-154.
84. Shubina- Oleinik O, Siniauskaya M, Merkulava E, Levaya-Smaliak L, Davydenko O, Danilenko N. When should one look for IVS1 +1G>A splice mutation in patients with nonsyndromic sensorineural hearing loss? *J Hear Sci.* 2014;4(2): 24-9.
85. Lautermann J, ten Cate WJ, Altenhoff P, Grummer R, Traub O, Jahnke K, Winterhager E. Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea. *Cell Tissue Res.* 1998; 294(3):415–420.
86. Lerer I, Sagi M, Ben-Neriah Z, Wang T, Levi H, Abeliovich D. A deletion mutation in *GJB6* cooperating with a *GJB2* mutation in *trans* in non-syndromic deafness: a novel founder mutation in Ashkenazi Jews. *Hum Mut.* 2001; 18(5):460–9.
87. Del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Álvarez A, Telleria D, et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med.* 2002; 346 (4):243–9.
88. Del Castillo FJ, Rodríguez- Ballasteros M, Alvares A, Hutchin T, Leonardi E, de Oliveira CA, et al. A novel deletion involving the connexin 30 gene del(GJB6-D13S1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin 26) in subjects with DFNB1 nonsyndromic hearing impairment. *J Med Genet.* 2005; 42(7):588-94.
89. Marlin S, Feldmann D, Blons H, Loundon N, Rouillon I, Albert S, et al. *GJB2* and *GJB6* Mutations. Genotypic and phenotypic correlations in a large cohort of hearing-impaired patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 131 (6):481-7.
90. Loeza-Becerra F, Rivera-Vega Mdel R, Martínez-Saucedo M, Gonzalez-Huerta LM, Urueta-Cuella H, Berruecos-Villalobos P, et al. Particular distribution of the GJB2/GJB6 gene mutation in Mexican population with hearing impairment. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2014; 78(7):1057-1060.

91. Rodrigues-Paris J, Schrijver I. The digenic hypothesis unraveled: the GJB6 del(GJB6- D13S1830) mutation causes allele-specific loss of GJB2 expression in cis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 389 (2):354-9.
92. Rodriguez-Paris J, Tamayo ML, Gelvez N, Schrijver I. Allele-specific impairment of GJB2 expression by GJB6 deletion del(GJB6-D13S1854). *PLoS ONE* 2011;6 (6):e21665
93. Fischel-Ghodsian N, Kopke RD, Ge X. Mitochondrial dysfunction in hearing loss. *Mitochondrion*.2004; 4(5-6):675-694.
94. Li XC, Friedman RA. Nonsyndromic hereditary hearing loss. *Otolaryngol Clin N Am*.2002, 35(2):275-285.
95. Bindu L H, Reddy PP. Genetics of aminoglycoside-induced and prelingual non-syndromic mitochondrial hearing impairment: a review. *Int J Audiol*. 2008; 47(11):702-7.
96. Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qui WQ, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet*. 1993; 4 (3):289-294.
97. Usami SI, Abe S, Akita J, Namba A, Shinkawa H, Ishii M, et al. Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients. *J Med Genet*. 2000; 37(1): 38-40.
98. Li Z, Li R, Chen J, Liao Z, Zhu Y, Qian Y, et al. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside induced and non syndromic hearing loss. *Hum Genet*. 2005; 117 (1): 9-15.
99. Yu Qi, Zhang Y, Wang Z, Yang Y, Yuan Y, Niu S, et al. Screening of common mitochondrial mutations in Chinese patients with mitochondrial encephalomyopathies. *Mitochondrion*. 2007; 7 (1-2):147-150.
100. Lopez-Bigas N, Rabionet R, Martinez E, Bravo O, Girons J, Borruga A, et al. Mutations in the mitochondrial tRNA Ser(UCN) and in the GJB2 (connexin 26) gene are not modifiers of the age of onset or severity of hearing loss in Spanish patients with the 12S rRNA A1555G mutation. *Am J Hum Genet*. 2000; 66(4):1465-67.
101. Kokotas H, Petersen MB, Willems PJ. Mitochondrial deafness. *Clin Genet*. 2007; 71(5):379-91.

102. Usami S, Abe S, Kasai M, Shinkawa H, Moeller B, Kenyon JB, et al. Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. *Laryngoscope*. 1997; 107(4):483–490.
103. Noguchi Y, Yashima T, Ito T, Sumi T, Tsuzuku T, Kitamura K. Audiological findings in patients with mitochondrial A1555G mutation. *Laryngoscope*. 2004; 114(2):344-8.
104. Li R, Grienwald JH, Yang L, Choo DI, Wenstrup RJ, Guan MX. Molecular analysis of mitochondrial 12S rRNA and tRNA Ser(UCN) genes in pediatric subjects with non-syndromic hearing loss. *J Med Genet*. 2004; 41(8): 615-620.
105. Ibekwe TS, Bhimrao SK, Westerberg BD, Kozak FK. A meta-analysis and systematic review of the prevalence of mitochondrially encoded 12S RNA in the general population: Is there a role for screening neonates requiring aminoglycosides? *Afr J Paediatr Surg* 2015; 12(2):105-13.
106. Xing G, Chen Z, Wei Q, Tian H, Li X, Zhou A, et al. Maternally inherited non-syndromic hearing loss associated with mitochondrial 12S rRNA A827G mutation in a Chinese Family. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 344(4):1253-7.
107. Yano T, Nishio S, Usami S; the Deafness Gene Study Consortium. Frequency of mitochondrial mutations in non-syndromic hearing loss as well as possibly responsible variants found by whole mitochondrial genome screening. *J Hum Genet*. 2014; 59(2):100-6.
108. Sartorato EL, Gottardi E, de Oliveira CA, Magna LA, Annichino-Bizzacchi JM, Seixas CA, et al. Determination of the frequency of 35delG allele in Brazilian neonates. *Clin Genet*. 2000;58 (4): 339-340.
109. Oliveira CA, Maciel-Guerra AT, Sartorato EL. Deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin26) gene in Brazilian patients. *Clin Genet*. 2002;61(5): 354–8.
110. 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. *Am J Hum Genet*. 2003;73(6):1452-8.
111. Pfeilsticker LN, Stole G, Sartorato EL, Delfino D, Maciel Guerra AT. Genetic investigation of non-syndromic hereditary deafness. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2004; 70(2):182-6.

112. Piatto VB, Bertollo EMG, Sartorato EL, Maniglia JV. Prevalence of the GJB2 mutations and the del(GJB6-D13S1830) mutation in Brazilian patients with deafness. *Hear Res.* 2004, 196(1-2):87-93.
113. 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 (Rio J)*. 2005; 81(2):139-42.
114. Nivoloni KAB, da Silva- Costa SM, Pomílio MCA, Pereira T, Lopes K de C, de Moraes VCS, et al. Newborn hearing screening and genetic testing in 8974 Brazilian neonates. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.*2010; 74(8): 926-9.
115. Bernardes R, Bortoncello S, Christiani TV, Sartorato EL, César e Silva R, Porto PRC. Molecular investigation in children candidates and submitted to cochlear implantation. *Braz J Otorhinolaryngol.*2006;72(3):333-6.
116. Christiani TV, Alexandrino F, de Oliveira CA, Amantini RCB, Bevilacqua MC, Filho AO, et al. Molecular Study in Brazilian Cochlear Implant Recipients. *AM J Med Genet Part A.* 2007;143A(14):1580-2.
117. da Motta LHC, Félix TM, de Souza LT, Lavisnky-Wolff M, Costa-Motta FM, et al. Prevalence of the 35delG mutation in deaf South Brazilian infants submitted to cochlear implantation. *Int J of Pediatr Otorhinolaryngol.* 2012;76(2):287-290.
118. 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):1-3.
119. Cordeiro-Silva MF, Barbosa A, Santiago M, Provetti M, Rabbit-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(4):428-32.
120. Castro LSS, Marinho ANR, Rodrigues EMR, Marques GCT, Carvalho TAA, da Silva LCS 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(1):95-9.
121. Maniglia LP, Moreira BCL, Silva MAOM, Piatto VB, Maniglia JV. Screening of the mitochondrial A1555G mutation in patients with sensorineural hearing loss. *Braz J Otorhinolaryngol.*2008;74(5):731-6.

122. Pupo AC, Pirana S, Spinelli M, Lezirovitz K, Netto RCM, Macedo LS. Study of a Brazilian Family Presenting Non-syndromic hearing loss with mitochondrial inheritance. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2008; 74(5):786-9.
123. Batisso AC, Abreu-Silva RS, Braga MCC, Lezirovitz K, Della-Rosa V, Alfredo Jr T, 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):1-7.
124. Esteves MCB, de Lima Isaac M, Francisco AM, da Silva Junior WA, Ferreira CA, Dell'Aringa AHB. Analysis of the presence of the GJB6 mutations in patients heterozygous for GJB2 mutation in Brazil. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2014; 271(4):695-9.
125. de Moraes VCS, dos Santos NZP, Ramos PZ, Svidnicki MCCM, Castilho AM, Sartorato EL. Molecular analysis of SLC26A4 gene in patients with nonsyndromic hearing loss and EVA: Identification of two novel mutation in Brazilian patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2013;77(3):410-13.
126. Abreu-Silva RS, Rincon D, Horimoto ARVR, Sguillar AP, Ricardo LAC, Kimura L, et al. The search of genetic basis for noise-induced hearing loss (NIHL). *Ann Hum Biol.* 2011; 38(2):210-8.
127. Nakaya K, Harbidge DG, Wangemann P, Schultz BD, Green ED, Wall SM, et al. Lack of pendrin HCO₃⁻ transport elevates vestibular endolymphatic [Ca²⁺] by inhibition of acid-sensitive TRPV5 and TRPV6 channels. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 292(5):1314–21.
128. Duman D, Tekin M. Autosomal recessive nonsyndromic deafness genes: a review. *Front Biosci.* 2012; 17:2213-36.
129. Roux I, Safieddine S, Nouvian R, Grati M, Simmler MC, Bahloul A, et al., Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell.* 2006; 127(2):277–289.
130. Rodrigues-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(6):451-6.
131. Najmadabi H, Kahrizi K. Genetics of non-syndromic hearing loss in the Middle East. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2014;78(12):2026-36.
132. Miyagawa M, Nishio S-Y, Hattori M, Moteki H, Kobayashi Y, Sato H. Mutations in the MYO15A gene are a significant cause of nonsyndromic hearing loss:

- massively parallel DNA sequencing-based analysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2015; 124(Suppl 1):158S-168S.
133. Gürtler N, Lalwani AK. Etiology of syndromic and nonsyndromic sensorineural hearing loss. *Otolaryngol Clin N Am.* 2002; 35(4):891-908.
 134. Song J, Feng Y, Acke FR, Coucke P, Vleminckx K, Dhooge IJ. Hearing loss in Waardenburg syndrome: a systematic review. *Clin Genet.* 2016; 89(4):416-425.
 135. Lenarduzzi S, Vozzi D, Morgan A, Rubinato E, D'Eustacchio A, Osland TM. Usher syndrome an effective sequencing approach to establish a genetic and clinical diagnosis. *Hear Res.* 2015; 320:18-23.
 136. Alves FRA, Ribeiro FAQ. Clinical data and hearing of individuals with Alport syndrome. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2008; 74 (6):807-814.
 137. Silva DL, Neto FXP, Carneiro SG, Souza KLC, Souza SS, Palheta ACP. Treacher Collins syndrome: review of the literature. *Intl Arch Otorhinolaryngol.* 2008; 12(1):116-121.
 138. Birman CS, Brew JA, Gibson WP, Elliott EJ. CHARGE syndrome and Cochlear implantation: difficulties and outcomes in the paediatric population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2015; 79(4):487-92.
 139. Starr A, Picton TW, Sininger Y, Hood LJ, Berlin IC. Auditory Neuropathy. *Brain.* 1996; 119(Pt 3):741-753.
 140. Bill Daniels Center of Children's Hearing, Hospital Colorado. Guidelines for Identification and Management of Infants and Young Children with Auditory Neuropathy Spectrum Disorder. 2008 Disponível: <http://www.childrenscolorado.org/health-professionals/clinical-resources/auditory-neuropathy-spectrum-disorder-guidelines> . Acessado julho 2015.
 141. Kaga K. Auditory nerve disease and auditory neuropathy spectrum disorders. *Auris Nasus Larynx.* 2016; 43(1):10-20.
 142. Bielecki I, Horbulewics A, Wolan T. Prevalence and risk factors for Auditory Neuropathy Spectrum Disorder in a screened newborn population at risk for hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2012; 76(11):1668-70.
 143. Cone-Wesson B, Vohr BR, Sininger YS, Widen JE, Folsom RC, Gorga MP et al. Identification of neonatal hearing impairment: infants with hearing loss. *Ear Hear.* 2000; 21(5):488-507.

144. Billings KR, Kenna MA. Causes of Pediatric Sensorineural Hearing Loss. Yesterday and Today. Arch Otolaryngol Head Neck Surg.1999; 125 (5):517-521.
145. Walch C, Anderhuber W, Köle W, Berghold A. Bilateral sensorineural hearing disorders in children: etiology of deafness and evaluation of hearing tests. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2000; 53(1):31-8.
146. Driscoll C, Beswick R, Doherty E, D'Silva R, Cross A. The validity of family history as a risk factor in pediatric hearing loss. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2015; 79(5):654-9.
147. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson. Genética Médica. Philadelphia, Saunders,1991, 7th ed., p 119.
148. Shawky RM, Elsayed SM, Zaki ME, EL-Din SMN, Kamal FM. Consanguinity and its relevance to clinical genetics. Egypt J Med Human Genet. 2013; 14(2): 157-64.
149. Levi H, Tell L, Cohen T. Sensorineural hearing loss in Jewish children born in Jerusalem. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2004; 68(10):1245-50.
150. Bener A, ELHakeem AAM, Abdulhadi K. Is there any association between consanguinity and hearing loss. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2005; 69(3):327-33.
151. Girotto G, Mezzavilla M, Abdulhadi K, Vuckovic D, Vozzi D, Alkowar MK et al. Consanguinity and hereditary hearing loss on Qatar. Hum Hered. 2014; 77(1-4):175-82.
152. Joint Committee on Infant Hearing (JCIH). History of the Joint Committee on Infant Hearing. Disponível em: <<http://www.jcih.org/history.htm>>. Acessado 3 de julho de 2015.
153. Joint Committee on Infant Hearing (JCIH), 1973. Position statement 1973. Disponível em: < <http://www.jcih.org/JCIH1973.pdf> >. Acessado em 03 de julho de 2015.
154. Joint Committee on Infant Hearing (JCIH), 1982. Position statement 1982. Disponível em: < <http://www.jcih.org/JCIH1982.pdf> >. Acessado em 03 de julho de 2015.
155. Joint Committee on Infant Hearing (JCIH), 1990. Position statement 1990. Disponível em: < <http://www.jcih.org/JCIH1990.pdf> >. Acessado em 03 de julho de 2015.

156. Kemp DT. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J Acoust Soc Am* 1978; 64(5):1386-91.
157. Kemp DT. Otoacoustic emissions, travelling waves and cochlear mechanisms. *Hear Res* 1986; 22:95-104.
158. National Institutes of Health. Consensus Development Conference Statement. Early identification of hearing impairment in infants and young children. NIH Consensus Statement. 1993; 11(1):1-24.
159. Joint Committee on Infant Hearing (JCIH), 1994. Position statement 1994. Disponível em: < <http://www.jcih.org/JCIH1994.pdf> >. Acessado em 03 de julho de 2015.
160. Joint Committee on Infant Hearing (JCIH), 2000. Position statement 2000. Disponível em: < <http://www.jcih.org/JCIH2000.pdf> >. Acessado em 03 de julho de 2015.
161. Grupo de Apoio a Triagem Auditiva Neonatal (GATANU). Trajetória da Triagem auditiva neonatal no Brasil. Disponível em:
< <http://www.gatanu.org/secoes/gatanu/itens/trajetoria-da-tan-no-brasil>>. Acessado 5 de julho de 2015.
162. Comitê Brasileiro sobre Perdas Auditivas na Infância (CBPAI). Recomendações 01/99 do Comitê Brasileiro sobre Perdas Auditivas na Infância. *J Cons Fed Fonoaudiol*. 2000; 5:3-7.
163. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.073, de 28 de setembro de 2004. Institui a Política Nacional de Atenção à Saúde Auditiva. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.
164. Brasil. Lei nº 12.303, de 2 de agosto de 2010. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Ato2007-2010/2010/Lei/L12303.htm Acessado 5 de julho de 2015.
165. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Diretrizes de Atenção da Triagem Auditiva Neonatal / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas e Departamento de Atenção Especializada. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
166. Northern JL, Downs MP. *Hearing Children*. 3a ed. Williams & Wilkins. Baltimore; 1984.

167. Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de atenção à saúde. Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde. Sífilis Congênita. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/atencao_saude_recem_nascido_v2.pdf. Acessado em 03 de julho de 2015.
168. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças Infecciosas e Parasitárias no Brasil. Toxoplasmose. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. Disponível:<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/10001021559.pdf>. Acessado em 03 de julho de 2015.
169. Scott DA; Kraft ML; Carmi R; Ramesh A; Elbedour K; Yairi Y et al. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat.* 1998; 11(5): 387-94.
170. Friedman RA, Bykhovskaya Y, Sue CM, DiMauro S, Bradley R, Fallis-Cuningham R, et al. Maternally inherited nonsyndromic hearing loss. *Am J Med Genet.* 1999; 84 (4):369-72.
171. Iwasaki S, Tamagawa Y, Ocho S, Hoshino T, Kitamura K. Hereditary sensorineural hearing loss of unknown cause involving mitochondrial DNA A1555G mutation. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2000; 62(2):100-3.
172. Tiensoli LO, Goulart LMHF, Resende LM, Colosimo EA. Hearing screening in a public hospital in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil: hearing impairment and risk factors in neonates and infants. *Cad Saúde Pública.* 2007; 23(6):1431-41.
173. Cavalcantia HG, Melo LPF, Buarque LF, Guerra RO. Overview of newborn hearing screening programs in Brazilian maternity hospitals. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2014; 80(4): 346-53.
174. Onoda RM, de Azevedo MF, dos Santos AMN. Neonatal hearing screening: failures, hearing loss and risk indicators. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2011; 77(6): 775-83.
175. Bielecki I, Horbulewicz A, Wolan T. Risk Factors associated with hearing loss in infants: an analysis of 5282 referred neonates. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011; 75(7): 925-30.

176. Ohl C, Dornier L, Czajka C, Chobaut JC, Tavernier L. Newborn hearing screening on infants at risk. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009; 73(12):1691-95.
177. Pupo AC, Baileiro CR, Figueiro RSL. Retrospective study of hearing impaired children and teenager: characterizing the etiologies and audiological aspects. *Rev CEFAC.* 2008; 10(1): 84-91.
178. Declau F, Boudewyns A, Van den Ende JA, Peeters A, Van den Heyning P. Etiologic and audiological evaluations after universal neonatal hearing screening: analysis of 170 referred neonates. *Pediatrics* 2008.121(6): 1119-26.
179. Jakubíková J, Kabátová Z, Pavlovcinová G, Profant M. Newborn hearing screening and strategy for early detection of hearing loss in infants. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009; 73(4):607-12.
180. Lammens F, Verhaert N, Devriendt K, Debruybe F, Desloovere C. Aetiology of congenital hearing loss: A cohort review of 569 subjects. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2013; 77(9) :1385-91.
181. Elziere M, Roman S, Nicollas R, Triglia JM. Value of systematic aetiological investigation in children with sensorineural hearing loss. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2012; 129(4):185-9.
182. Santos RLP , Aulchenko YS, Huygen LM, Van der Donk KP, de Wijs IJ, Martijn H, et al. Hearing impairment in Dutch patients with connexin 26 (GJB2) and connexin 30 (GJB6) mutations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2005; 69(2):165-74.
183. Ohlms LA, Chen AY, Stewart MG, Franklin DJ. Establishing the etiology of childhood hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;120(2):159-63.
184. De Leenheer EMR, Janssens S, Padalko E, Loose D, Leroy BP, Dhooge IJ. Etiological diagnosis in the hearing impaired newborn: proposal of a flow chart. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011; 75(1):27-32.
185. Preciado DA, Lim LHY, Cohen AP, Madden C, Myer D, Ngo C, et al. A diagnostic paradigm for childhood idiopathic sensorineural hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 131(6):804-9.
186. Mafong DD, Shin EJ, Lalwani AK. Use of laboratory evaluation and radiologic imaging in the diagnostic evaluation of children with sensorineural hearing loss. *Laryngoscope.* 2002; 112(1):1-7.

9.ANEXOS



CEP, 21/10/14.
(PARECER CEP: N° 396/2006)

Universidade Estadual de Campinas
Pró-Reitoria de Pesquisa
Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO MOLECULAR DA PERDA AUDITIVA”.


PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Edi Lúcia Sartorato

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) aprovou o adendo que inclui o subprojeto “ESTUDO DA ETOLOGIA DA PERDA AUDITIVA EM LACTENTES”, sob responsabilidade da pesquisadora Kátia Cristina Costa, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/UNICAMP, em 21 de outubro de 2014.


Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO DA ETIOLOGIA DA PERDA AUDITIVA EM LACTENTES

Responsável: Katia Cristina Costa

Número do CAAE:

Você, responsável legal do menor de idade, está sendo convidado a permitir a participação do menor como voluntário de um estudo. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar os direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não permitir a participação do menor poderá retirar sua autorização, a qualquer momento e não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Justificativa e objetivos:

Existem poucos estudos no Brasil sobre as causas das perdas auditivas nos recém nascidos. A identificação destas causas precocemente pode favorecer o tratamento do paciente. Esta pesquisa tem por objetivo o conhecimento das causas das perdas auditivas nos bebês.

Os exames utilizados nesta pesquisa para identificação da perda de audição consiste em exames de sangue e de imagem: tomografia ou ressonância magnética, de acordo com a necessidade. Os exames de sangue solicitados serão aqueles que avaliam se o bebê se contaminou com alguma infecção durante a gravidez da mãe ou durante o parto- chamado de exames sorológicos.

No exame de sangue também será avaliado se o paciente possui algum gene que possa estar envolvido na surdez, chamado de exame genético. Será investigado a pesquisa no gene GJB2 da mutação c 35del G.

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a realizar : coleta de sangue e realização de exames de imagem.

Será colhido 5 ml de sangue por punção venosa, geralmente na veia do antebraço, em uma única vez, não sendo necessário hospitalização. Também serão realizadas as medidas de proteção: limpeza do local a ser coletado o sangue e o uso de material descartável.

Os exames de imagem realizados serão tomografia de ouvidos e dependendo da necessidade a ressonância magnética. Nestes exames pode ser necessária uma sedação venosa ou inalatória, pois as crianças não podem se movimentar durante o exame.

Este exame geralmente é feito em meio hospitalar com a presença de um médico radiologista e de equipamentos de segurança necessários

Desconfortos e riscos:

As amostras de sangue periférico serão obtidas por punção venosa, ou punção na polpa digital, que é um procedimento médico comum, com riscos muito baixos. O risco da coleta de sangue pode incluir vermelhidão local transitória, hematoma, celulite ou flebite. O desconforto será mínimo, pois em geral, esta coleta será realizada pela veia intermédia do cotovelo, por profissional treinado ou pelo

responsável pelo projeto, devidamente habilitados para este procedimento. Serão realizadas as medidas de proteção: limpeza do local a ser coletado o sangue e o uso de material descartável.

A tomografia computadorizada e ressonância magnética não apresentam risco ao paciente, exceto às crianças que necessitem de sedação para realização do exame. Os medicamentos utilizados na sedação para exames radiológicos costumam ser de rápido efeito, mas podem trazer riscos como alergias na pele, tremores, febre, falta de ar, convulsões e até o risco para parada cardiorrespiratória. Contudo, a sedação para tomografia e ou ressonância é realizada em meio hospitalar, na presença de médico radiologista (ou anestesista) e de equipamento de segurança necessários.

Benefícios:

O esclarecimento da causa perda auditiva não é tarefa fácil, em especial em nosso meio. Esse projeto objetiva, não só investigar a causa das perdas auditivas como propor um processo para a realização de exames, visando o diagnóstico correto e redução de custos.

Existe também a necessidade de se associar os testes genéticos, aos já existentes programas de prevenção e diagnóstico precoce da perda auditiva, a fim de se conhecer a magnitude deste problema e dar um passo de alerta à população, aos profissionais da saúde e às autoridades locais. Isto não gera apenas benefícios à população surda e a seus familiares, pois a precocidade do diagnóstico e reabilitação gera grandes reduções no orçamento público.

Acompanhamento e assistência:

Nos casos em que forem detectadas alterações auditivas será instituída a reabilitação auditiva, através da colocação de aparelhos auditivos e do atendimento de equipe multidisciplinar na própria instituição. Diante da necessidade de implante coclear ou de procedimentos não contemplados no serviço, os indivíduos serão encaminhados para serviços de referência.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que a identidade do menor em questão será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, o nome do participante não será citado. Os resultados dos exames serão anexados ao prontuário.

Ressarcimento:

Não haverá nenhum gasto para a pesquisa uma vez que a grande maioria dos exames são realizados na rotina para os bebês com deficiência auditiva pela Instituição que pertence ao SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS).

Em relação ao exame genético, o mesmo é realizado dentro do projeto de pesquisa do Projeto Estudo Molecular da Perda Auditiva (número de consentimento- 396/2006) do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG).

Aconselhamento genético:

Você, responsável pelo menor poderá optar se gostaria ou não de ser informado sobre o resultado genético.

O resultado do exame genético será informado pela pesquisadora, individualmente. Aos pacientes que apresentarem alterações genéticas e a perda auditiva será oferecido todo o tipo de tratamento (aparelho auditivo, implante coclear) assim como o acompanhamento da equipe médica, fonoaudiológica e de psicólogos.

Aos pacientes portadores da condição de perda auditiva, mas que não a possuem será oferecido o acompanhamento médico e audiológico.

Sendo o sujeito da pesquisa deficiente auditivo de origem genética ou portador, seus familiares, genitores ou irmãos poderão, se interessados, em fazer o exame genético.

- () Gostaria de ser informado do resultado genético
 () Não gostaria de ser informado do resultado genético

Armazenamento de material:

Novas mutações para a perda auditiva podem ser encontradas, assim como novos métodos de testagem para a identificação dessas mutações. Deste modo o material genético poderia ser novamente avaliado, se houver sua permissão.

Neste caso, um novo projeto de pesquisa será realizado e submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

- () concordo em permitir o menor sob minha responsabilidade participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.
 () concordo em permitir o menor sob minha responsabilidade participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.
 () concordo em permitir o menor sob minha responsabilidade participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do material biológico, dispensando meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

O descarte do material armazenado será autorizado nas seguintes situações:

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____.
 (nome de uma pessoa a ser contatada).

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com o pesquisadora: Katia Cristina Costa

Endereços: ATEAL- R Frederico Ozanan, 6561, Vila São Rafael – Jundiáí – F: 11- 4523 4110 ou CBMEG- UNICAMP- Av. Cândido Rondon - Cidade Universitária- Campinas- F: 19- 3521 1147.

E mail: k.cristinacosta@bol.com.br

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP: Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito permitir a participação do menor que se encontra sob minha responsabilidade legal:

Nome do (a) participante: _____

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu responsável LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao responsável pelo participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo responsável do participante.

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

Campinas, 06 de janeiro de 2016

Ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas

Como pesquisadora responsável venho através desta solicitar a troca do Título da Pesquisa: " **Estudo da Etiologia da Perda Auditiva em Lactentes**" pelo título "**Etiologia da Perda Auditiva em Neonatos de um programa de Triagem Neonatal**".

Este estudo é um subprojeto aprovado como adendo (CEP/PRP/N ° 690/2014) da linha de pesquisa da Prof. Dra. Edí Lúcia Sartorato (CEP N ° 396/2006), orientadora da pesquisa citada acima.

Desde já grata pela atenção


Katia Cristina Costa

Pesquisadora responsável

