

Jaqueline Medeiros de Mello¹
Valter Augusto Della-Rosa²
Renata Mota Mamede Carvalho³

Emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção em frequências ultra-altas em pais de indivíduos com deficiência auditiva autossômica recessiva

Distortion-product otoacoustic emissions at ultra-high frequencies in parents of individuals with autosomal recessive hearing loss

Descritores

Testes auditivos
Audição
Genética
Mutações

Keywords

Hearing tests
Hearing
Genetics
Mutation

RESUMO

Objetivo: Avaliar a função coclear em pais de indivíduos com deficiência auditiva de herança autossômica recessiva do gene *Gap Junction Beta-2 Protein* por meio das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção (EOA-PD) em frequências ultra-altas, comparando com as respostas de um grupo controle, pareadas por gênero e idade. **Métodos:** Foram avaliados 56 indivíduos, entre 20 a 58 anos de idade, distribuídos em dois grupos. O grupo estudo foi constituído por 28 pais de deficientes auditivos decorrentes de herança autossômica recessiva, sendo 14 mulheres com idade entre 20,0 a 55,0 anos (média 32,8) e 14 homens de 20,0 a 58,0 anos (média 35,2), enquanto o grupo controle era formado por indivíduos sem queixa auditiva, composto por 14 homens e 14 mulheres, com idades pareadas ao grupo estudo. Os indivíduos foram submetidos aos exames de audiometria tonal, imitancimetria e EOA-PD na faixa de frequência de 9.000 a 16.000 Hz. **Resultados:** Foram observados 64,3% de resultados normais das EOA-PD no grupo estudo em comparação a 91,1% no controle. Houve diferença estatisticamente significativa entre as orelhas e grupos nas respostas de EOA-PD, sendo que a média do nível de resposta foi 10 dBNPS no grupo estudo e 14 dBNPS no controle. A correlação de Pearson entre a idade e as EOA-PD em frequências ultra-altas não demonstrou correlação significativa. **Conclusão:** As EOA-PD em frequências ultra-altas foram capazes de distinguir os indivíduos de ambos os grupos, sugerindo que indivíduos heterozigotos para a mutação do gene *GJB2* podem apresentar dano na função coclear antes da manifestação clínica na avaliação audiológica convencional.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the cochlear function of parents of individuals with autosomal recessive gene *Gap Junction Protein Beta-2* hearing loss by ultra-high frequencies distortion-product otoacoustic emissions (DPOAEs), compared with responses of a control group matched for age and gender. **Methods:** We studied 56 subjects aged from 20 to 58 years, divided into two groups. The study group comprised 28 parents of hearing-impaired patients due to autosomal recessive inheritance, 14 females aged 20.0–55.0 years (mean 32.8 years) and 14 males aged 20.0–58.0 years (mean 35.2 years). Control group was composed of normal hearing individuals, 14 males and 14 females age-matched to the study group. The subjects underwent tests for audiometry, tympanometry, and DPOAE in the frequency range of 9,000–16,000 Hz. **Results:** We found 64.3% of normal results of DPOAE in the study group compared to 91.1% in the control. There were significant differences between groups in the ears and DPOAE responses, and the mean level of response was in 10 dBNPS in study group and 14 dBNPS in the control. The Pearson's correlation between age and DPOAE in ultra-high frequencies showed no statistical significance. **Conclusion:** DPOAE at ultra-high frequencies were able to identify individuals from both groups, suggesting that heterozygous individuals for the *Gap Junction Protein Beta-2* gene mutation may have damage to the cochlear function before clinical manifestation in audiometry.

Endereço para correspondência:

Jaqueline Medeiros de Mello
Rua Vaz Caminha, 633, Zona 2, Maringá
(PR), Brasil, CEP: 87010-420.
E-mail: jaquedemello@yahoo.com.br

Recebido em: 09/01/2013

Aceito em: 11/11/2013

Trabalho realizado no Laboratório de Investigação Fonoaudiológica em Audição Humana, Curso de Fonoaudiologia, Departamento de Fisioterapia, Fonoaudiologia e Terapia Ocupacional, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

(1) Faculdade Ingá – UNINGÁ – Maringá (PR), Brasil.

(2) Programa de Pós-graduação (Doutorado) em Ciências Biológicas e Genética, Universidade Estadual de Maringá – UEM – Maringá (PR), Brasil.

(3) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

Conflito de interesses: nada a declarar.

INTRODUÇÃO

A deficiência auditiva (DA) pode ser causada por fatores ambientais e genéticos. Dentre os casos de etiologia genética, 70% podem manifestar apenas surdez (DA não síndrômica) e os demais 30% podem estar associados a outras anomalias (DA síndrômica)^(1,2).

Dentre os casos de DA não síndrômica predomina a herança autossômica recessiva, com incidência entre 75 e 80%, seguida pela herança autossômica dominante (15%), ligada ao X (3%) e mitocondrial ou materna^(2,3). Considerando as mutações com transmissão autossômica recessiva que levam à DA, predominam as no gene *Gap Junction Bet-2 Protein* (GJB2), responsável pela síntese da conexina 26, especialmente a 35delG, caracterizada pela deleção de uma guanina em um conjunto de seis, localizada na posição 30-35, a partir do nucleotídeo 1, da região codificadora no exon 2 do gene GJB2, 35delG⁽³⁾.

Conexinas são proteínas de junção que agem na comunicação intercelular, denominadas junções do tipo *gap*. Na cóclea, elas realizam papel crucial na função fisiológica relacionada à homeostase iônica, levando à modificação na estrutura e funcionamento das junções *gap*, que promove a manutenção de altas concentrações de potássio intracelular, com consequente intoxicação celular^(3,4).

A relação entre genótipo e fenótipo tem sido investigada em sujeitos com surdez de herança autossômica recessiva, do tipo neurosensorial, não progressiva, geralmente com grau severo a profundo e de manifestação pré-lingual⁽⁵⁻⁷⁾. Entretanto, existem poucos estudos⁽⁸⁻¹⁰⁾ da relação genótipo *versus* fenótipo nos sujeitos heterozigotos, ou seja, aqueles ouvintes que possuem um alelo normal e o outro mutado, sendo estes, em geral, os pais de surdos, com DA do tipo autossômica recessiva e que transmitem os genes nas populações. Assim se justificam estudos que identificam a presença de alterações auditivas, mesmo que mínimas, em pais com genótipos heterozigotos, para se tentar associar estas aos seus genótipos.

A detecção de alterações mínimas na audição, por meio da avaliação audiológica convencional incluindo a audiometria tonal limiar e imitanciometria, não tem sido eficaz^(6,7). Em compensação, o exame de emissão otoacústica constitui um método eficiente para verificar alterações discretas e precoces na audição de pais de sujeitos com DA de herança autossômica recessiva⁽⁸⁻¹⁰⁾.

Com o surgimento do procedimento de emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção (EOA-PD) em frequência ultra-altas, a qual avalia a faixa de 9.000 a 16.000 Hz, tornou-se possível detectar alterações auditivas que podem anteceder uma DA nas frequências convencionais nos estágios iniciais, antes que o dano coclear progrida para as baixas frequências⁽¹¹⁾.

A investigação da função coclear em frequências ultra-altas nos pais de deficientes auditivos de herança autossômica recessiva caracteriza um instrumento de avaliação que possibilita a identificação precoce de alterações auditivas, além de constituir uma ferramenta potencialmente útil na identificação de indivíduos com risco para apresentar alelos mutados em genes responsáveis pela DA.

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a função coclear em pais heterozigotos de surdos com

mutações no gene GJB2, por meio das EOA-PD frequências ultra-altas entre 9.000 a 16.000 Hz, comparando-as às respostas do grupo controle pareado por gênero e idade.

MÉTODO

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Fonoaudiológica em Audição Humana do Curso de Fonoaudiologia do Departamento de Fisioterapia, Fonoaudiologia e Terapia Ocupacional da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, tendo sido aprovado sob protocolo número 170/10 pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq).

A casuística foi composta por 56 indivíduos na faixa entre 20 a 58 anos de idade, divididos em dois grupos distintos. O grupo estudo (GE) foi constituído por 28 pais de deficientes auditivos decorrentes de herança autossômica recessiva, sendo 14 mulheres com idade entre 20,0 a 55,0 anos (média 32,8 anos) e 14 homens com idade entre 20,0 a 58,0 anos (média 35,2). Já o grupo controle (GC) foi formado por indivíduos sem queixa auditiva, composto por 14 homens e 14 mulheres, com idades pareadas ao GE.

Os critérios de inclusão estabelecidos para os dois grupos foram: O GE foi composto por mães e pais portadores em heterozigose do alelo recessivo da mutação do gene GJB2, incluindo os alelos normal e mutante com mutação na 35delG, identificados por estudo molecular. Foram incluídos os casais que não apresentavam queixa auditiva e possuíam ao menos um filho com DA de herança autossômica recessiva.

O GC foi constituído por 28 indivíduos que não apresentavam queixas auditivas, sendo eles pareados por gênero e idade do GE para evitar possível viés na análise da variação dos resultados. Optou-se por selecionar o GC por meio de critérios de inclusão como ausência de fatores relacionados à presença de DA congênita e/ou adquirida, história de exposição a ruído de forte intensidade e consumo de álcool, drogas e ototoxicidade, bem como história pregressa de alteração na orelha média. Devido a tais critérios de inclusão do GC, não foi realizada análise molecular neste grupo, pois envolvia gastos extras. Além disso, a coleta de sangue é considerada um procedimento invasivo, especialmente para uma população sem queixa auditiva.

Foram incluídos no estudo indivíduos com integridade de orelha média evidenciada por timpanograma tipo A⁽¹²⁾ e reflexos acústicos contralaterais presentes nas frequências de 500 a 4.000 Hz e com limiares auditivos dentro da normalidade (≤ 25 dBNA).

Os indivíduos foram submetidos à anamnese, inspeção visual do meato acústico externo, audiometria tonal liminar (ATL), imitanciometria e EOA-PD em frequências ultra-altas, após terem assinado o Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

O teste de EOA-PD foi realizado com o paciente em cabina acústica após inserção, no meato acústico externo, de oliva adaptada à sonda do equipamento de Emissão Otoacústica DP2000, *Distortion Product Otoacoustic Emission Measurement System Starkey*.

Para registro das EOA-PD, os parâmetros estabelecidos seguiram o padrão recomendado pelo fabricante do equipamento, segundo o proposto por Gorga et al.⁽¹³⁾, tais como intensidade dos estímulos diferentes ($L_1 > L_2$),

ou seja, $L_1=65\text{dBNPS}$ e $L_2=55\text{dBNPS}$ bem como apresentação de dois tons puros primários, f_1 e f_2 ($f_1 < f_2$), com relação de $f_2/f_1=1,2$, em dois pontos de oitavas. As respostas de EOA-PD foram geradas na região de $2f_1-f_2$ nas faixas de frequências ultra-altas que se estenderam de 9.000 a 16.000 Hz, conforme o Quadro 1.

Quadro 1. Valores das frequências primárias (f_1 e f_2) do estímulo e da resposta do produto distorcido em $2f_1-f_2$ para as emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção em frequências ultra-altas

| Frequências primárias | | Produto de distorção |
|-----------------------|------------|----------------------|
| f_1 (Hz) | f_2 (Hz) | $2f_1-f_2$ (Hz) |
| 7.266 | 8.719 | 5.813 |
| 7.922 | 9.516 | 6.328 |
| 8.625 | 10.359 | 6.891 |
| 9.422 | 11.297 | 7.547 |
| 10.266 | 12.328 | 8.203 |
| 11.203 | 13.453 | 8.953 |
| 12.234 | 14.672 | 9.797 |
| 13.313 | 15.984 | 10.641 |

O critério utilizado para indicar a presença das EOA-PD foi o proposto por Gorga et al.¹³, no qual o nível de resposta devia estar pelo menos 6 dBNPS acima do primeiro desvio-padrão do ruído na frequência avaliada, ou 3 dB acima do segundo desvio-padrão do ruído. O nível de ruído de fundo foi sempre igual ou inferior a -5 dBNPS para cada frequência avaliada, e o da amplitude das EOA-PD ≥ 0 dB.

A duração do sinal emitido foi de dois segundos para ser captado no meato acústico externo, sendo realizada apenas uma varredura de frequência automática. Porém, quando a resposta de uma dada frequência encontrava-se ausente ou diminuída era retestada individualmente, no mesmo registro, pelo menos três vezes para confirmação da resposta. Os exames que apresentaram ausência de resposta foram interrompidos quando o ruído excedia -5 dBNPS e o nível de resposta estava abaixo de 0 dB. Optou-se por este procedimento para que eventuais movimentações e/ou ruídos fisiológicos não prejudicassem a obtenção das respostas reais.

Previamente à realização do exame de EOA-PD foi realizada calibração automática da sonda *in situ* após seleção de uma oliva de tamanho adequado inserida no meato acústico externo. Em seguida o teste era iniciado. Duas curvas com significativa sobreposição por análise visual foram registradas para verificar a representação confiável do teste nas faixas de frequências de 9.000 a 16.000 Hz, como pode ser visualizado na Figura 1. A calibração da sonda para as frequências de 9.000 a 16.000 Hz requer tempo e cuidados especiais, sendo necessária, em algumas situações, a reinserção da sonda no meato acústico externo do paciente algumas vezes até a obtenção de um padrão de calibração em que fosse possível prosseguir com o exame. Este padrão típico com declínio na curva de resposta a partir da frequência de 10.000 Hz pode ser visualizado na Figura 1.

RESULTADOS

Os achados obtidos na ATL revelaram que a média dos limiares auditivos nas frequências de 250 a 8.000 Hz foi de 10 dB no GE e 8 dB no GC, sem diferença estatisticamente significativa entre orelhas e grupos.

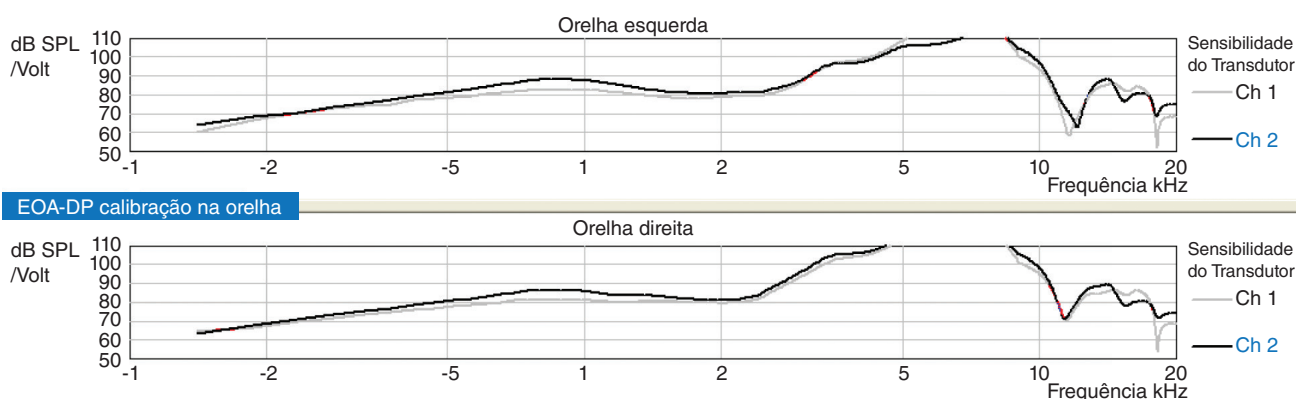
Os resultados apresentados mostram as análises qualitativas das avaliações obtidas nas respostas de EOA-PD geradas na região de $2f_1-f_2$ em frequências ultra-altas. A distribuição da ocorrência de resultados normais e alterados das EOA-PD, bem como o teste Z de proporção, encontram-se na Tabela 1.

Os resultados obtidos na análise quantitativa das EOA-PD em frequências ultra-altas entre as orelhas avaliadas de ambos os grupos podem ser verificados na Figura 2, enquanto que os entre os grupos podem ser vistos nos *box-plots* apresentados na Figura 3.

Tabela 1. Distribuição da ocorrência de resultados normais e alterados nas emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção em frequências ultra-altas entre os grupos controle e estudo

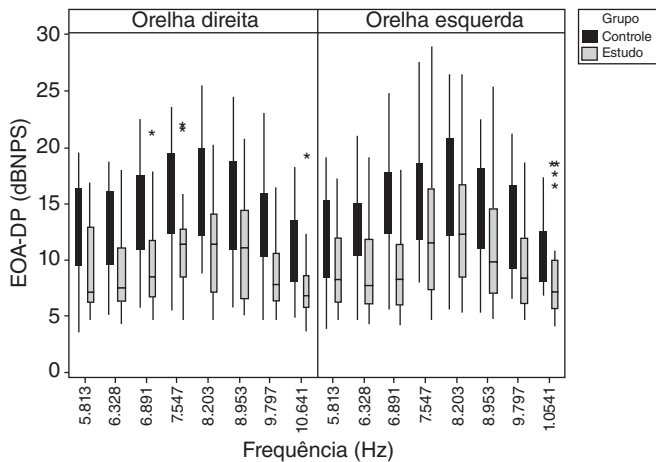
| Emissão otoacústica | Grupo estudo | | Grupo controle | | Teste Z Valor de p | |
|---------------------|-----------------------|----|----------------|----|-----------------------|--------|
| | n | % | n | % | | |
| Alterado | Frequência Ultra-Alta | 20 | 35,7 | 5 | 8,9 | 0,255 |
| Normal | Frequência Ultra-Alta | 36 | 64,3 | 51 | 91,1 | 0,002* |

*Resultado estatisticamente significativo

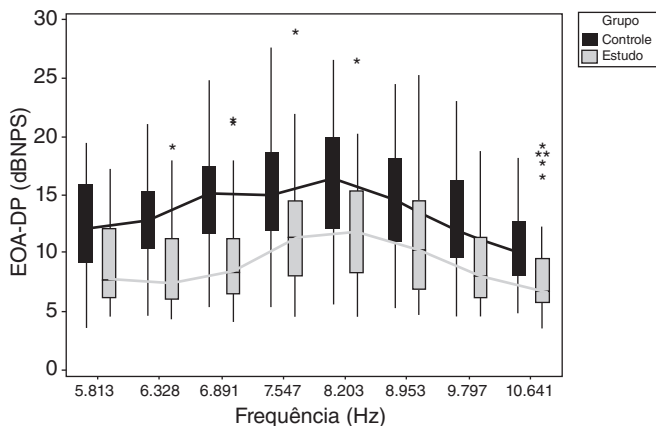


Legenda: EOA-DP = emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção

Figura 1. Calibração da sonda *in situ* antes do registro de emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção nas frequências de 9.000 a 16.000 Hz



Legenda: EOA-DP = emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção
Figura 2. Box-plots para as emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção (dBNPS) em cada frequência ultra-alta por grupo e orelha



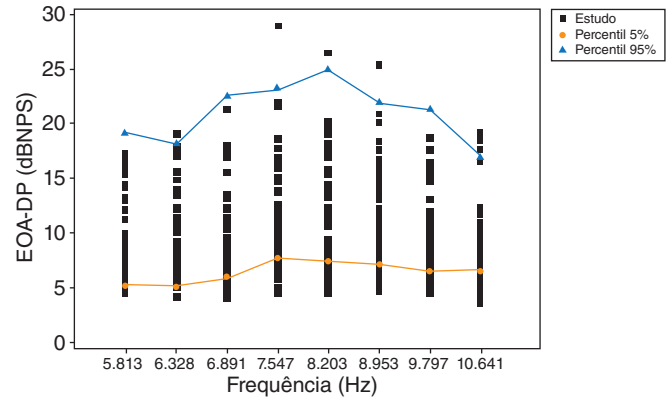
Legenda: EOA-DP = emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção
Figura 3. Box-plots e perfis medianos para as emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção (dBNPS) por grupo nas frequências ultra-altas

Para a análise inferencial das EOA-PD em frequências ultra-altas foram calculados os percentis de ordem de 5 e 95% para definir um intervalo de referência de 90% para as EOA-PD em cada frequência, a fim de verificar o quanto a média pode variar em uma determinada probabilidade de confiança⁽¹⁴⁾. A correlação entre as frequências ultra-altas no GE e os limites de referência para as EOA-PD estimados no GC podem ser visualizados na Figura 4.

Para medir a correlação entre a idade e as EOA-PD em cada frequência ultra-alta foram calculados os valores do coeficiente de correlação de Pearson em cada grupo e orelha. Os valores observados são apresentados na Tabela 2.

DISCUSSÃO

O perfil audiológico de 28 pais portadores em heterozigose do alelo mutado do gene GJB2, causador da DA, foi investigado neste estudo e, apesar destes sujeitos não apresentarem queixa auditiva, se formulou a hipótese de que poderiam haver alterações discretas na audição, evidenciadas por meio da diminuição



Legenda: EOA-DP = emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção
Figura 4. Diagrama de dispersão das emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção correlacionado às frequências no grupo estudo e limites de referência para emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção estimados no grupo controle para as frequências ultra-altas

Tabela 2. Valores observados do coeficiente de correlação de Pearson entre idade e as emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção (dBNPS) em frequências ultra-altas por grupo e orelha

| Frequência (Hz) | | Controle | | Estudo | |
|-----------------|---|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | | Orelha direita | Orelha esquerda | Orelha direita | Orelha esquerda |
| 5.813 | R | -0,13 | -0,14 | 0,02 | 0,03 |
| | P | 0,525 | 0,467 | 0,923 | 0,875 |
| 6.328 | R | -0,04 | -0,13 | 0,04 | 0,10 |
| | P | 0,826 | 0,501 | 0,858 | 0,612 |
| 6.891 | R | -0,09 | 0,02 | 0,15 | 0,22 |
| | P | 0,645 | 0,921 | 0,446 | 0,256 |
| 7.547 | R | -0,03 | 0,15 | -0,01 | -0,17 |
| | P | 0,870 | 0,460 | 0,958 | 0,385 |
| 8.203 | R | -0,20 | 0,10 | -0,03 | -0,17 |
| | P | 0,321 | 0,622 | 0,886 | 0,380 |
| 8.953 | R | -0,26 | 0,07 | -0,07 | -0,16 |
| | P | 0,180 | 0,712 | 0,707 | 0,416 |
| 9.797 | R | -0,26 | 0,04 | -0,04 | -0,36 |
| | P | 0,183 | 0,826 | 0,855 | 0,057 |
| 10.641 | R | -0,15 | 0,00 | -0,02 | -0,11 |
| | P | 0,449 | 0,987 | 0,926 | 0,577 |

Legenda: R = correlação de Pearson; P = resultado estatisticamente significante

nas respostas de EOA-PD em frequências ultra-altas, quando comparados aos pais assintomáticos e sem fatores de risco para a DA, visto que as células ciliadas externas na espira basal da cóclea sofrem com alterações cocleares sutis.

A análise demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa entre as respostas de emissões otoacústicas, sendo que o GE apresentou menor nível de resposta em comparação ao GC. Dessa forma, pode-se afirmar que as EOA-PD para as frequências ultra-altas foram capazes de diferenciar os indivíduos do GE e do GC, sugerindo que alterações nas células ciliadas externas, resultado do mecanismo defeituoso das junções do tipo *gap*, causado pela mutação do gene GJB2, podem ser notadas nas emissões otoacústicas em pais heterozigotos para essa mutação.

O estudo das medidas de audição nos pais de deficientes auditivos com mutações em GJB2 é de utilidade na identificação de DA discretas. Além disso, essa caracterização pode, no futuro, vir a indicar nas famílias quais indivíduos podem ser portadores de genes recessivos que causam DA, principalmente nos casos em que ainda não há testes moleculares disponíveis^(8,15).

Os achados das EOA-PD obtidos revelaram que o GE apresentou menor ocorrência de resultado normal que o GC (Tabela 1). Mesmo observando similaridade nos testes audiológicos convencionais, houve diferença nas EOA-PD entre os sujeitos portadores em heterozigose da mutação no gene GJB2 e não portadores, demonstrando que as células ciliadas externas na base da cóclea são mais sensíveis aos efeitos negativos do que a mutação proporciona. O fato de os pais de deficientes auditivos de herança autossômica recessiva serem portadores em heterozigose do alelo recessivo que causa a mutação no gene GJB2 pode indicar alteração na homeostase iônica e no processo endococlear na base da cóclea, que leva à modificação na estrutura e funcionamento das junções *gap*, com consequente alta manutenção de concentração de potássio (K^+) intracelular, ocasionando intoxicação do órgão espiral^(3,4).

Com relação à lateralidade das EOA-PD, ao comparar os resultados entre as orelhas de um mesmo grupo, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa. Apesar de os resultados não se mostrarem significantes, foi possível constatar, em relação aos valores médios, vantagem da orelha direita (OD) sobre a esquerda (OE) (Figuras 2 e 3).

A maioria dos estudos revela melhor nível de respostas das emissões otoacústicas quando coletadas na OD^(16,17). Possíveis explicações para os achados de maior presença de emissões otoacústicas à OD podem ser decorrentes de diferenças entre as orelhas, associadas com a ligeira vantagem da sensibilidade auricular direita e a dominância do hemisfério esquerdo na percepção da fala e na função da linguagem, além do efeito da supressão das emissões otoacústicas maior na OD, evidenciando atividade eferente assimétrica entre as duas orelhas e privilegiando a detecção do sinal acústico na presença de ruído e a assimetria morfológica entre as regiões crânio-faciais direita e esquerda^(16,17). Entretanto, outros estudos não observaram diferenças significantes no nível de resposta das emissões otoacústicas em relação ao lado da orelha⁽¹⁸⁾.

Por não haver diferença estatisticamente significativa entre as orelhas no mesmo grupo, realizou-se a análise comparativa dos resultados das EOA-PD entre os GE e GC, agrupando os valores obtidos, e verificou-se resultado estatisticamente significativo em todas as frequências entre os grupos, com vantagem para o GC (Figuras 2 e 3). Apesar de ambos os grupos não apresentarem queixa auditiva e possuírem características audiológicas semelhantes, os indivíduos heterozigotos para a mutação do gene GJB2 registraram maior dano no processo ativo das células ciliadas externas.

Reduzido nível de resposta das EOA-PD nas ultra-altas frequências era esperado devido à organização tonotópica coclear, já que as frequências ultra-altas encontram-se na base da cóclea e, por isto, sofrem maior vulnerabilidade de lesões, sendo possível detectar alterações precoces antes mesmo que os efeitos característicos apareçam na faixa de frequência convencional⁽¹⁹⁾.

Outro fator que pode ter contribuído para o menor nível de respostas das EOA-PD em frequências ultra-altas pode ser a dificuldade encontrada no presente estudo na calibração da sonda antes de iniciar o registro das emissões otoacústicas (Figura 1), devido ao curto comprimento de onda envolvido nas frequências altas e às complexas interações entre o comprimento de onda e as dimensões do meato acústico externo⁽²⁰⁾. No futuro, a solução para o problema de calibração será o registro das EOA-PD com dois microfones, sendo um de referência (algo como um microfone de medição da sonda tubo) inserido próximo à membrana timpânica para verdadeiramente calibrar o estímulo, e o outro para captar as respostas das células ciliadas externas⁽²¹⁾.

Estudos realizados com EOA-PD utilizando estímulos de frequências ultra-altas também demonstram a preocupação com a calibração nesta faixa de frequência e apontam que a grande variabilidade de respostas que ocorre nas frequências ultra-altas pode ser influenciada pela calibração^(11,22-26). Dreisbach et al.⁽²³⁾ recomendaram que tal variabilidade é minimizada por meio da exata calibração realizada com inserção do microfone no meato acústico externo do paciente de maneira correta, refazendo a frequência em questão e reposicionando a sonda para confirmar se a resposta deve-se exclusivamente à atividade coclear.

Para evitar artefato na calibração devido às ondas estacionárias, especialmente em frequências ultra-altas, Dreisbach e Siegel⁽²²⁾ confeccionaram uma sonda específica para o estudo contendo uma sonda com três tubos. O primeiro enviava o estímulo, o segundo era o microfone e o terceiro, uma fibra ótica para visualizar a posição da sonda em relação à membrana timpânica que deveria ficar cerca de 10 a 15 mm dela, isto para garantir o mesmo nível de pressão sonora durante a avaliação de todas as frequências.

O principal problema encontrado para medir as emissões otoacústicas em frequências ultra-altas deve-se à limitação nos procedimentos de calibração^(25,26). Por isto, os autores desenvolveram uma técnica denominada calibração de pressão-incidente que evita os efeitos das ondas estacionárias em frequências altas, por meio de um tubo cilíndrico de 8 mm de diâmetro inserido no fone de inserção, funcionando como uma câmara anecoica.

Na tentativa de responder se o estímulo em frequências ultra-altas distinguia os indivíduos do GE e GC, foi utilizado o teste de intervalo de referência de 90%. Observa-se na Figura 4 que vários indivíduos do GE estão abaixo do limite inferior de referência estimado no GC, enquanto alguns estão acima do limite superior de referência. A hipótese era que os pais de deficientes auditivos por herança autossômica recessiva apresentassem maior comprometimento na base da cóclea e, com isto, as EOA-PD com frequências ultra-altas teriam padrão próprio nestes indivíduos. Entretanto, por se tratar de recurso disponibilizado apenas recentemente, ainda há poucos estudos que avaliam as frequências de 9.000 a 16.000 Hz, tanto em EOA-PD quanto em estudos focando a percepção sonora nesta faixa de frequências.

Algumas dificuldades contribuem para haver poucos estudos sobre as EOA-PD em frequências ultra-altas. A primeira é que a maioria dos sons de fala está presente em frequências

até 8.000 Hz, e as frequências ultra-altas que contribuem para a decodificação de sons ambientais ou música normalmente são menos preocupantes clinicamente, já que a discriminação do sinal da fala é o mais pertinente para a comunicação humana⁽²⁵⁾. Outra razão é que a disponibilidade de equipamentos no mercado de EOA-PD em frequências ultra-altas é recente, além da ausência de padronização em relação à normalidade do nível de resposta para as EOA-PD na faixa de 9.000 a 16.000 Hz.

Quando há disponibilidade de equipamentos de EOA-PD em frequência ultra-alta, registra-se dificuldade na calibração correta dos transdutores com segurança. Existem poucos estudos envolvendo as EOA-PD em frequências ultra-altas, já que a calibração nesta faixa de frequência é árdua, o que faz com que os pesquisadores abandonem os estudos mesmo antes de completá-los⁽²¹⁾.

Contudo, com o avanço tecnológico e maior conhecimento da relação entre audiologia e física acústica, espera-se que a falta de fidelidade dos padrões de calibração para as frequências ultra-altas possa ser superada devido à sua aplicabilidade, como nos casos de monitoramento de pacientes com presença ou suspeita de patologias relacionadas à audição como ototoxicidade, seqüela de otite média, presbiacusia, exposição ao ruído e em portadores de insuficiência renal^(27,28).

Vallejo et al.⁽²⁹⁾ acrescentaram que uma das aplicações clínicas da pesquisa em frequências ultra-altas é a investigação do comprometimento auditivo em familiares de portadores de DA de origem genética, como é o caso de pais que apresentam mutação no gene GJB2 em heterozigose assintomáticos.

Neste contexto, a investigação das frequências ultra-altas nos pais de portadores de DA de herança autossômica recessiva caracteriza um instrumento para que discretas alterações auditivas possam ser identificadas precocemente.

Assim como em alguns estudos, notou-se que as EOA-PD tendem a diminuir com o aumento da idade, provavelmente devido às alterações da biomecânica coclear e/ou perda de Célula Ciliada Externa (CCE), observadas ao longo da vida, e à deterioração das CCE com o passar dos anos, ocorrendo aumento sistemático nos limiares de audibilidade em função do incremento da frequência^(30,31).

A idade dos sujeitos do GE com maior alteração nas emissões otoacústicas variou de 38 a 58 anos. Nos indivíduos mais jovens, ficou a dúvida se a presença do alelo causador da surdez poderia ser o responsável pelas alterações nas emissões otoacústicas, já que foram excluídos os fatores de riscos ambientais. Já no GC, apenas foram evidenciadas mudanças nas emissões otoacústicas nos sujeitos que estavam na faixa de 55 a 57 anos, provavelmente em decorrência do deterioramento da audição com o aumento da idade denominada presbiacusia, ocorrendo mudanças na cóclea, como perda de células sensoriais, atrofia da estria vascular e perda de células do gânglio espiral⁽³⁰⁾.

Desta forma, ambos os grupos teriam as mesmas chances de manifestar alterações auditivas decorrentes do fator idade. Contudo, a maior ocorrência de alteração no GE pode, então, ter sofrido influência do alelo recessivo em heterozigose, o que causa a DA na herança autossômica.

A deterioração da audição nas frequências ultra-altas já começa na infância, sendo acompanhada por uma diminuição

nas respostas das emissões otoacústicas transientes (EOA-T) e por produto de distorção (EOA-PD), bem como ausência das emissões otoacústicas espontâneas. Assim, a avaliação das frequências ultra-altas pode ajudar a detectar a DA de forma precoce, o que não pode ser revelada por meio da avaliação audiológica convencional⁽³¹⁾.

A perda de sensibilidade auditiva na faixa de frequência de 15.000 a 18.000 Hz começa em torno de 20 anos de idade. A DA geralmente é resultante de mudanças relacionadas à idade no metabolismo, degeneração do nervo coclear e alterações mecânicas no órgão espiral, com consequentes efeitos adversos sobre a função auditiva periférica e central⁽³²⁾.

Os diagramas de dispersão que correlacionam a idade e o comportamento das EOA-PD em frequências ultra-altas em ambos os grupos revelaram que não foi observada tendência nas nuvens de pontos e o coeficiente de Pearson em cada grupo e orelha para as EOA-PD em frequências ultra-altas não demonstrou correlação negativa significativa em ambos os grupos (Tabela 2).

O pouco conhecimento envolvendo a percepção sonora em ultra-altas frequências associado à não correlação entre idade e EOA-PD em frequências ultra-altas pode ser justificado pelo pequeno número da amostra de sujeitos e, desta forma, se faz necessária uma amostra maior em pesquisas posteriores para se garantir a precisão dos dados audiológicos.

Geralmente os estudos existentes sobre a DA de herança autossômica recessiva contam com amostra pequena devido à dificuldade em concentrar grande número destes indivíduos, especialmente no Brasil, onde discernir a DA de origem genética daquela de causa ambiental não é uma tarefa simples por conta, na maioria das vezes, da inacessibilidade dos testes moleculares. Mesmo que houvesse maior facilidade para esclarecer a etiologia da DA de herança autossômica recessiva, o número ainda seria reduzido, pois a DA neste tipo de herança representa 15% da população geral dos surdos^(3,4). Engel-Yeger et al.⁽⁹⁾ acrescentaram que poucos estudos procuraram determinar o quadro clínico da DA de herança autossômica recessiva, pois apenas um número pequeno de famílias/sujeitos são examinados.

Em relação à dificuldade na obtenção da casuística, destacam-se altos índices de resistência dos pacientes em realizar a avaliação audiológica, principalmente por eles serem comumente assediados a participar de pesquisas envolvendo a DA, além de alegarem que os exames não a reverteriam, e que já realizam os exames periodicamente por ocasião da emissão de renovação de documentos, como carta de habilitação e passe livre para o transporte urbano.

Ainda vale ressaltar a dificuldade na obtenção de casais levando em conta o crescente número de divórcios ocorridos atualmente. Muitas vezes a família era constituída de mãe e padrastos ou vice-versa. Ao relatar que seria realizada a análise molecular que para o leigo, é sinônimo de exame de DNA que comprova a paternidade, muitas mães conhecedora de tal fato se negam a realizar exames que possam levar a uma suspeita de paternidade.

Para verificar se seria possível identificar diminuição nas respostas da função coclear dos pais portadores em heterozigotos

da mutação do gene GJB2, o presente estudo adotou uma metodologia eletroacústica capaz de confirmar a hipótese inicial, embora novos estudos sejam necessários à medida que os avanços tecnológicos permitem maior precisão no registro das EOA-PD em frequências ultra-altas.

CONCLUSÃO

As EOA-PD nas frequências ultra-altas foram capazes de distinguir os indivíduos do grupo estudo e do grupo controle, sugerindo que indivíduos heterozigotos para a mutação do gene GJB2 podem apresentar dano no processo ativo das células ciliadas externas antes da manifestação clínica por meio dos resultados alterados na avaliação audiológica convencional.

**JMM foi responsável pela coleta, tabulação dos dados e elaboração do manuscrito; VADR acompanhou a coleta e colaborou com a análise dos dados e RMMC supervisionou a coleta de dados e a discussão final do trabalho.*

REFERÊNCIAS

- Cohen MM, Gorlin RJ. Epidemiology, etiology and genetic patterns. In: Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM (eds.). Hereditary hearing loss and its syndromes. Oxford: Oxford University Press; 1995. p.9-21.
- Alves FRA, Ribeiro FAQ. Roteiro diagnóstico e de conduta frente à perda auditiva sensorioneural genética. Rev Bras Otorrinolaringol. 2007;73(3):412-7.
- Lefebvre PP, Van De Water TR. Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. Brain Res Brain Res Rev. 2000;32(1):159-62.
- Shibata Y, Kumai M, Nishii K, Nakamura K. Diversity and molecular anatomy of gap junctions. Med Electron Microsc. 2001;34(3):153-9.
- Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. Br Med Bull. 2002;63:73-94.
- Han J, Li F, Zhao M, Zhang Z, Ni D. Study on distortion otoacoustic emissions and expanded high frequency audiometry in noise exposure workers. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi. 2003;17(1):16-9.
- Carvalho RMM. Audição em altas frequências: repercussões no reconhecimento de fala no ruído e nas emissões otoacústicas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2002.
- Engel-Yeger B, Zaaroura S, Zlotogora J, Shalev S, Hujeirat Y, Carrasquillo M, et al. The effects of a connexin 26 mutation-35delG on otoacoustic emissions and brainstem evoked potentials: homozygotes and carriers. Hear Res. 2002;163:93-100.
- Engel-Yeger B, Zaaroura S, Zlotogora J, Shalev S, Hujeirat Y, Carrasquillo M, et al. Otoacoustic emissions and brainstem evoked potentials in compound carriers of connexin 26 mutations. Hear Res. 2003;175(1-2):140-51.
- Franzé A, Caravelli A, Di Leva F, Marciano E, Auletta G, D'Aulos F, et al. Audiometric evaluation of carriers of the connexin 26 mutation 35delG. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2005;262(11):921-4.
- Dunckley KT, Dreisbach LE. Gender effects on high frequency distortion product otoacoustic emissions in humans. Ear Hear. 2004;25(6):554-64.
- Jerger J. Clinical experience with impedance audiometry. Arch Otolaryngol. 1970;92(4):311-24.
- Gorga MP, Neely ST, Ohlrich B, Hoover B, Redner J, Peters J. From laboratory to clinic: a large scale study of distortion product otoacoustic emissions in ears with normal hearing and ears with hearing loss. Ear Hear. 1997;18(6):440-55.
- Harris EK, Boyd JC. Statistical bases of reference values in laboratory medicine. New York: Marcel Dekker, 1995.
- Silva LS, Mingroni Netto RC, Sanches SGG, Carvalho RMM. Medidas de audição de pais de indivíduos com deficiência auditiva de herança autossômica recessiva. Pró-Fono R Atual Cient. 2010;22(4):403-8.
- Bassetto MCA, Chiari BM, Azevedo MF. Emissões otoacústicas evocadas transientes (EOAET): amplitude da resposta em recém-nascidos a termo e pré-termo. Rev Bras Otorrinolaringol. 2003;69(1):84-92.
- Durante AS, Carvalho RMM, Costa FS, Soares JC. Características das emissões otoacústicas por transientes em programa de triagem auditiva neonatal. Pró-Fono. 2005;17(2):133-40.
- Carvalho CU, Carvalho RMM. Latência das EOAPD em milissegundos e número de ondas. Rev Bras Otorrinolaringol. 2005;71(6):784-90.
- Silva IMC, Feitosa MAG. Audiometria de alta frequência em adultos jovens e mais velhos quando a audiometria convencional é normal. Rev Bras Otorrinolaringol. 2006;72(5):665-72.
- Barret AR. The contribution of ultra-high frequency hearing on distortion product otoacoustic emission amplitudes [dissertation]. Harrisonburg: James Madison University; 2007.
- Middlesworth LV. Advanced otoacoustic emissions testing in the clinic. In: Anais do 27º Encontro Internacional de Audiologia (EIA); 2012. Bauru.
- Dreisbach LE, Siegel JH. Level dependence of distortion-product otoacoustic emissions measured at high frequencies in humans. J Acoust Soc Am. 2005;117(5):2980-8.
- Dreisbach LE, Long KM, Lees SE. Repeatability of high-frequency distortion-product otoacoustic emissions in normal-hearing adults. Ear Hear. 2006;27(5):466-79.
- Kei J, Brazel B, Crebbin K, Richards A, Willeston N. High frequency distortion product otoacoustic emissions in children with and without middle ear dysfunction. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2007;71(1):125-33.
- Goodman SS, Fitzpatrick DF, Ellison JC, Jesteadt W, Keefe DH. High-frequency click-evoked otoacoustic emissions and behavioral thresholds in humans. J Acoust Soc Am. 2009;125(2):1014-32.
- Keefe DH, Goodman SS, Ellison JC, Fitzpatrick DF, Gorga MP. Detecting high-frequency hearing loss with click-evoked otoacoustic emissions. J Acoust Soc Am. 2011;129(1):245-61.
- Carvalho RMM. Audição em altas frequências: repercussões no reconhecimento de fala no ruído e nas emissões otoacústicas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo; 2002.
- Klagenberg KF, Oliva FC, Gonçalves CGO, Lacerda ABM, Garofani VG, Zeigelboim BS. Audiometria de altas frequências no diagnóstico complementar em audiologia: uma revisão da literatura nacional. Rev Soc Bras Fonoaudiol. 2011;16(1):109-14.
- Vallejo JC, Silva MN, Oliveira JAA, Carneiro JJ, Rocha LSO, Figueiredo JFC, et al. Detecção precoce de ototoxicidade usando emissões otoacústicas produto de distorção. Rev Bras Otorrinolaringol. 2001;67(6):845-51.
- Uchida Y, Sugiura S, Ando F, Shimokata H, Yoshioka M, Nakashima T. Analyses of factors contributing to hearing aids use and both subjective and objective estimates of hearing. Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho. 2008;111(5):405-11.
- Groh D, Pelanova J, Jilek M, Popelar J, Kabelka Z, Syka J. Changes in otoacoustic emissions and high-frequency hearing thresholds in children and adolescents. Hear Res. 2006;212(1-2):90-8.
- Mazelová J, Popelar J, Syka J. Auditory function in presbycusis: peripheral vs. central changes. Exp Gerontol. 2003;38(1-2):87-94.