JAQUELINE MEDEIROS DE MELLO

**Função coclear em frequências ultra-altas em pais de
indivíduos com deficiência auditiva autossômica recessiva**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Programa de: Ciências da Reabilitação

Área de Concentração: Comunicação Humana

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Mota Mamede Carvallo

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mello, Jaqueline Medeiros de

Função coclear em frequências ultra-altas em pais de indivíduos com deficiência
auditiva autossômica recessiva / Jaqueline Medeiros de Mello. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências da Reabilitação. Área de concentração: Comunicação
Humana.

Orientadora: Renata Mota Mamede Carvalho.

Descritores: 1.Testes auditivos 2.Emissão otoacústica 3.Audição 4.Genética
5.Mutação

USP/FM/DBD-285/12

Dedicatória

DEDICATÓRIA

A **Deus** por estar presente em todos os momentos da minha vida e por me fazer merecedora de tudo que SOU e TENHO. A Ele toda honra e glória!

Aos Doutores da minha vida, meus pais **Nelson Ferreira de Mello e Maria Vitória Medeiros de Mello**, minha base, meus anjos da guarda e meus verdadeiros mestres. Ensinaram-me de maneira simples, porém com imensa sabedoria lições de vida como: amor, família, humildade, dedicação incondicional a um filho e temor a Deus.

Às minhas irmãs **Joelma e Josiane Medeiros de Mello**, cúmplices, caras-metades, conselheiras e “professoras”. Sempre auxiliando a caçula com amor e carinho, me serviram de inspiração e exemplo na vida. Sou fã incondicional de vocês!

À minha pequena e grande **Vitória Medeiros de Mello Ferreira**, minha jóia preciosa, sua espontaneidade e pureza de criança, sempre torna minha vida mais alegre.

Aos meus cunhados **Victor Alexandre Ferreira e Renan Zanoni**, pela constante torcida e por poder contar sempre com vocês.

A m o todos demais

Para vocês dedico minha conquista do Doutorado !

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profª Drª. Renata Mota Mamede Carvalho**, sua serenidade, amizade e competência me proporcionou um período de crescimento intelectual, enriquecendo minha experiência acadêmica. Seus ensinamentos e exemplo de excelente profissional e pessoa serão sempre lembrados com admiração. Agradeço TUDO que fez por mim.

Ao **Prof. Dr. Valter Augusto Della-Rosa**, por seu profissionalismo, experiência e conhecimentos profundos generosamente partilhados sempre com humildade e paciência.

Às **Profªs. Drªs. Alessandra Samelli, Ivone Neves e Seisse Gabriela Sanches** pela minuciosa correção desse trabalho e contribuições no exame de qualificação que resultaram na melhora da qualidade deste trabalho.

Às amigas queridas **Janaina Patrício, Simone Quidicomo e Priscila Lucas Rodrigues**, pelo apoio, carinho e solidariedade nesta caminhada que nos uniu.

À amiga **Karina Araújo de Souza** por acreditar que o doutorado fosse possível, quem me sugeriu este programa de pós-graduação pela primeira vez.

Às amigas **Carolina Chibeni Zacare, Eloah Drobina e Ligiane Ferreira Martins** que fizeram minhas viagens a São Paulo sempre mais prazerosas, fazendo-me companhia e acolhendo-me com tanto carinho em suas casas.

Às amigas **Luciana Fracalossi Vieira e Gláucia Maruiti** por ter compartilhado todas as etapas deste estudo, sempre me apoiando no que fosse necessário.

À Faculdade Ingá-Uningá pela contribuição na fase de coleta dos dados, em especial ao amigo **Ney Stival** pela confiança.

Aos colegas de trabalho, **Dr. Marcos Endo, Dr. Rafael Cabral, Roseli Tortola, Silvania Marques e Sirlei Galvão**, em especial a minha companheira, **Luciene Cardoso Rodrigues**, com quem divido minha atividade profissional do consultório e que sempre compreendeu minhas ausências, me ajudando no que fosse necessário para atender a nossa agenda.

Às amigas **Rosimare Martins, Raquel Wenceslau, Michelle Oliveira, Aline Tomiasi, Karen Raiocovitch, Camila Quintino, Nathália Frederigue, Kassandra Mazzei, Orides Bedin, Mayara Singh, Dayane Zini, Tatiane Bonfim, Janiseth Russi e Renata Zanoni**, por estarem sempre presentes, compartilhando comigo sonhos, angústias e conquistas pessoais ou profissionais.

Às professoras **Maria Regina Alves, Cássia Cabrini, Lilian Jacob e Deborah Ferrari** pelo exemplo de competência e profissionalismo que marcaram a minha caminhada dentro da Fonoaudiologia, servindo-me como inspiração.

Às **alunas e ex-alunas do curso de Fonoaudiologia da Faculdade Ingá-Uningá** que sempre me acompanharam ao longo do doutorado e sempre torceram por mim.

Às famílias **Medeiros de Miranda e Ferreira de Mello** pelas orações de súplicas ao meu favor em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado **Alisson Villas Boas**, que contribuiu para fechar esse ciclo da minha vida com chave de ouro. Obrigada pelas palavras de incentivo e por meu fazer tão bem e feliz.

As **famílias dos deficientes auditivos** que compreenderam os motivos do meu estudo e se disponibilizaram em participar do estudo, depositando em mim confiança.

A todos, MEU MUITO OBRIGADO !

Deus os abençoe por TUDO que fizeram por mim !

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. - São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação – SBD/FMUSP, 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Quadros

Resumo

Summary

1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVO.....	6
3 - REVISÃO DE LITERATURA.....	8
3.1 - Etiologia da deficiência auditiva	8
3.2 - Emissões otoacústicas	8
3.1 - <i>Etiologia da deficiência auditiva</i>	8
3.1.1 - Deficiência auditiva de origem genética	10
3.2 - <i>Emissões otoacústicas</i>	21
3.2.1 - Emissões otoacústicas evocada produto de distorção	24
3.3 - <i>Avaliação da audição em frequências altas</i>	27
3.4 - <i>Emissões otoacústicas em frequências ultra-altas</i>	42
4 - MÉTODO.....	55
4.1 - <i>Casuística</i>	55
4.1.1 - Critérios de Inclusão	56
4.2 - <i>Procedimentos</i>	57
4.2.1 - Anamnese.....	59
4.2.2 - Inspeção Visual do Meato Acústico Externo	59
4.2.3 - Audiometria Tonal Liminar	59
4.2.4 - Logaudiometria.....	60
4.2.5 - Imitanciometria.....	61
4.2.6 - Emissões otoacústicas Evocada Produto de Distorção.....	61

4.3 - Método Estatístico	66
5 - RESULTADOS.....	68
5.1 - <i>Análise descritiva e comparativa dos exames de audiometria tonal liminar, imitanciometria e EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas.</i>	69
a) Avaliação comportamental da audição por meio da audiometria tonal liminar no grupo estudo e controle.....	69
b) Avaliação eletroacústica da audição por meio da imitanciometria no grupo estudo e controle	74
c) Avaliação eletroacústica da audição por meio das EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas no grupo estudo e controle.	78
d) Correlação entre os resultados das EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas com a audiometria tonal liminar e reflexo acústico no grupo estudo e controle.	86
5.2 - <i>Análise de correlação entre idade e EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas.</i>	88
5.3 - <i>Análise inferencial das EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas por meio de intervalos de referência e análise discriminante nos grupos estudo e controle.</i>	94
6 - DISCUSSÃO	104
6.1 - <i>Análise dos resultados dos exames de ATL, RA e EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas.</i>	104
6.2 - <i>Análise de correlação da idade e as EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas.</i>	116
6.3 - <i>Análise das EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas por meio de intervalos de referência e análise discriminante nos grupos estudo e controle.</i>	120
7 - CONCLUSÕES.....	129
8 - ANEXOS	132
9 - REFERÊNCIAS	142

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATL	Audiometria Tonal Liminar
CAPPesq	Análise de Projetos de Pesquisa
CCE	Célula Ciliada Externa
CCI	Célula Ciliada Interna
DA	Deficiência Auditiva
dB	Decibel
dBNPS	Decibel Nível de Pressão Sonora
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EOA	Emissões otoacústicas Evocada
EOA-PD	Emissões otoacústicas Evocada Produto de Distorção
EOA-S	Emissões otoacústicas Espontânea
EOA-T	Emissões otoacústicas Evocada por Estímulo Transiente
f1	Frequência 1 de estímulo para o exame de EOA-DP
f2	Frequência 2 de estímulo para o exame de EOA-DP
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GC	Grupo Controle
GE	Grupo Estudo
GJB2	Gap Junction Bet-2 Protein
Hz	Hertz
IPRF	Índice Percentual de Reconhecimento de Fala
K+	Potássio
SDT	Limiar de Detectabilidade de Fala

LRF	Limiar de Reconhecimento de Fala
L1	Nível de intensidade estabelecido para a frequência 1 nas EOA-PD
L2	Nível de intensidade estabelecido para a frequência 2 nas EOA-PD
MAE	Meato Acústico Externo
NA	Nível de Audição
OD	Orelha Direita
OE	Orelha Esquerda
OI	Orelha Interna
OM	Orelha Média
PEATE	Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
RA	Reflexo Acústico
S/R	Sinal/Ruído
UEM	Universidade Estadual de Maringá
VA	Via Aérea
VO	Via Óssea
35delG	Deleção de uma guanina (G) em uma sequência de seis guaninas na posição 30 a 35 dos nucleotídeos

Lista de Figuras

Figura 1 - Padrão de herança autossômica recessiva	12
Figura 2 - Localização da conexina 26 na orelha interna	13
Figura 3 - Estrutura da junção <i>gap</i> , conexon e conexina	14
Figura 4 - Íons K^+ no interior da cóclea, mostrando a expressão da Conexina 26 (verde e azul)	16
Figura 5 - Traço em vermelho indica a posição do gene <i>GJB2</i> no cromossomo 13 em q12.11	17
Figura 6 - Desenho esquemático da estrutura do gene <i>GJB2</i>	17
Figura 7 - Parâmetros do exame de EOA-PD na faixa de frequência de 1.000 a 8.000Hz.....	25
Figura 8 - Registro gráfico do exame de EOA-PD na faixa de frequência de 1.000 a 8.000Hz em ambas as orelhas	26
Figura 9 - Registro numérico do exame de EOA-PD na faixa de frequência de 1.000 a 8.000Hz em ambas as orelhas	26
Figura 10 - Parâmetros do exame de EOA-PD na faixa de frequência de 8.000 a 16.000Hz	44

Figura 11- Registro gráfico do exame de EOA-PD em frequência ultra-alta de 10.000 a 16.000Hz em ambas as orelhas	44
Figura 12 - Registro numérico do exame de EOA-PD na faixa de frequência de 8.000 a 16.000Hz	45
Figura 13 - Componentes do DP2000/Starkey: cartão PCMCIA (A), sonda (B), cabo de interface de sonda (C), olivas do tipo ER10C (D) e computador (E) ...	62
Figura 14 - Calibração da sonda in situ antes do registro de EOA-PD nas frequências de 1.000 a 8.000Hz	65
Figura 15 - Calibração da sonda in situ antes do registro de EOA-PD nas frequências de 9.000 a 16.000Hz.....	65
Figura 16 - <i>Box-plots</i> para o Limiar Auditivo (dB) em cada frequência da audiometria tonal liminar por grupo e orelha	72
Figura 17 - <i>Box-plots</i> e perfis medianos para o limiar auditivo (dB) em cada frequência da audiometria tonal liminar por grupo	74
Figura 18 - <i>Box-plots</i> do reflexo acústico contralateral (dB) em cada frequência por grupo e orelha	76
Figura 19 - <i>Box-plots</i> e perfis medianos do reflexo acústico contralateral (dB) em cada frequência por grupo	77

Figura 20 - Box-plots para EOA-PD (dBNPS) em cada frequência convencional por grupo e orelha	80
Figura 21 - Box-plots e perfis medianos para EOA-PD (dBNPS) por grupo nas frequências convencionais.....	81
Figura 22 - <i>Box-plots</i> para EOA-PD (dBNPS) em cada frequência ultra-alta por grupo e orelha	82
Figura 23 - <i>Box-plots</i> e perfis medianos para EOA-PD (dBNPS) por grupo nas frequências ultra-altas.....	85
Figura 24 - Diagramas de dispersão das EOA-PD e a idade nos dois grupos em cada frequência convencional da orelha direita	89
Figura 25 - Diagramas de dispersão das EOA-PD e a idade nos dois grupos em cada frequência convencional da orelha esquerda	89
Figura 26 - Diagramas de dispersão das EOA-PD e a idade nos dois grupos em cada frequência ultra-alta na orelha direita	90
Figura 27 - Diagramas de dispersão das EOA-PD e a idade nos dois grupos em cada frequência ultra-alta na orelha esquerda	91
Figura 28 - Percentis de ordem 5% e 95% das EOA-PD (dBNPS) nas frequências convencionais do grupo estudo	95

Figura 29 - Percentis de ordem 5% e 95% das EOA-PD (dBNPS) nas frequências convencionais do grupo controle	95
Figura 30 - Percentis de ordem 5% e 95% das EOA-PD (dBNPS) nas frequências ultra-altas do grupo estudo	96
Figura 31 - Percentis de ordem 5% e 95% das EOA-PD (dBNPS) nas frequências ultra-altas do grupo controle	96
Figura 32 - Diagrama de dispersão das EOA-PD correlacionando as frequências no grupo estudo e os limites de referência para EOA-PD estimados no grupo controle para as frequências convencionais	97
Figura 33 - Diagrama de dispersão das EOA-PD correlacionado as frequências no grupo estudo e limites de referência para EOA-PD estimados no grupo controle para as frequências ultra-altas.....	98
Figura 34 - Diagrama de dispersão das EOA-PD em 1.969 Hz e 5.297Hz.....	99
Figura 35 - Diagrama de dispersão das EOA-PD em 8.203 Hz e 10.641Hz..	100

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição da ocorrência de resultados normais e alterados na audiometria tonal liminar entre os grupos estudo e controle.....	69
Tabela 2 - Distribuição dos tipos de alterações observadas na audiometria tonal liminar entre os grupos estudo e controle	70
Tabela 3 - Comparação entre orelhas direita e esquerda com relação aos resultados obtidos na audiometria tonal liminar nos grupos estudo e controle	71
Tabela 4 - Comparação entre as médias das duas orelhas nos grupos estudo e controle com relação aos resultados obtidos na audiometria tonal liminar	73
Tabela 5 - Distribuição da ocorrência de resultados normais e alterados dos reflexos acústicos contralaterais entre os grupos estudo e controle	75
Tabela 6 - Comparação das médias entre as orelhas direita e esquerda com relação aos resultados obtidos no reflexo acústico contralateral nos grupos estudo e controle	76
Tabela 7 - Comparação das médias das orelhas direita e esquerda entre os grupos estudo e controle com relação aos resultados obtidos no reflexo acústico contralateral	77

Tabela 8 - Distribuição da ocorrência de resultados normais e alterados nas EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas entre os grupos.....	78
Tabela 9 - Comparação das médias entre as orelhas direita e esquerda com relação aos resultados obtidos nas EOA-PD em frequências convencionais...	79
Tabela 10 - Comparação das médias entre os grupos estudo e controle com relação aos resultados obtidos nas EOA-PD em frequências convencionais...	81
Tabela 11 - Comparação das médias entre as orelhas direita e esquerda com relação aos resultados obtidos nas EOA-PD em frequências ultra-altas	83
Tabela 12 - Comparação das médias entre os grupos estudo e controle com relação aos resultados obtidos nas EOA-PD em frequências ultra-altas	84
Tabela 13 - Correlação de Pearson entre os resultados obtidos nos reflexos acústicos contralaterais e EOA-PD (dBNPS) em ambas as orelhas e grupos .	86
Tabela 14 - Valores observados do coeficiente de correlação de Pearson da idade e as EOA-PD (dBNPS) nas frequências convencionais por grupo e orelha	92
Tabela 15 - Valores observados do coeficiente de correlação de Pearson da idade e as EOA-PD (dBNPS) nas frequências ultra-altas por grupo e orelha ..	93

Tabela 16 - Percentis de ordem 5% e 95% das EOA-PD (dBNPS) em cada frequência do grupo estudo e grupo controle 94

Tabela 17 - Matriz de classificação obtida na análise discriminante considerando as EOA-PD em 1.969Hz e 5.297Hz 101

Tabela 18 - Matriz de classificação obtida na análise discriminante considerando as EOA-PD em 8.203 Hz e 10.641Hz..... 101

Lista de Quadros

Quadro 1 - Categorias de análise dos limiares audiométricos na audiometria tonal liminar.....60

Quadro 2 - Valores das frequências primárias (f_1 e f_2) do estímulo e da resposta do produto distorcido $2f_1-f_2$ para as frequências convencionais.....63

Quadro 3 - Valores das frequências primárias (f_1 e f_2) do estímulo e da resposta do produto distorcido $2f_1-f_2$ para as frequências ultra-altas.....63

RESUMO

Mello, JM - Função coclear em frequências ultra-altas em pais de indivíduos com deficiência auditiva autossômica recessiva [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUÇÃO: Na deficiência auditiva não síndrômica de herança autossômica recessiva, causada por alteração no gene *GJB2* (*Gap Junction Bet-2 Protein*), os pais de indivíduos com deficiência auditiva são portadores em heterozigose de um alelo recessivo que causa a surdez, porém, são assintomáticos, mas podem apresentar alterações auditivas precoces e discretas. **OBJETIVO:** Avaliar a função coclear em pais de indivíduos com deficiência auditiva de herança autossômica recessiva por meio das Emissões Otoacústicas Evocadas Produto de Distorção (EOA-PD) em frequências convencionais e em frequências ultra-altas, comparando as respostas do grupo controle pareadas por gênero e idade. **MÉTODO:** Foram avaliados 56 indivíduos, entre 20 a 58 anos de idade, divididos em dois grupos, o Grupo Estudo (GE), constituído por 28 pais de deficientes auditivos decorrentes de herança autossômica recessiva, sendo 14 mulheres com idade entre 20 a 55 anos (média 32,8 anos) e 14 homens com idade entre 20 a 58 anos (média 35,2), e o Grupo Controle (GC), formado por indivíduos sem queixa auditiva, composto por 14 homens e 14 mulheres com idades pareadas ao GE. Os indivíduos foram submetidos aos exames de Audiometria Tonal Liminar (ATL), Imitanciometria, incluindo a timpanometria e Reflexo Acústico (RA), e EOA-PD em frequências convencionais e em frequências ultra-altas. **RESULTADOS:** Não houve diferença estatisticamente significativa entre as orelhas e grupos nos achados da ATL e RA, porém, nas respostas de EOA-PD, o GE apresentou diferença estatisticamente significativa em todas as frequências em comparação ao GC. A Correlação de Pearson entre a ATL e as EOA-PD, entre as orelhas e entre os grupos, mostrou correlação negativa entre as orelhas e grupos, indicando que, com o aumento no nível de resposta das EOA-PD, ocorre melhora nos limiares auditivos. A correlação de Pearson entre os resultados dos RA e as EOA-PD não demonstrou correlação significativa para ambos os grupos avaliados. A correlação de Pearson entre a idade e as EOA-PD, em frequências convencionais, mostrou correlação negativa significativa em algumas frequências, entretanto, não houve correlação entre a idade e as EOA-PD em frequências ultra-altas. Foi utilizado o intervalo de referência, diagramas de dispersão e análise discriminante para investigar-se se houve diferença entre as EOA-PD em frequências convencionais e em frequências ultra-altas, sendo que as EOA-PD em frequências convencionais mensuraram com maior precisão os sujeitos do GE, em relação às frequências ultra-altas. **CONCLUSÃO:** As EOA-PD, tanto para as frequências convencionais, quanto para as frequências ultra-altas, foram capazes de distinguir os indivíduos do GE e do GC, 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.

Descritores: Testes Auditivos, Emissão Otoacústica, Audição, Genética, Mutação.

SUMMARY

Mello, JM - Cochlear function in ultra-high frequencies in parents of individuals with autosomal recessive hearing loss [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUCTION: In nonsyndromic hearing loss of recessive autosomal heritage, caused by changes in the gene GJB2 (Gap Junction Bet-2 Protein), parents of individuals with hearing loss are heterozygous carriers of a recessive allele which causes deafness, however, are asymptomatic, but may present early and mild hearing changes. **OBJECTIVE:** Assessing the cochlear function in parents of individuals with hearing loss of recessive autosomal heritage through Distortion Product Otoacoustic Emissions (DPOAE) in conventional frequencies and in ultra-high frequencies, comparing the responses of the control group paired by gender and age. **METHOD:** 56 individuals were assessed, aged between 20 and 58 years old, divided into two groups, the Study Group (GE), composed of 28 parents of hearing impaired people due to recessive autosomal heritage, 14 women being 20 to 55 years old (32.8 years old average) and 14 men being 20 to 58 years (35.2 years old average), and the Control Group (GC) formed by individuals without hearing complaints, composed of 14 men and 14 women being paired according to the age of GE. The individuals underwent examinations of Pure Tone Audiometry (PTA), Immittance, including tympanometry and Acoustic Reflex (AR), and DPOAE in conventional frequencies and ultra-high frequencies. **RESULTS:** There was no statistically significant difference between the ears and the groups in the findings of PTA and AR; however, in the responses of DPOAE, the GE presented a statistically significant difference in all the frequencies compared to the GC. The Pearson Correlation between PTA and DPOAE, between the ears and between the groups, showed a negative correlation between the ears and the groups, indicating that, with the increase in the level of response of DPOAE, there is improvement in hearing thresholds. The Pearson Correlation between the results of AR and DPOAE showed no significant correlation for both groups assessed. The Pearson Correlation between age and DPOAE, in conventional frequencies, showed a significant negative correlation in some frequencies, however, there was no correlation between age and DPOAE in ultra-high frequencies. Reference range, scatter plots and discriminant analysis were used to investigate whether there was a difference between DPOAE in conventional frequencies and in ultra-high frequencies, given that DPOAE in conventional frequencies measured with greater precision the individuals from GE, in relation to the ultra-high frequencies. **CONCLUSION:** DPOAE, both for conventional frequencies and ultra-high frequencies, were able to distinguish individuals from GE and GC, suggesting that heterozygous individuals for the mutation of GJB2 gene may present damage in the active process of external ciliated cells before the clinical manifestation via altered results in the conventional hearing-aid assessment. Descriptors: Hearing Tests, Otoacoustic Emission, Hearing, Genetics, Mutation.

Introdução

1 - INTRODUÇÃO

A deficiência auditiva (DA) pode ser causada por fatores ambientais e fatores genéticos. Dentre os casos de origem genética, 70% podem manifestar-se isoladamente, sendo denominados de DA não-sindrômica, e 30% dos casos podem estar associados a outras anomalias, constituindo a DA sindrômica (Cohen e Gorlin, 1995; Alves e Ribeiro, 2007).

Na DA não-sindrômica, existe uma heterogeneidade de herança genética, classificada como autossômica dominante, autossômica recessiva, ligada ao sexo e mitocondrial. A incidência varia de 75% a 80% com transmissão autossômica recessiva, de 10% a 15% mostram transmissão autossômica dominante e de 2% a 3% apresentam herança mitocondrial ou alteração no cromossomo X (Van Camp *et al.*, 1997; Bitner-Glindzicz, 2002; Godinho *et al.*, 2003; Van Camp e Smith, 2011).

Os autores Gasparini *et al.* (1997) e Bitner-Glindzicz (2002) enfatizaram a ocorrência de mais de 50% dos casos de DA não sindrômica autossômica recessiva a mutações decorrentes no gene *GJB2* (*Gap Junction Bet-2 Protein*) responsável pela síntese da conexina 26, especialmente a 35delG, caracterizada por uma deleção de uma guanina em um conjunto de seis, localizadas na posição 30-35, a partir do nucleotídeo 1, da região codificadora no exon 2 do gene *GJB2*.

Conexinas são proteínas de junção que agem na comunicação intercelular, denominadas junções do tipo *gap*. Na cóclea, essas proteínas realizam papel crucial na função fisiológica relacionada à homeostase iônica,

levando à modificação na estrutura e funcionamento das junções *gap*, promovendo a manutenção de altas concentrações de potássio intracelular, com consequente intoxicação celular (Lefevbre e Van de Water, 2000; Shibata *et al.*, 2001).

A relação genótipo e fenótipo tem sido investigada nos deficientes auditivos de herança autossômica recessiva que apresentam DA neurossensorial, não progressiva, geralmente de grau severo a profundo e de manifestação pré-lingual (Campbell *et al.*, 1997; Cohn *et al.*, 1999; Keats e Berlin, 1999; Bitner-Glindzicz, 2002). Entretanto, existem poucos estudos da relação genótipo *versus* fenótipo nos sujeitos heterozigotos, ou seja, aqueles ouvintes que possuem um alelo normal e o outro mutado, sendo estes, os pais de surdos com DA autossômica recessiva e que transmitem os genes nas populações. Assim se justificam estudos que identifiquem a presença de alterações auditivas, mesmo que mínimas, em pais com genótipos heterozigotos, para se tentar associar estas aos seus genótipos.

Os estudos de Engel-Yeger *et al.* (2002) e Silva *et al.* (2010) mostraram que as mensurações de audição em pais de deficientes auditivos de herança autossômica recessiva são de utilidade na identificação de DA discretas; além de poder caracterizar, no futuro, as famílias que possam apresentar indivíduos portadores de genes recessivos que causam DA, principalmente nos casos em que ainda não haja testes moleculares disponíveis.

Com base nas considerações apresentadas por Li *et al.* (2003), Carvallo (2002) e Knight *et al.* (2007), a detecção de alterações mínimas na

audição, por meio da avaliação audiológica convencional, incluindo a audiometria tonal limiar e a imitanciometria, não tem sido eficaz. Em compensação, o exame de emissão otoacústica constitui um método eficiente para detectar alterações discretas e precoces na audição de pais de sujeitos com DA de herança autossômica recessiva (Engel-Yeger *et al.*, 2002; Engel-Yeger *et al.*, 2003; Franzé *et al.*, 2005).

Com o surgimento do procedimento de emissões otoacústicas evocadas produto de distorção em frequências ultra-altas que compreende a faixa de 9.000 a 16.000Hz, tornou-se possível detectar alterações auditivas precoces nestas frequências, antes que o dano coclear progrida para as baixas frequências (Dunckley e Dreisbach, 2004).

A vantagem em pesquisar frequências mais altas é a obtenção de maiores informações sobre a função coclear, uma vez que a faixa de audição humana compreende o espectro de 20 a 20.000Hz, e as frequências altas localizadas na base do ducto coclear geralmente são as primeiras a serem acometidas nas alterações da orelha interna, contribuindo para a decodificação do sinal da fala, especialmente em ambientes ruidosos (Carvalho, 2002; Martinho *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2007).

Como preconizam Frank e Dreisbach (1991), o estudo da audição em frequências ultra-altas é importante para o monitoramento de sujeitos que apresentam, ou sobre os quais incidem, suspeita de ocorrência de transtornos relacionados à audição. Dentre eles, merece destaque a

investigação do comprometimento auditivo em familiares de portadores de DA de origem genética.

Com base nas considerações apresentadas, a investigação das frequências ultra-altas nos pais deficientes auditivos de herança autossômica recessiva caracteriza um instrumento de avaliação para que as alterações auditivas possam ser identificadas precocemente, além de constituir uma ferramenta útil na identificação de indivíduos com risco para apresentar alelos mutados em genes responsáveis pela DA.

A hipótese que norteia nosso estudo é a de que pais heterozigotos do alelo mutante da DA apresentem uma diminuição nas respostas de emissões otoacústicas, quando comparados a um grupo controle sem queixa de DA, pareado por gênero e idade. Nesse sentido, esse estudo busca indicadores que diferenciem os pais dos deficientes auditivos de herança autossômica recessiva, comparando-os a um grupo controle.

Objetivo

2 - OBJETIVO

O objetivo geral deste estudo foi o de analisar a função coclear em pais de sujeitos com deficiência auditiva de herança autossômica recessiva do gene *GJB2*.

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

- Traçar o perfil audiológico com base no limiar tonal e limiar do reflexo acústico em pais de sujeitos com deficiência auditiva de herança autossômica recessiva e analisá-lo em comparação com as respostas de um grupo controle sem queixa de deficiência auditiva pareado por gênero e idade.
- Verificar o nível de resposta das emissões otoacústicas evocadas produto de distorção (EOA-PD) em frequências convencionais, entre 500 a 8.000Hz, e em frequências ultra-altas entre 9.000 a 16.000Hz, em pais de sujeitos com DA de herança autossômica recessiva do gene *GJB2*, comparando-as com as respostas do grupo controle pareado por gênero e idade.
- Correlacionar o nível de respostas das EOA-PD com o limiar da audiometria tonal e o limiar de reflexo acústico.
- Definir critérios de classificação para diferenciação entre os grupos, a partir dos resultados de EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas.
- Analisar a correlação entre idade e as EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas, em ambos os grupos.

Revisão de Literatura

3 - REVISÃO DE LITERATURA

O capítulo de revisão da literatura foi organizado por assunto, privilegiando, quando possível, a ordem cronológica e buscando, sobretudo, respeitar o encadeamento de idéias. Os tópicos apresentados neste capítulo foram:

3.1 - Etiologia da deficiência auditiva

3.1.1 - Deficiência auditiva de origem genética

3.2 - Emissões otoacústicas

3.2.1- Emissões otoacústicas evocada produto de distorção

3.3 - Avaliação da audição em frequências altas

3.4 - Emissões otoacústicas em frequências ultra-altas

3.1 - Etiologia da deficiência auditiva

A deficiência auditiva (DA) é um rebaixamento da função auditiva, fora dos limites da normalidade que reduz a acuidade e a inteligibilidade da linguagem oral a um grau de inadequação para interpretação e/ou aprendizagem. Assim, o impacto da DA é medido por meio da habilidade para se comunicar por meio da linguagem oral, podendo ocasionar efeitos psico-sociais que afetem diretamente o desenvolvimento global (Roslyng-Jensen, 1997; Azevedo, 2004).

Embora a DA seja um problema difundido, é difícil prever o impacto da DA em um indivíduo em particular. Porém, alguns fatores contribuem para determinar o desenvolvimento das habilidades comunicativas, tais

como: a idade em que a DA ocorre ou momento de aparecimento da DA (pré-lingual, perilingual e pós-lingual); natureza do problema auditivo (condutiva, neurossensorial, mista e central) e severidade do problema (grau leve, moderado, severo e profundo) (Northern e Downs, 1989; Kalatzis e Petit, 1998).

A etiologia da DA é multifatorial, incluindo fatores ambientais e genéticos, porém, a etiologia genética tende a se tornar mais frequente, na medida em que ocorre melhoria das condições de saúde pública (Lubianca Neto e Pereira, 1999; Alves e Ribeiro, 2007).

Em países desenvolvidos, 50% dos casos de DA isolada têm origem genética. Porém, no Brasil, Piatto e Maniglia (2001) observaram que cerca de 80% dos casos são causados por fatores ambientais. Entretanto, Hoffmann *et al.* (2008) ressaltaram que, com a melhoria da atenção à saúde materno-infantil em países em desenvolvimento como o Brasil, a proporção dos casos de origem genética deve aumentar. Com isto, supõe-se que a prevalência das origens ambiental e genética varia segundo o grau de desenvolvimento sócio-econômico e o hábito local, abrangendo o estado nutricional, ocupação profissional, etnias, cultura e, principalmente, o grau de informação sobre a prevenção (Schrijver, 2004).

Para Simões e Maciel-Guerra (1992) e Kochhar *et al.* (2007), a predominância acentuada dos casos de etiologia ambiental reflete as condições médico-sanitárias da população, cuja melhoria depende da profilaxia da DA. É importante levar em consideração, ainda, que o diagnóstico tardio da DA dificulta ainda mais a determinação da etiologia, e

que, à medida que ocorrem melhorias no diagnóstico audiológico, a significância de fatores genéticos aumenta, como tem ocorrido em muitos países desenvolvidos.

Em nosso meio, a falta de informações por parte da família sobre as intercorrências durante a gestação, o parto e o período perinatal costumam dificultar o diagnóstico etiológico nos casos de DA de origem ambiental. Com isso, é mais provável que casos de origem não genética acabem sendo rotulados como sendo de origem indefinida. No entanto, discernir a DA de origem genética daquela de causa ambiental não é uma tarefa simples. Neste caso, os estudos moleculares podem ajudar a esclarecer dúvidas quanto ao diagnóstico etiológico da DA (Denoyelle *et al.*, 1999).

Deste modo, a etiologia genética da DA passa a ter cada vez maior relevância dentro da audiologia clínica, uma vez que muitos portadores de DA com causa indefinida podem apresentar alterações genéticas.

3.1.1 - Deficiência auditiva de origem genética

Muitos genes contribuem para o desenvolvimento e funcionamento normal da orelha, principalmente da orelha interna (OI). Consequentemente, defeitos em qualquer um desses genes podem ocasionar a DA. Contudo, a DA de origem genética é altamente heterogênea e suas bases são complexas, pois mutações alélicas em alguns genes podem causar DA recessiva ou dominante, enquanto mutações no mesmo gene podem causar DA sindrômica e não-sindrômica. Assim, as disfunções genéticas são

causadas por uma ou mais mutações, no código de um gene particular, privando o gene de funcionar adequadamente (Thompson *et al.*, 2002).

A DA sindrômica corresponde a 30% dos casos e ocorre associada a uma variedade de outras anomalias, compondo quadros clínicos de síndromes específicas, sendo as dificuldades de aprendizagem, distúrbios intelectuais, distúrbios de atenção, distúrbios visuais e paralisia cerebral as mais comuns, enquanto a DA não-sindrômica corresponde a 70% dos casos e se manifesta isoladamente, apresentando uma heterogeneidade no padrão de herança, sendo classificada em autossômica dominante, autossômica recessiva, ligada ao sexo e mitocondrial. A incidência varia de 75-80% com transmissão autossômica recessiva, 10-15% mostram transmissão autossômica dominante e 2-3% dos casos apresentam herança mitocondrial ou relacionada a alterações no cromossomo X (Cohen e Gorlin, 1995; Van Camp *et al.*, 1997; Bitner-Glindzicz, 2002; Godinho *et al.*, 2003; Roush *et al.*, 2004).

O conhecimento da genética da DA avançou rapidamente durante a última década do século XX. Vários genes responsáveis pela audição normal foram identificados e numerosos outros foram localizados em regiões cromossômicas específicas. De acordo com levantamento realizado na homepage de Van Camp e Smith, foram descritos 25 genes responsáveis pela DA não-sindrômica de transmissão autossômica dominante, 41 genes com transmissão autossômica recessiva, 2 genes com transmissão ligada ao cromossomo X e 7 genes com transmissão mitocondrial. Continuamente estão sendo localizados e identificados novos genes, estimando-se que o

número total desses locos fique próximo de 150. Na DA hereditária não-sindrômica, são próximos de 80 locos autossômicos recessivos, 60 dominantes, 8 ligados ao cromossomo X e 5 mutações no DNA (ácido desoxirribonucléico) mitocondrial. Os genes encontram-se listados na Hereditary Hearing Loss Homepage, e são atualizados periodicamente no site <http://hereditaryhearingloss.org> (Van Camp e Smith, 2011).

Segundo Petersen (2002), a forma de herança autossômica recessiva se expressa em homozigotos e, portanto, devem ter herdado um alelo mutante de cada genitor, podendo ser transmitidos nas famílias por numerosas gerações sem manifestar a DA, sendo que o risco dos filhos receberem o alelo recessivo de cada genitor e serem afetados por ele é de $\frac{1}{4}$, ou seja, de 25%, podendo aumentar a probabilidade se houver consanguinidade. Na herança autossômica recessiva, os pais do sujeito com DA são portadores em heterozigose de um alelo recessivo que causa a DA, e, em teoria, são assintomáticos, conforme demonstra a Figura 1.

Figura 1 - Padrão de herança autossômica recessiva

Dentre os casos de DA não-sindrômica de herança autossômica recessiva, destacam-se as mutações recorrentes no gene *Gap Junction Bet-2 Protein (GJB2)*, o qual codifica a proteína conexina 26, por ser relacionado a mais de 50% dos casos de DA não-sindrômica autossômica recessiva (Gasparini *et al.*, 1997; Bitner-Glindzicz, 2002).

Na OI, a conexina 26 está presente em células epiteliais não sensoriais, incluindo as células do limbo espiral e as células de sustentação, mostrado em verde, em células do sistema do tecido conjuntivo, constituído por fibrócitos do ligamento espiral e limbo espiral, e em células basais da estria vascular, representado em amarelo na Figura 2.

Figura 2 - Localização da conexina 26 na orelha interna

Fonte: http://www.nature.com/mt/journal/v16/n2/fig_tab/6300351f3.html

Conexinas são proteínas de junção que agem na comunicação intercelular, denominadas de junções comunicantes do tipo *gap*. Tais junções são formadas por conjuntos de pequenos canais que permitem a passagem direta de íons e outras pequenas moléculas para o interior de

células adjacentes, abrindo e fechando em resposta a estímulos. Portanto, são regiões de contato entre as células e amplamente distribuídas entre os diferentes tecidos, sendo importantes na comunicação intercelular. Uma junção *gap* é um agrupamento de dois conexons entre duas membranas plasmáticas separadas por um espaço de 2-3nm, sendo que cada conexon é formado por seis proteínas transmembrânicas, as conexinas (Rabionet *et al.*, 2000), conforme ilustra a Figura 3.

Figura 3 - Estrutura da junção *gap*, conexon e conexina

Fonte: <http://www.landesbioscience.com/curie/chapter/852/>

Na espécie humana, há 14 tipos distintos de conexinas, cada uma codificada por um gene diferente. Na DA não-sindrômica de herança autossômica recessiva, a alteração ocorre no gene *GJB2*, o qual codifica a conexina 26. A proteína conexina 26 realiza papel crucial na função fisiológica relacionada à homeostase iônica coclear e no processo endococlear. Desta forma, mutações no gene *GJB2*, responsável pela síntese da conexina 26, levam à modificação na estrutura e funcionamento

das junções *gap*, contribuindo para a manutenção de altas concentrações de potássio (K^+) intracelular, o que ocasiona intoxicação das células do órgão espiral, resultando em uma DA (Lefebvre e Van de Water, 2000; Shibata *et al.*, 2001).

Para o entendimento das consequências de mutações do gene que regula o processo da audição, há necessidade do conhecimento da fisiologia coclear normal. Após estímulo sonoro, a energia mecânica do som é convertida em sinal elétrico (transdução mecanoelétrica) nas células ciliadas externas (CCE) da cóclea. Na superfície apical dessas células ciliadas, projetam-se os estereocílios, os quais oscilam em resposta ao som que, secundariamente ao movimento do estribo na janela oval, movimentam o líquido que circunda as células ciliadas. Essa deflexão dos estereocílios abre os canais de transdução, permitindo um influxo de K^+ da endolinfa para ambas as células ciliadas, causando despolarização da membrana celular, e ativando os canais de cálcio da membrana, sendo que o subsequente influxo de cálcio provoca liberação de vesículas, contendo neurotransmissores, nos terminais sinápticos do VIII par craniano (Friedman *et al.*, 2000).

O fluxo de íons pelos canais de transdução é constante e produto de forças eletromotivas, ou carga positiva que é mantida pela bomba de K^+ por meio da estria vascular, e a carga intracelular negativa, ou potencial de repouso da membrana celular. Este constante fluxo de íons é chamado de "corrente estacionária". A deflexão dos estereocílios modula esta corrente estacionária com abertura de canais de K^+ , de forma que o fluxo de corrente é aumentado quando o estereocílio é defletido para fora do modíolo (direção

excitatória), e o fluxo da corrente é diminuído quando o estereocílio é defletido na direção do modíolo (direção inibitória) (Pickles *et al.*, 1994).

Após estímulo sonoro, as células ciliadas ficam hiperpolarizadas, com alta concentração de K^+ intracelular. Para que nova excitação da célula seja possível, o K^+ tem que ser removido. Esse movimento de íons K^+ das células ciliadas para as células de sustentação da cóclea, retornando para a endolinfa, é feito por meio das junções do tipo *gap* existentes entre as células de sustentação, conforme demonstra a Figura 4 (Friedman *et al.*, 2000; Davis, 2003).

Figura 4 - Íons K^+ no interior da cóclea, mostrando a expressão da Conexina 26 (verde e azul)

Fonte: Steel (1999)

As mudanças ocorridas nas junções *gap* interferem na reciclagem de K^+ durante a transdução auditiva, resultando em falta de funcionamento das células ciliadas e distúrbio do potencial elétrico endococlear, ou ainda na sobrevivência das células sensoriais do epitélio coclear (Kikuchi *et al.*, 2000).

O mapeamento do primeiro gene para DA não-sindrômica de herança autossômica recessiva foi realizado por Guilford *et al.* (1994a), por meio de análise de ligação. O gene foi localizado no braço longo do cromossomo 13 e corresponde ao gene da Conexina 26 (*GJB2*), como demonstra a Figura 5.

Figura 5 - Traço em vermelho indica a posição do gene *GJB2* no cromossomo 13 em q12.11

O gene *GJB2* contém 5.427 pares de bases, com apenas dois exons. No cromossomo 13 (13q12), o exon 1 inicia-se na posição do nucleotídeo 1.741.611 e o exon 2 termina na posição 1.747.037 (NCBI; OMIM, 2007 - nº NT024524). A região codificadora está situada no exon 2 (Figura 6). O primeiro mapeamento do gene para DA não-sindrômica autossômica recessiva foi descoberta em uma família numerosa e com alto grau de consanguinidade, proveniente de uma população isolada do nordeste da Tunísia (Kelsell *et al.*, 1997; Mueller, 2001).

Figura 6 - Desenho esquemático da estrutura do gene *GJB2*

Já foram descritas 111 mutações no gene *GJB2* da conexina 26, tendo a maioria delas expressão na cóclea (Ballana *et al.*, 2011). Predomina, nesse gene, uma mutação denominada 35delG caracterizada por uma deleção de uma guanina num conjunto de seis, localizadas na posição 30-35, a partir do nucleotídeo 1, da região codificadora no exon 2 do gene *GJB2*, presente em 60% a 80% dos casos de DA (Zelante *et al.*, 1997; Denoyelle *et al.*, 1999; Wilcox, 1999; Sundstrom *et al.*, 1999). Outras mutações que ocorrem no gene *GJB2* estão presentes em grupos étnicos específicos, como por exemplo, a mutação 167delT, comum na população judaica (Morell *et al.*, 1998), a mutação 235delC, prevalente nos asiáticos (Liu *et al.*, 2002), e a mutação R143, comum em africanos (Brobbly *et al.*, 1998).

A presença da mutação 35delG em heterozigose pode ser encontrada em até 4% dos indivíduos em populações de diferentes regiões geográficas. No Brasil, Piatto *et al.* (2005a) investigaram a prevalência da mutação 35delG em uma população de 223 neonatos do Hospital de Base de São José do Rio Preto, São Paulo, tendo encontrado uma prevalência de 2,24% (1:44,6) de heterozigotos portadores dessa mutação. Já no estudo de Sartorato *et al.* (2000), realizado na região de Campinas em 620 neonatos, revelou a presença de 6 heterozigotos, o que permitiu estimar uma frequência de 1:100.

Magni (2007) analisou 144 deficientes auditivos não consanguíneos, portadores de DA neurosensorial bilateral, pré-lingual, não-sindrômica, e verificou que a mutação 35delG foi detectada em 29 homozigotos (20,1%) e

em 21 heterozigotos (14,6%), sendo que essa mutação foi distribuída em 18 casos familiares (45,0%; 18/40) e em 32 casos esporádicos (30,8%; 32/104).

Para verificar se a composição étnica das diferentes regiões do Brasil causa variação da frequência da mutação 35delG, um rastreamento desta mutação foi realizado em 1.856 neonatos de dez cidades em diferentes regiões do Brasil por Oliveira *et al.* (2007). A mutação 35delG foi encontrada em 25 indivíduos (1,35%, 1:74). A frequência da mutação foi de 1:47 no Norte, 1:64 no Sudeste, 1:85 no Sul e 1:124 no Nordeste, mas estas diferenças não foram significativas. O estudo epidemiológico foi realizado em um grande número de amostras selecionadas ao acaso, distribuídas na população em geral, espelhando a composição heterogênea da população brasileira, e por tal razão, encontra dificuldades de autoclassificação quanto à origem étnica.

Cordeiro-Silva *et al.* (2010) realizaram um estudo com o objetivo de determinar a prevalência da mutação 35delG relacionada a GJB2 em portadores de DA neurossensorial, residentes no estado do Espírito Santo, no Brasil. Foram avaliados 77 indivíduos com DA neurossensorial de moderada a profunda. Os resultados demonstraram que 88,3% apresentaram genótipo normal para as mutações estudadas, 1,3% foram heterozigotos compostos, 3,9% homozigotos para a mutação 35delG, 6,5% heterozigotos para 35delG. A frequência do alelo 35delG na amostra foi de 7,8%.

A cada dia surgem casos de DA em que são encontradas mutações no gene da conexina 26, porém, a expressão clínica diverge de caso para

caso. Além disto, poucos são os estudos que descrevem, detalhadamente, as características audiológicas completas da DA decorrente da mutação no gene *GJB2*. Por isto, neste item, serão apresentados brevemente alguns estudos que correlacionam o genótipo e o fenótipo da DA.

Relativo ao tipo de DA nos indivíduos com mutação no gene *GJB2*, a DA neurosensorial é encontrada em ambas as orelhas, já que é resultante de transtornos de estruturas da OI (Guilford *et al.*, 1994b; Claros *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1998; Denoyelle *et al.*, 1999; Murgia *et al.*, 1999; Steel, 1999; Piatto *et al.*, 2005b; Van Camp e Smith, 2011).

Contudo, a extensão do grau da DA na mutação do gene *GJB2* é bastante diversificada, sendo que alguns autores consideram o grau da DA variando de leve/moderada a profunda (Steel, 1999); grau moderado (Denoyelle *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2002; Matsunaga *et al.*, 2006); grau moderado a profundo (Murgia *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2004; Piatto *et al.*, 2007); e grau severo ou profundo (Denoyelle *et al.*, 1999; Godinho *et al.*, 2003; Magni, 2007; Piatto *et al.*, 2009).

Murgia *et al.* (1999) e Schmidt e Tochetto (2009) acrescentaram que a expressão clínica de mutações no gene *GJB2* diverge de caso para caso, podendo ser encontrados diferentes graus de DA em indivíduos de uma mesma família com o mesmo genótipo.

A maioria das deficiências autossômicas recessivas tem bastante consistência fenotípica, mesmo entre irmãos, o que não é observado para o gene *GJB2*, em que a variabilidade nos graus da DA é grande, devido à

possibilidade de outros fatores modularem a expressão do gene mutante (Oliveira *et al.*, 2002).

Para Steel (1999), a variabilidade nos graus da DA sugere que outros fatores possam modificar os efeitos da mutação, possivelmente variações em outros genes de conexinas que possam compensar a conexina 26 inativa na função coclear.

A justificativa de Oliveira *et al.* (2002) para haver divergência quanto à severidade da DA é que alterações na conexina 26 podem afetar diferentemente o desenvolvimento do sistema auditivo, resultando em variações no grau de DA, ou permitindo assimetria entre as orelhas. Além disto, influências ambientais, tais como ruídos e drogas ototóxicas, podem potencializar os defeitos causados por mutações no gene *GJB2*, aumentando assim, o grau da DA.

3.2 - Emissões otoacústicas

O inglês David Kemp, no final da década de 70, descreveu o fenômeno das emissões otoacústicas, baseado no conceito descrito por Gold (1948), sobre a ressonância da membrana basilar, o que possibilitou identificar as características ativas e não lineares da mecânica coclear e a subsequente introdução de um equipamento capaz de registrá-las. A descoberta das emissões otoacústicas causou grande repercussão no meio audiológico por caracterizar uma avaliação confiável da função pré-neural da OI de forma rápida, não-invasiva, objetiva, sensível e seletiva por frequência (Frota e Lório, 2002; Soares e Carvalho, 2009).

As emissões otoacústicas são sons produzidos pela cóclea, mais especificamente pelas CCE, que são transmitidos de forma reversa por meio da orelha média (OM) e convertidos em sinal acústico na orelha externa (OE). Assim, a cóclea de indivíduos com audição normal apresenta a capacidade de emitir uma série de reflexos acústicos em resposta a um estímulo sonoro (Kemp, 1978).

As emissões otoacústicas constituem um subproduto do processo de retroalimentação mecânica não linear da cóclea em que são fornecidas diferentes amplificações de acordo com o nível do estímulo, pois, para sons de fraca intensidade, ocorre amplificação de forma linear. Já para os estímulos de média intensidade, a amplificação é diminuída, ou seja, ocorre compressão, e para os estímulos de forte intensidade, a amplificação torna-se linear novamente (Ruggero *et al.*, 1997).

As emissões otoacústicas estão presentes entre 90% a 100% das orelhas de ouvintes normais, sendo que esta porcentagem diminui, conforme o aumento da DA. Assim, as emissões otoacústicas estão presentes em quase todas as orelhas com audição normal, desde que haja integridade auditiva periférica da OE, OM e OI (Kemp, 1978; Eckley *et al.*, 1993; Chapchap e Segre, 2001). Dessa forma, na DA condutiva, o registro das emissões otoacústicas encontra-se ausente ou alterado, pois, para que as mesmas sejam captadas, é necessário que o sistema tímpano-ossicular esteja normal (Mello, 2006).

O registro das emissões otoacústicas possibilita o estudo da função coclear, sendo aplicado como exame complementar e diferencial na bateria

de testes audiológicos para distinguir os aspectos sensoriais e neurais de uma DA (Norton e Stover, 1999). As emissões otoacústicas também têm sido utilizadas na triagem auditiva neonatal, monitoramento da progressão de DA já estabelecida ou efeitos de tratamento com substâncias ototóxicas, prevenção de DA induzida por ruído, avaliação da audição em pacientes difíceis de serem testados por meio de métodos subjetivos, avaliação das condições do sistema coclear eferente, prognóstico evolutivo da hidropsia endolinfática ou doença de Ménière, identificação de uma pseudo-hipoacusia, indicador de sucesso após tratamento cirúrgico de desordens da OM, como estapedectomia e timpanoplastia, entre outros (Gattaz, 1999; Hall, 2000; Robinette e Glatke, 2000; Lonsbury-Martin *et al.*, 2001).

As emissões otoacústicas podem ser classificadas em dois grandes grupos: as espontâneas e as evocadas. As emissões otoacústicas espontâneas (EOA-S) são medidas na ausência de estimulação externa e não apresentam valor diagnóstico, por isso não são utilizadas na rotina clínica. As emissões otoacústicas evocadas (EOA), por outro lado, são obtidas a partir de um estímulo sonoro externo e são classificadas em função do estímulo gerador em: evocadas por estímulo transiente (EOA-T), estímulo-frequência (EOA-EF) e produto de distorção (EOA-PD). Em ambientes clínicos, as EOA mais utilizadas são as EOA-T e EOA-PD (Probst *et al.*, 1991; Lonsbury-Martin *et al.*, 2001). No presente estudo, o procedimento utilizado na metodologia será o exame de EOA-PD, e por isto, a seguir, será detalhado tal procedimento.

3.2.1 - Emissões otoacústicas evocada produto de distorção

Em 1979, Kemp definiu as EOA-PD como sendo a energia acústica, medida no MAE, originária da cóclea pela interação não-linear de dois tons puros aplicados simultaneamente, produzindo sons com características distintas que não constavam do sinal inicial, ou seja, surge um terceiro som denominado de produto de distorção. Os dois tons puros são de frequências diferentes (f_1 e f_2), sendo que f_1 é um tom primário com frequência menor que f_2 . A relação f_1/f_2 mais utilizada é 1,22, e o produto de distorção obtido ocorre em faixa de frequência diferente, apresentando maiores amplitudes em $2f_1-f_2$ e $2f_2-f_1$ (Bento *et al.*, 1998; Abissamra, 2001; Lonsbury-Martin *et al.*, 2001).

A resposta da EOA-PD depende da relação de frequência e dos níveis relativos dos tons primários que podem ser apresentados em intensidades diferentes ($L_1 > L_2$), ou seja, $L_1 = 65 \text{ dBNPS}$ e $L_2 = 55 \text{ dBNPS}$, ou intensidades iguais, como $L_1 = L_2 = 70 \text{ dBNPS}$, em passos de 3 pontos/oitavas (Pialarissi e Gattaz, 1997; Robinette e Glatke, 2000). Os parâmetros para registro de EOA-PD vão depender do protocolo do avaliador. A Figura 7 ilustra um exemplo de protocolo que pode ser utilizado na prática clínica.

Figura 7 - Parâmetros do exame de EOA-PD na faixa de frequência de 1.000 a 8.000Hz

Test Parameters	
Protocol	PA HMM
Startup Protocol	BTSCREEN4
☒ Artifact Rejection	
<div>Test Parameters</div> <div> Min. F2 (Hz): 1000 Max. F2 (Hz): 8000 DP Definition: 2f1-f2 F1 Lev. (dB SPL): 65 F2 Lev. (dB SPL): 55 </div> <div> Total Pts.: 7 Pts./Octave: 2 T.A. (sec): 2 F2/F1: 1.2 </div>	
<div>Pass/Refer Criteria</div> <div> Min. Pass: 3 Min. S/N(dB): 6 Min. DP(dB): -10 Show Result: Text </div>	

Fonte: Registro do equipamento DP2000, Starkey.

Para Gorga *et al.* (1993), a resposta de EOA-PD é considerada presente quando o nível de resposta estiver pelo menos 6dBNPS acima do primeiro desvio padrão do ruído equivalente da frequência avaliada, ou 3dB acima do segundo desvio padrão do ruído. O nível de ruído de fundo deve ser sempre igual ou inferior a -5dBNPS para cada frequência avaliada.

As EOA-PD fornecem informações sobre frequências específicas com relação ao estado funcional da cóclea no espectro de frequência de 500 a 8.000Hz em até 12 pontos por oitava, dependendo da necessidade da resolução da frequência (Lonsbury-Martin *et al.*, 1993; Lopes Filho e Redondo, 1999). Apesar da especificidade de frequência, as EOA-PD não fornecem dados sobre a acuidade auditiva, e, portanto, não substitui a ATL (Kemp *et al.*, 1990). As Figuras 8 e 9 demonstram o registro gráfico e numérico de EOA-PD, na faixa de frequência de 1.000 a 8.000Hz, respectivamente.

Figura 8 - Registro gráfico do exame de EOA-PD na faixa de frequência de 1.000 a 8.000Hz em ambas as orelhas

Fonte: Registro do equipamento DP2000, Starkey.

Figura 9 - Registro numérico do exame de EOA-PD na faixa de frequência de 1.000 a 8.000Hz em ambas as orelhas

DPOAE Numerical Data

Valmirio Gomes

26/4/2010 20:22:08

Left Ear: 1

Right Ear: 1

Result: Pass

									Left Ear
F1	F2	DP Freq.	L1	L2	DP	NF	DP/NF(dB)	Pass/Refer	
6656	8016	5297	65	54.8	10.5	-11.6	22.1	P	
5016	6000	4031	65	55.0	9.5	-13.4	22.8	P	
3328	3984	2672	65	55.3	13.5	-20.7	34.2	P	
2484	3000	1969	66	55.9	15.7	-19.9	35.5	P	
1688	2016	1359	66	55.7	26.4	-11.7	38.1	P	
1266	1500	1031	65	55.7	21.1	-10.0	31.1	P	
844	984	703	66	55.6	20.3	-1.8	22.0	P	

									Right Ear
F1	F2	DP Freq.	L1	L2	DP	NF	DP/NF(dB)	Pass/Refer	
6656	8016	5297	65	54.1	15.1	-10.4	25.4	P	
5016	6000	4031	65	55.5	2.8	-17.7	20.5	P	
3328	3984	2672	65	54.8	9.9	-16.9	26.8	P	
2484	3000	1969	66	55.9	19.1	-7.3	26.4	P	
1688	2016	1359	66	55.5	21.1	-13.9	35.0	P	
1266	1500	1031	65	55.4	22.1	-8.6	30.7	P	
844	984	703	66	55.5	18.5	-1.4	20.0	P	

Fonte: Registro do equipamento DP2000, Starkey.

A correlação entre o registro das EOA-PD e o grau da DA é uma preocupação constante na clínica audiológica. Segundo Probst e Harris (1993); Gorga *et al.* (1997); Skotnika e Hassmann-Poznanska (1999), a

presença das EOA-PD é mais frequente quando os indivíduos apresentam limiares de 20 a 30dBNA. Hoth (2006) ressaltou que as EOA-PD desaparecem quando a DA é superior a 47dBNA. Por outro lado, autores como Suckfull *et al.* (1996), Carnicelli (1997) e Gorga *et al.* (1997) relataram que as EOA-PD podem ser registradas em indivíduos com limiares auditivos até 50dBNA, permitindo, assim, o estudo das funções remanescentes das CCE. Para Azevedo (2004), as EOA-PD podem estar presentes em DA com limiares até 55dBNA na razão L1=L2=70dBNPS e com limiares até 40dBNA na razão L1=55dB e L2=65dBNPS.

As EOA-PD são vantajosas pela especificidade de frequência e capacidade de registro frente aos ruídos ambientais e fisiológicos, além de estudos relacionarem o nível de resposta das EOA-PD com a sensibilidade auditiva (Kimberley e Nelson, 1989; Smurzynski *et al.*, 1990; Moulin *et al.*, 1994; Gorga *et al.*, 1997; Jürgens *et al.*, 1999).

3.3 - Avaliação da audição em frequências altas

Antes dos anos sessenta, estudos apontavam que, para compreender a fala, somente as frequências entre 2.000 e 3.000Hz pareciam ser importantes. Em pouco tempo, as frequências de 500, 1.000 e 2.000Hz passaram a ser denominadas frequências da área da fala, e a frequência de 8.000Hz era suficiente para suprir todas as informações sobre a integridade da base da cóclea (Tonndorf e Kurman, 1984). Além disso, até a década de 70, acreditava-se que os danos precoces ocasionados ao sistema auditivo já

poderiam ser identificados com a avaliação até a frequência de 8.000Hz (Feghali e Bernstein, 1991).

Desta forma, a audiometria tonal liminar (ATL) convencional, a qual avalia as frequências de 125 a 8.000Hz foi por muito tempo o procedimento considerado “padrão ouro” na determinação da sensibilidade auditiva. Entretanto, novas pesquisas questionaram o valor da ATL convencional, pois tal procedimento não distingue discretas diferenças entre comportamentos e/ou padrões auditivos, bem como pelo número limitado de frequências que avalia, podendo dar a impressão falseada de normalidade (Fausti *et al.*, 1981; Carvallo, 2002; Carvallo *et al.*, 2003).

O estudo das frequências acima de 8.000Hz data da primeira metade do século XX, quando o Dr. Harvey Fletcher, em 1929, relatou que, para as frequências acima de 10.000Hz, os dados eram imprecisos, variando de indivíduo para indivíduo. Em 1960, com o desenvolvimento do audiômetro clínico para frequências altas, por Rudsome, as pesquisas nesta área tiveram evidente progresso, de modo que, em 1968, a *American Speech and Hearing Association* (ASHA) realizou a primeira análise em campo com 237 sujeitos sem passado otológico, reconhecendo a audiometria de frequências altas como um instrumento de detecção precoce de DA e de monitoramento da audição, permitindo, assim, a verificação de alteração nas frequências altas antes que ocorresse acometimento das frequências testadas na ATL convencional (Zeigelboim *et al.*, 1996; Gayva *et al.*, 2002).

Fausti *et al.* (1994) acrescentaram que, com a audiometria de frequências altas, uma maior porcentagem de orelhas alteradas poderiam

ser detectadas, sem a necessidade da aplicação prolongada de outros testes audiológicos.

A partir de então, novas pesquisas relacionadas às frequências altas foram realizadas, tornando-se possível reconhecer o valor das frequências acima de 8.000Hz para a aplicabilidade clínica, especialmente referente à detecção precoce de DA, compreensão da fala, monitorização da audição em grupos específicos e análise do processamento auditivo central (Ramos e Pereira, 2005; Lopes e Godoy, 2006; Carvallo *et al.*, 2007).

Na prática clínica, o mais comum é realizar avaliações audiológicas que avaliem a audição somente até 8.000Hz. Para Goodman *et al.* (2009), isto ocorre, primeiramente, porque a maioria dos sons de fala estão presentes em frequências até 8.000Hz, e, portanto, as frequências altas que contribuem para ouvir música e outros sons ambientais que não são de fala, normalmente menos preocupantes clinicamente. A segunda razão é que as frequências acima de 8.000Hz são mais difíceis para mensurar com precisão, devido ao curto comprimento de onda envolvido. Barret (2007) acrescentou que a maior dificuldade para realizar a avaliação da audição em frequências altas é devido à calibração correta dos transdutores com segurança.

Por meio da pesquisa de frequências altas, é possível detectar uma DA de forma precoce, pois, antes mesmo que os efeitos característicos apareçam na faixa de frequência convencional, as frequências altas já apresentam comprometimento. Assim sendo, a pesquisa das frequências altas complementa, confirma e até antecipa os achados obtidos na ATL

convencional, servindo como predição das futuras dificuldades (Silva e Feitosa, 2006). Portanto, essa avaliação pode ser utilizada como medida profilática para a preservação da audição, ou para evitar a possível progressão de uma DA já existente (Lopes *et al.*, 2007).

A pesquisa das frequências altas tem assumido papel de destaque na área de diagnóstico audiológico, uma vez que estas frequências são as primeiras a serem acometidas, na maioria das doenças que afetam a OI, e considerando ainda que a audição humana compreende a faixa de frequências de 20 a 20.000Hz, compreende-se que as frequências altas influenciam o reconhecimento de fala, e que a determinação dos limiares de frequências altas prediz dificuldades na inteligibilidade de fala (Boothroyd, 1986; Zeigelboim *et al.*, 1996; Carvallo, 2002).

Para Skinner e Miller (1983), Rissato e Santos (2003) as frequências altas são necessárias para a discriminação consonantal e para o reconhecimento de fala. Aparentemente, pessoas com DA em frequências altas apresentam dificuldade em destacar o sinal do ruído (figura/fundo), apresentando alterações de compreensão em ambientes ruidosos.

A aplicação clínica do estudo de frequências altas é a monitorização de pacientes com presença ou suspeita de patologias relacionadas à audição. Dentre elas, merecem destaque: monitorização do efeito de drogas ototóxicas, sequela de otite média, monitorização da audição em portadores de insuficiência renal, presbiacusia, avaliação dos distúrbios de processamento auditivo, monitorização de indivíduos com exposição frequente ao ruído, processos degenerativos do órgão espiral e investigação

do comprometimento auditivo em familiares de portadores de DA de origem genética (Zeigelboim *et al.*, 1996; Pialarissi e Gattaz, 1997; Vallejo *et al.*, 2001; Carvallo, 2002; Garcia *et al.*, 2003; Klagenberg *et al.*, 2011).

Apesar das frequências altas apresentarem nítida aplicabilidade na audiologia clínica, por alguns anos, o conhecimento de frequências a partir de 8.000Hz foi dificultado por alguns problemas como as diferenças individuais das dimensões e configurações do MAE, que gerou problema na calibração dos fones utilizados na audiometria de frequências altas. Para Shayeb *et al.* (2003), no início, era evidente a falta de fidelidade aos padrões de calibração devido às complexas interações entre o comprimento de onda e as dimensões do MAE; limitação dos audiômetros e fones de orelha; grande variação de metodologias aplicadas e, principalmente, a falta de consenso nos resultados. Contudo, devido ao aperfeiçoamento dos fones e ao conhecimento pormenorizado dos conceitos mecanoacústicos, a pesquisa de frequências altas por meio do procedimento de audiometria pode ser realizada como parte da rotina clínica (Zeigelboim, 2000).

Desde então, vários estudos foram realizados para desenvolver padrão de normalidade para frequências acima de 8.000Hz em diversos grupos. Porém, independentemente do grupo avaliado, a maioria dos estudos concordou com o fato de que a acuidade auditiva nas frequências altas diminui com o avanço da idade, ocorrendo um aumento sistemático nos limiares de audibilidade em função do aumento da frequência (Lopes *et al.*, 2007). Retamal *et al.* (2004) acrescentaram que a acuidade auditiva decresce de modo progressivo à medida que a frequência testada aumenta

e que os limiares de audibilidade permanecem estáveis até a frequência de 10.000Hz, ocorrendo um aumento gradativo destes limiares a partir da frequência de 11.200Hz.

Uma das aplicações clínicas da pesquisa em frequências 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 que são assintomáticos (Shaw *et al.*, 1996; Vallejo *et al.*, 2001). Porém, Stephens (1994) alertou que presença de alterações auditivas, mesmo que discretas em familiares de deficientes auditivos, podem ser indicativas quanto à possibilidade de serem portadores de alelos que causem a DA. Por isto, torna-se importante o conhecimento do padrão de audição de familiares de portadores de DA herdada geneticamente.

Silva *et al.* (2010) acrescentaram que o estudo das medidas de audição nos pais de deficientes auditivos é de utilidade na identificação de DA discreta; além disso, essa caracterização poderia, no futuro, vir a indicar nas famílias quais indivíduos poderiam ser portadores de genes recessivos que causam DA, principalmente nos casos em que ainda não haja testes moleculares disponíveis. Tais discretas alterações poderiam decorrer do fato de que os pais são heterozigotos em relação a mutações genéticas que, em homozigose, levam à DA de herança autossômica recessiva em seus filhos.

Além do estudo de limiares das frequências altas para avaliar familiares de portadores de DA de origem genética, as EOA-PD também

podem indicar a presença de um eventual alelo para a DA (Engel-Yeger *et al.*, 2002).

Com o objetivo de investigar a audição de familiares de portadores de DA de origem genética, Rosa *et al.* (2002) desenvolveram um estudo para determinar a resposta auditiva nas frequências de 250 a 20.000Hz e a função coclear por meio das EOA-PD entre 1.000 e 6.000Hz em 8 famílias, abrangendo um total de 23 indivíduos, sem histórico de exposição a ruído, consumo de álcool ou drogas. Os resultados evidenciaram diminuição das EOA-PD e aumento dos limiares nas frequências de 9.000 a 20.000Hz no grupo de familiares de portadores de DA, em relação à população normal, sugerindo que as EOA-PD podem ser úteis no monitoramento de discretas mudanças auditivas.

Engel-Yeger *et al.* (2002) sugeriram que uma alteração nas CCE, resultado de um mecanismo defeituoso das junções do tipo *gap*, causado pela mutação 35delG, pode ser notada nas EOA. Os autores afirmaram que a alteração das células ciliadas pode ser vista por uma diferença entre portadores e não-portadores da mutação, particularmente nas frequências altas, que não estão incluídas na audiometria convencional. Desta forma, Engel-Yeger *et al.* (2002) investigaram o efeito desta mutação em homozigotos, heterozigotos e sujeitos sem a mutação por meio da obtenção da ATL, EOA-PD e do potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE), e encontraram que os homozigotos para a mutação apresentavam DA profunda evidenciada por meio da ATL; ausência de respostas (em sua maioria) e respostas abaixo do esperado para as EOA-PD; e que os PEATE

estavam normais. Os heterozigotos apresentaram respostas anormais a partir de 5.000Hz nas EOA-PD e respostas normais nos PEATE. Os não-portadores da mutação apresentaram respostas normais nas EOA-PD e PEATE. Heterozigotos e não-portadores obtiveram limiares dentro da normalidade no exame audiométrico.

Em um trabalho seguinte, Engel-Yeger *et al.* (2003) afirmaram que poucos estudos procuraram determinar o quadro clínico da DA de herança autossômica recessiva, porque apenas um número pequeno de famílias/sujeitos são examinados. Assim sendo, eles analisaram os efeitos das mutações 35delG e de outras duas mutações, a W77R e a V37I, nos sujeitos da mesma população do estudo anterior e encontraram uma diferença nas repostas das EOA-PD entre dois grupos, ambos heterozigotos, de idades diferentes (de 3 a 25 anos e de 26 a 46 anos). O grupo de 26 a 46 anos de idade mostrou níveis mais baixos de respostas, em comparação ao grupo mais novo, nas frequências altas (9.000 e 10.000Hz). Também encontraram diferenças nas respostas dos heterozigotos e não-portadores da mesma idade e mais jovens, entre 1.000 e 5.000Hz. Não-portadores apresentaram EOA-PD mais elevadas que os portadores.

Franzé *et al.* (2005) investigaram as frequências mais altas da ATL em frequências convencionais de portadores em heterozigose da mutação 35delG e observaram que os parentes de sujeitos com DA, que possuem tal mutação em homozigose e não-portadores desta mutação (grupo controle), apresentaram uma queda nos limiares auditivos, principalmente

nas frequências de 6 e 8.000Hz para os portadores desta mutação, em comparação com os não-portadores.

Silva et al. (2010) realizaram um estudo com objetivo de avaliar o perfil audiológico de pais de sujeitos com DA de herança autossômica recessiva, inferida pela genealogia ou comprovada em testes moleculares, o qual detectou mutação do gene *GJB2*. A casuística foi composta por 36 indivíduos de 23 famílias, na faixa etária de 30 a 60 anos. A amostra foi alocada em dois diferentes grupos: o grupo pesquisa (GP), constituído por 8 famílias (14 sujeitos entre pais e mães), tendo ao menos um filho com DA de herança autossômica recessiva, sendo a distribuição por faixa etária de 4 sujeitos de 30 a 40 anos, 6 sujeitos de 40 a 50 anos e 4 sujeitos de 50 a 60 anos. O grupo controle (GC) foi constituído por 15 famílias (22 sujeitos entre pais e mães) sem DA entre seus membros, compreendendo a faixa etária de 10 sujeitos de 30 a 40 anos, 5 sujeitos de 40 a 50 anos e 7 sujeitos de 50 a 60 anos. Todos os sujeitos foram submetidos à ATL em frequências convencionais e frequências altas, EOA-PD e imitanciometria com tom de prova de 226Hz e 1.000Hz. Analisando-se os limiares da ATL, pode-se notar uma diferença entre os grupos, de modo que houve uma tendência do GC a apresentar melhores limiares que o GP em todas as frequências, exceto nas frequências de 9.000 e 20.000Hz. No entanto, tal diferença não é significativa, isso mostra que há uma tendência a discretas alterações na audição de sujeitos portadores de alelos que causam DA, as quais podem ser encontradas já mesmo com os resultados dos limiares da ATL convencional. Em relação às frequências altas, os limiares do GP

apresentaram médias dos limiares tonais, nas duas orelhas, mais baixa, em comparação ao GC, em quase todas as frequências, exceto em 20.000Hz. Referente às EOA-PD foi possível verificar que a média da relação Sinal-Ruído (S/R) em todas as frequências testadas foi mais baixa no GP que no GC, tanto na média geral das orelhas, quanto na média por frequência. No entanto, não houve uma diferença significativa entre estes limiares. Não foi possível verificar diferenças estatisticamente significantes entre os limiares da ATL, nem entre os das EOA-PD; no entanto, os limiares audiométricos e os das EOA-PD dos sujeitos do GC mostraram-se, respectivamente, menores e maiores em relação ao GP, o que mostra uma tendência que deve ser melhor estudada posteriormente, com número maior de sujeitos e outros dados, como a curva de crescimento para se comprovar tais diferenças nos perfis audiológicos. Quatro pais do GP na faixa etária de 50 a 60 anos apresentaram DA, porém, não se soube se a DA foi completamente devido a fatores ambientais ou, ainda, se a presença do alelo causador da DA em heterozigose pode ser responsável pela DA, tornando o sujeito mais susceptível à presbiacusia ou a fatores ambientais que prejudicam a audição.

Alguns estudos têm sido realizados entre os exames de EOA e ATL em frequências altas acima de 9.000Hz para avaliar comprometimentos iniciais da cóclea. Entretanto, Avan *et al.* (1997) informaram que as EOA são mais sensíveis à disfunção coclear que a ATL, porque, para haver alteração em tons puros, existe necessidade que uma significativa porção das CCE sejam danificadas em uma determinada região antes dos efeitos auditivos

serem notados. Já uma menor quantidade de danos nas CCE pode ocasionar respostas alteradas nas EOA, indicando que é possível prever uma iminente DA.

Bohne e Clark (1982) informaram que, para haver alteração nos limiares auditivos, pelo menos 50% das CCE têm de estar lesionadas, enquanto que uma menor lesão das células ciliadas é necessária para diminuir a amplitude das EOA.

Avan *et al.* (1997) investigaram a relação entre os limiares auditivos de frequências altas entre 8.000 e 16.000Hz e as EOA-T em 43 adultos com audição normal, na faixa etária de 24 a 50 anos de idade. Os resultados demonstraram que a região das frequências altas influenciou significativamente as EOA-T, porém, o mesmo não ocorreu nas EOA-S. Neste estudo, a idade e limiares auditivos de frequências altas foram correlacionados, sendo o envelhecimento a principal causa da tendência observada, pois a melhor resposta de EOA-T foi inversamente proporcional à idade.

Arnold *et al.* (1999) estudaram a influência da audição em frequências de 11.000 a 20.000Hz sobre as EOA-PD em frequências convencionais. Realizaram um estudo prospectivo em 50 adultos jovens com audição normal, utilizando um modelo de análise por regressão simples e complexa, para estudar a relação entre limiares tonais em frequências altas e EOA-PD. Os resultados evidenciaram que não houve contribuição dos limiares tonais convencionais na variação do nível de resposta das EOA-PD, havendo correlação entre a relação S/R das EOA-PD no intervalo de 4.000 a

8.000Hz, com a média dos limiares tonais no intervalo de 11.200 a 20.000Hz, sugerindo que a audição em frequências altas acima de 8.000Hz influencia as EOA-PD em frequências mais baixas, uma vez que os estímulos apresentados geram uma resposta $2f_1-f_2$, a qual ocorre em uma frequência mais baixa do que f_1 e f_2 . Concluíram que a audição, em frequências altas, influencia as EOA-PD em frequências mais baixas, porque as emissões são sensíveis a mudanças sutis nas CCE que ainda não foram detectadas pelos limiares audiométricos nestas frequências, ou porque alterações na parte basal coclear afetam a geração de EOA-PD, em baixas frequências, originadas de regiões mais apicais da cóclea.

Carvallo (2002) verificou o efeito da sensibilidade auditiva para as frequências entre 9.000 e 20.000Hz, sobre as medidas de EOA-PD analisadas quanto à relação S/R e também sobre o desempenho na tarefa de reconhecimento de fala com ruído de fundo em indivíduos com audição preservada entre 250 e 8.000Hz. Foram avaliados 86 adultos sem queixa auditiva, distribuídos em dois grupos. Os resultados evidenciaram diferença entre os grupos, sendo que o grupo com menor sensibilidade para as frequências altas mostrou respostas em EOA de menor amplitude, com diferença estatística significativa entre os grupos em 5.000Hz para EOA-T, e em 6.284Hz para EOA-PD, sugerindo influência da porção basal coclear nas respostas geradas em região mais apical. A investigação da audição, por meio da pesquisa de limiares para frequências altas, permite a identificação de discretas alterações na função auditiva associadas a respostas menos robustas nas EOA. Não foram evidenciadas diferenças

significantes entre os grupos estudados com relação ao teste de fala com ruído branco.

Kowalska *et al.* (2002) estudaram o efeito da exposição de trabalhadores que misturam solventes sobre a OI, por meio da análise das EOA-PD e ATL em frequências altas. Para isso, analisaram 61 trabalhadores expostos à manipulação de solventes, comparando-os a 40 sujeitos não expostos. Encontraram DA nas frequências altas em 42% no grupo exposto, contra 5% no grupo controle e, também, redução da relação S/R das EOA-PD no grupo exposto. Concluíram que, por meio dos exames de EOA-PD e frequências altas, foi possível identificar que solventes são ototóxicos.

Li *et al.* (2003) analisaram a relação entre ATL convencional, ATL em frequências altas e EOA-PD para detecção precoce de alterações auditivas. Foram analisados 42 adultos jovens, com audição normal, formando o grupo controle, e 20 trabalhadores expostos a ruído. Os resultados indicaram que o grupo exposto ao ruído apresentou limiar com nível de intensidade mais elevado na frequência de 6.000Hz, nível de resposta nas EOA-PD pior nas frequências de 4.000 a 6.000Hz, e em altas frequências em 11.200Hz, também com nível de intensidade mais elevado, quando comparados ao grupo controle. Concluíram que as EOA-PD, juntamente com as frequências altas, possuem um potencial complementar na detecção precoce de DA induzidas por ruído.

Carvalho (2004) avaliou a audição de 30 indivíduos portadores de vtiligo por meio da EOA-PD e da ATL em frequências altas e comparou-os a um grupo controle. Os resultados revelaram que, tanto para as frequências

altas (9.000 a 20.000Hz), como para as EOA-PD, foram observadas diferenças significantes entre os grupos, as quais não foram verificadas na ATL em frequências convencionais de 250 a 8.000Hz. Os resultados ainda sugeriram sutis alterações auditivas para o grupo com distúrbio pigmentar do tipo vitiligo.

Schmuziger *et al.* (2005) avaliaram limiares auditivos para frequências acima de 8.000Hz, correlacionando-os com as respostas de EOA-S, EOA-T, EOA-PD em 104 orelhas de 57 adultos jovens na faixa etária de 16 a 19 anos (média 17 anos de idade), sem histórico de problemas auditivos, exposição a ruído excessivo ou otite média recorrente na infância. Os critérios de inclusão da casuística foram: inspeção otoscópica normal, limiares auditivos até 15dB na faixa de frequência de 500 a 8.000Hz e imitanciometria normal. Os resultados mostraram que indivíduos com presença de EOA-S apresentavam melhores limiares auditivos para as frequências altas e maior relação S/R nas EOA-T e EOA-PD, o que os levou a concluir que a presença de EOA-S é indicativa de função coclear normal em uma ampla faixa de frequência.

Groh *et al.* (2006) realizaram um estudo com o objetivo de investigar os limiares auditivos para frequências acima de 8.000Hz, nas EOA-S, EOA-T e EOA-PD em 126 crianças, adolescentes e adultos jovens de 6 a 25 anos de idade, otologicamente normais, sem histórico familiar de DA, histórico de doenças otológicas ou uso de medicamentos ototóxicos, nem exposição ao ruído. Os sujeitos foram divididos em quatro grupos etários: Grupo I: 33 indivíduos de 6-10 anos, sendo 16 do gênero feminino e 17 do gênero

masculino, Grupo II: 31 indivíduos de 11-15 anos, sendo 19 mulheres e 12 homens, Grupo III: 30 indivíduos de 16-20 anos, sendo 19 mulheres e 11 homens; e Grupo IV: 30 indivíduos de 21-25 anos, sendo 17 mulheres e 13 homens. Os resultados demonstraram que, de acordo com o aumento da idade, ocorreu um aumento nos limiares auditivos para frequências acima de 8.000Hz, sendo que, na frequência de 16.000Hz, o grupo de 21-25 anos de idade apresentou limiares significativamente maiores que nos grupos mais jovens. Com relação as EOA, a relação S/R das EOA-T diminuíram com a idade, as respostas de EOA-PD permaneceram uniformes, exceto na frequência de 6.300Hz para o grupo mais jovem, e a menor frequência das EOA-S foi maior no grupo mais jovem. O estudo demonstrou que uma deterioração da audição nas frequências altas já começa na infância, sendo acompanhada por uma diminuição nas respostas das EOA-T, EOA-PD e ausência de EOA-S. Assim, a avaliação das frequências altas pode ajudar a detectar a DA de forma precoce, a qual não é revelada por meio da ATL convencional.

Barret (2007) estudou a contribuição das frequências altas sobre a relação S/R das EOA-PD em 50 mulheres na faixa etária de 18 a 28 anos, apresentando audição normal, e encontrou que houve uma relação, especialmente na queda dos limiares das frequências altas a 16.000Hz, sendo que, subsequentemente a isto, houve uma queda na relação S/R de 4.000Hz nas EOA-PD. Entretanto, a autora não encontrou resultados estatisticamente significantes, mas sim uma tendência em aumentar os limiares auditivos e em diminuir a relação S/R das EOA-PD, e por isto,

sugeriu maiores investigações da relação S/R das EOA-PD e frequências altas em um grupo maior de sujeitos com características distintas, como gênero, faixa etária e diferentes graus de DA.

Knight *et al.* (2007) realizaram um estudo com o objetivo de descrever mudanças progressivas na audição e função coclear em crianças e adolescentes submetidos à quimioterapia por meio dos limiares auditivos em frequências convencionais, frequências altas e EOA-PD. A casuística foi composta por 32 pacientes na faixa etária de 8 meses a 20 anos, porém, apenas 17 pacientes foram submetidos à pesquisa dos limiares auditivos em frequências altas, pois tal procedimento foi confiável apenas em crianças maiores de 5 anos de idade, devido à subjetividade do exame. Os resultados revelaram que 62,5% dos pacientes adquiriram DA durante o tratamento da quimioterapia, 81,3% apresentaram diminuição nas respostas de EOA-PD e 94,1% tiveram DA em frequências altas. Desta forma, verificou-se uma tendência de ocorrer alteração auditiva por meio da ototoxicidade primeiramente na ATL em frequências altas, depois nas EOA-PD e, por último, na ATL com frequências convencionais.

3.4 - Emissões otoacústicas em frequências ultra-altas

Há alguns anos, o equipamento utilizado no exame de EOA-PD permitia o registro apenas na faixa de frequência convencional de 500 a 8.000Hz, sendo considerado um importante teste clínico, por demonstrar o estado funcional das CCE, de maneira objetiva e com especificidade de

frequência (Lonsbury-Martin *et al.*, 1993; Probst e Harris, 1993; Gorga *et al.*, 1993).

Atualmente, em virtude dos avanços tecnológicos aliados às pesquisas no campo da fisiologia coclear, a audiologia clínica conta com procedimentos de avaliação que contribuem ainda mais no diagnóstico audiológico. Em destaque, temos a disponibilidade de equipamentos no mercado de EOA-PD em frequências ultra-altas capazes de mensurar a função coclear na faixa de 9.000 a 16.000Hz, avaliando com maior precisão a função coclear desde a espira basal até a espira apical.

A importância do estudo de medidas de EOA-PD em frequências ultra-altas reside em identificar alterações na função coclear que podem anteceder uma lesão auditiva nas frequências convencionais no estágio inicial, pois permite identificar o dano coclear antes que progrida para as frequências baixas (Dunckley e Dreisbach, 2004).

Nas EOA-PD de frequências ultra-altas, os parâmetros utilizados para registro são os mesmos das frequências convencionais, ou seja, a cóclea é submetida a dois tons de frequências diferentes e próximas f_1 e f_2 (frequências primárias), e um terceiro tom de frequência ($2f_1 - f_2$) é produzido, sendo $f_1 < f_2$, com uma relação entre si de 1,22, como demonstra a Figura 10.

Figura 10 - Parâmetros do exame de EOA-PD na faixa de frequência de 8.000 a 16.000Hz

Fonte: Registro do equipamento DP2000, Starkey.

As Figuras 11 e 12 demonstram o registro gráfico e numérico de EOA-PD na faixa de frequência de 9.000 a 16.000Hz, respectivamente.

Figura 11- Registro gráfico do exame de EOA-PD em frequência ultra-alta de 10.000 a 16.000Hz em ambas as orelhas

Fonte: Registro do equipamento DP2000, Starkey.

Figura 12 - Registro numérico do exame de EOA-PD na faixa de frequência de 8.000 a 16.000Hz

DPOAE Numerical Data

Jaqueline Medeiros de Mello 03/16/2011 3:33:47 PM

Left Ear: 1

Right Ear: 1

Result: Pass

F1	F2	DP Freq.	L1	L2	DP	NF	DP/NF(dB)	Pass/Refer
13313	15984	10641	64	58.1	-8.7	-16.5	7.8	P
12234	14672	9797	65	56.0	6.8	-11.3	18.1	P
11203	13453	8953	65	55.8	18.2	-4.9	23.1	P
10266	12328	8203	62	54.2	8.2	-2.7	11.0	P
9422	11297	7547	65	57.8	14.7	-2.4	17.2	P
8625	10359	6891	66	51.8	2.6	-8.2	10.8	P
7922	9516	6328	66	54.9	-1.5	-9.0	7.4	P

Right Ear

F1	F2	DP Freq.	L1	L2	DP	NF	DP/NF(dB)	Pass/Refer
13313	15984	10641	55	48.2	0.7	-5.9	6.6	P
12234	14672	9797	61	52.6	-6.0	-12.6	6.6	P
11203	13453	8953	52	44.2	5.9	-5.6	11.5	P
10266	12328	8203	64	51.9	2.4	-4.2	6.6	P
9422	11297	7547	62	53.5	6.9	-3.2	10.1	P
8625	10359	6891	58	54.1	2.4	-5.0	7.4	P
7922	9516	6328	61	53.1	-0.7	-12.4	11.7	P

Fonte: Registro do equipamento DP2000, Starkey.

Para Dunckley e Dreisbach (2004), as EOA-PD em frequências ultra-altas podem ser úteis para individualizar protocolos, especialmente para indivíduos que necessitam de monitoramento até a região capaz de gerar respostas em frequências mais altas, como por exemplo, no monitoramento da ototoxicidade e ruído, ou submetidos a drogas ototóxicas, além de ser útil no diagnóstico diferencial de DA periférica e neuropatia auditiva. Assim, a utilização desse método diagnóstico pode alertar para lesões cocleares, fazendo com que se possam prevenir futuras alterações auditivas.

A seguir, serão apresentados estudos em ordem cronológica, os quais foram realizados com as EOA-PD em frequências ultra-altas que avaliam as frequências de 9.000 a 16.000Hz. Vale esclarecer que, não existem estudos nacionais sobre o tema, e os estudos internacionais existentes que envolvem a percepção sonora em frequências altas é em número reduzido.

A carência de referencial teórico sobre as EOA-PD em frequências ultra-altas torna-se mais um argumento para este estudo, por isto, torna-se fundamental a realização de mais estudos a respeito das EOA-PD de frequências ultra-altas em indivíduos sem queixas audiológicas, e, posteriormente, em indivíduos com queixa auditiva.

Dunckley e Dreisbach (2004) realizaram um estudo para verificar o efeito do gênero sobre as EOA-PD, utilizando estímulo de frequência ultra-alta. A casuística foi composta por 37 adultos, sendo 20 do gênero feminino (18 a 29 anos de idade) e 17 do gênero masculino (18 a 25 anos de idade). Para fazer parte da amostra, os critérios de inclusão da casuística incluíram limiares auditivos dentro dos padrões de normalidade, função de OM normal, presença de EOA-PD para estímulo em baixas frequências, ausência de histórico em patologias otológicas e exposição a nível elevado de pressão sonora. Referente ao procedimento de EOA-PD para frequências ultra-altas, foram utilizados estímulos variando de 1.000 a 16.000Hz e foram avaliadas as frequências de 1.000, 2.000, 4.000, 8.000, 10.000, 12.000, 14.000 e 16.000Hz, na razão $f_1/f_2=1.22$, $2f_1-f_2$ e $L_1=60\text{dB}$ e $L_2=45\text{dB}$, sendo que o critério de resposta de EOA-PD foi a relação S/R de 3dB e valor da amplitude absoluta maior que -20dBNPS.

Os resultados de EOA-PD revelaram que, conforme diminuiu a frequência, aumentou o nível de resposta, não havendo diferença significativa na região entre 1.000 a 8.000Hz, porém, foi encontrada diferença significativa na região entre 10.000 a 16.000Hz. Foi possível observar maior nível de resposta em mulheres do que em homens nas

frequências até 8.000Hz. Os autores justificaram que os motivos podem ser decorrentes de maior prevalência das EOA-S, maior amplitude da onda V e diferença nas propriedades da OM, especificamente na transmissão reversa, no gênero feminino. Entretanto, as EOA-S não foram registradas em frequências acima de 8.000Hz, e por esta razão não pode esclarecer os achados a partir de 9.000Hz. Ao término do estudo, Dunckley e Dreisbach (2004) concluíram que mais estudos são necessários para examinar os efeitos das EOA-PD em frequências ultra-altas sobre o gênero feminino e masculino na prática clínica.

Dreisbach e Siegel (2005) realizaram um estudo para caracterizar o nível de intensidade dos estímulos nas EOA-PD Gram eliciados com estímulos de frequência ultra-alta, a fim de ajudar a interpretação das EOA-PD na prática clínica. Para isto, as EOA-PD foram medidas em seis diferentes frequências, de 2.000, 5.000, 10.000, 12.000, 14.000 e 16.000Hz, com razão $f_2/f_1=1.2$ em cinco níveis de intensidade 30, 40, 50, 60 e 70dBNPS em duas condições, sendo L_1 variado e L_2 fixo e vice-versa. A casuística foi composta por oito sujeitos na faixa etária de 22 a 32 anos que apresentavam limiares auditivos menores que 15dBNA entre 250 a 8.000Hz e sem histórico pregresso de alterações auditivas, incluindo exposição ao ruído. Para evitar artefato na calibração devido às ondas estacionárias, especialmente em frequências altas, foi utilizada uma sonda confeccionada sob medida para o estudo. A sonda continha três tubos, o primeiro enviava o estímulo, o segundo era o microfone e o terceiro era uma fibra ótica para visualizar a posição da sonda em relação à membrana timpânica que

deveria ficar cerca de 10-15mm da mesma, isto para garantir o mesmo nível de pressão sonora durante a avaliação de todas as frequências.

Os resultados demonstraram que o nível de resposta das EOA-PD dependeu da intensidade do estímulo e como o mesmo foi variado. O nível de resposta máximo ocorreu na situação de $L_1 > L_2$ para variação de L_1 e L_2 fixado, nas frequências de 5.000, 10.000, 12.000 e 14.000Hz. Entretanto, a resposta na frequência de 16.000Hz foi consistentemente menor em todos os níveis de intensidades, quando comparada às demais frequências. Isto ocorreu porque a região de 16.000Hz é muito próxima ao final da base da cóclea, podendo indicar que a região mais basal da cóclea é menos linear. No geral, a intensidade do estímulo é similar para baixas e altas frequências, implicando que o processo biológico responsável por gerar as EOA-PD é o mesmo, e por tal razão, o uso de EOA-PD eliciados com estímulos de frequências ultra-altas pode ter aplicação clínica importante.

Dreisbach *et al.* (2006) realizaram um estudo com o objetivo de analisar a reprodutibilidade das EOA-PD em frequência ultra-alta ao longo de período de 4 semanas em adultos com audição normal, já que as EOA-PD em frequências convencionais se reproduzem com o passar do tempo. Participaram da casuística 25 adultos, sendo 14 do gênero feminino e 11 do gênero masculino. Os critérios de inclusão dos sujeitos no estudo foram ausência de alterações de OM, sensibilidade auditiva normal, ausência de histórico familiar de DA hereditária e ausência de exposição a níveis elevados de pressão sonora. As EOA-PD foram utilizadas em f_2/f_1 de 1,2 em razões de intensidades diferentes, sendo L_1/L_2 60/45, 60/50, 70/55,

70/60dBNPS, nas frequências de 2.000, 4.000, 6.000, 8.000, 10.000, 12.000, 14.000 e 16.000Hz.

Os resultados revelaram que as EOA-PD em frequências ultra-altas foram obtidas com menor amplitude de resposta em comparação com as baixas frequências, além de ocorrer maior variabilidade nas frequências acima de 8.000Hz para medições do nível das EOA-PD, sendo constatado uma diferença maior que 10dB entre as medidas de 87,5% e 83,1% nas razões 70/55 e 60/50dBNPS, respectivamente. Enquanto que, nas baixas frequências, a variação dentro do nível de 10dB foi de 98,4 e 96% nas razões 70/55 e 60/50 dBNPS, respectivamente. Estes dados sugerem que grandes diferenças de nível EOA-PD (por exemplo, 10dB) podem ser devido à presença de artefatos, e que, por isto, devem ser reavaliadas, refazendo a frequência em questão e reposicionando a sonda para confirmar se a resposta deve-se exclusivamente à atividade coclear. A maior variabilidade observada para as frequências ultra-altas pode ter sido influenciada por diversos fatores, como a remoção e substituição da sonda durante o teste. Esta variabilidade pode ser minimizada por meio da exata calibração, que normalmente é realizada com a correção da inserção do microfone no MAE do paciente. Os resultados permitiram aos autores concluir que, embora o nível das EOA-PD obtidas nas frequências acima de 8.000Hz ter sido mais variável do que em baixas frequências, nas frequências ultra-altas foram encontrados repetições para os dois paradigmas testados, em 70/55 e 60/50dB. A sugestão na finalização do estudo foi que os resultados encorajam a exploração das medidas de EOA-PD de frequência ultra-alta

para serem usadas como um teste objetivo para o monitoramento da ototoxicidade.

Kei *et al.* (2007) realizaram um estudo com objetivo de investigar o efeito da disfunção da OM sobre as EOA-PD em frequências convencionais e em frequências ultra-altas em 50 crianças com idade média de 6,3 anos. As crianças foram divididas em três grupos de acordo com o resultado da timpanometria e reflexo acústico por orelha. O grupo 1 foi composto por 16 orelhas que foram classificadas dentro do grupo de falha, o qual incluiu orelhas que obtiveram timpanogramas alterados e com ausência de reflexo acústico. O grupo 2 foi constituído de 61 orelhas que foram classificadas dentro do grupo de passa, o qual incluiu orelhas com timpanograma do tipo A com presença de reflexo acústico ipsilateral nas frequências de 1.000 e 2.000Hz. E por fim, o grupo 3 foi composto por 33 orelhas que foram classificadas dentro do grupo indeterminado, o qual incluiu orelhas que não entravam nos dois grupos acima, isto é, a combinação de resultados passa/falha da timpanometria e reflexo acústico. Todas as crianças foram submetidas aos procedimentos de triagem de tom puro nas frequências de 500, 1.000, 2.000, 4.000 e 8.000Hz, imitanciometria com sonda de 226Hz e EOA-PD em frequências convencionais e em frequências ultra-altas, em ambas orelhas.

Com relação à média da amplitude das EOA-PD e o ruído de fundo, para os três grupos de orelhas, os resultados nas frequências convencionais de 1.000 a 8.000Hz revelaram que as orelhas do grupo 1 apresentaram menor amplitude que no grupo 2 e no grupo 3 para as frequências de 1.000,

1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 6.000 e 8.000Hz. Quando comparados aos resultados das frequências convencionais, a média de EOA-PD para as frequências ultra-altas foi aproximadamente 5-10dB menor para todos os grupos. Quando os três grupos nas frequências ultra-altas foram comparados, as médias das frequências de 8.700, 9.500, 10.000, 11.000, 12.000, 13.000 e 16.000Hz foram mais baixas no grupo 1 do que nos grupos 2 e 3. Os resultados revelaram diferenças estatisticamente significantes na média da amplitude das EOA-PD entre os três grupos nas frequências de 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 6.000, 8.000, 8.700, 9.500, 13.000 e 16.000Hz. Referente à média da relação sinal/ruído nas frequências convencionais, os resultados demonstraram melhor relação sinal/ruído no grupo 2. Já a média da relação sinal/ruído obtida nas frequências altas foi bastante similar entre os grupos. A média da relação sinal/ruído para o grupo 1 foi maior nas frequências ultra-altas do que nas frequências convencionais, exceto nas frequências de 1.000, 1.500 e 9.500Hz. Foi aplicado teste estatístico na relação sinal/ruído entre os grupos para cada frequência testada, e foi encontrada diferença significativa nas frequências de 1.000, 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 6.000, 8.000, 8.700, 9.500 e 13.000Hz.

Kei *et al.* (2007) concluíram que o efeito da disfunção da OM sobre as EOA-PD em frequências ultra-altas foi menor que nas frequências convencionais. Devido ao menor impacto da disfunção da OM sobre as EOA-PD em frequências ultra-altas, delineia-se uma noção do funcionamento coclear, mesmo em crianças com patologia na OM e submetidas à quimioterapia. Entretanto, esta avaliação deve ser realizada

com cautela, porque, nestes casos, ocorre ainda uma redução das EOA-PD em frequências ultra-altas, embora não tão severa como acontece nas frequências convencionais.

Goodman *et al.* (2009) apresentaram uma nova forma de registrar as EOA-T em frequências até 16.000Hz em sujeitos com audição normal. Até então, o principal problema encontrado para medir as EOA-T a partir de 5.000Hz dava-se devido à limitação nos procedimentos de calibração. Contudo, os autores desenvolveram uma técnica denominada calibração de pressão-incidente, a qual evita os efeitos das ondas estacionárias em frequências altas, por meio de um tubo cilíndrico de 8mm de diâmetro inserido no fone de inserção, que funcionou como uma câmara anecóica. Para testar tal invenção, foram selecionados 29 indivíduos com audição normal, sendo 25 mulheres e 4 homens, com idades variando de 14 a 29 anos. Os resultados demonstraram uma diminuição no nível de respostas das EOA-T em frequências acima de 5.000Hz, enquanto que, nas frequências de 8.000 e 10.100Hz, a resposta de EOA-T reduziu, tendo limiares ligeiramente aumentados nas altas frequências. Embora este seja um resultado promissor, mais estudos são necessários em sujeitos com ampla variação de limiares auditivos. No geral, EOA-T em frequências altas puderam ser mensuradas em todos os sujeitos com audição normal, resta saber se as respostas podem ser detectadas na presença de DA, nas frequências altas, em populações com diferentes graus de DA. Se estudos futuros demonstrarem que as EOA-T em frequências altas podem detectar DA precoces em frequências altas, as EOA-T serão úteis para monitorar as

frequências altas em pacientes que são de risco para desenvolverem DA, como os pacientes que recebem medicação ototóxica.

Em continuação ao estudo anterior, Keefe *et al.* (2011) realizaram um estudo para avaliar a precisão do método das EOA-T em frequências ultra-altas, desenvolvido por Goodman *et al.* (2009), utilizando quatro níveis de estímulo, como 76, 73, 67 e 61dBNPS. A casuística foi composta por adultos com audição normal (n=113) com média de idade de 21 anos e por portadores de DA (n=333) com média de idade de 58 anos, incluindo sujeitos que tivessem limiares audiométricos melhor que 25dB em uma ou mais frequências. O desempenho do teste foi analisado utilizando a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*), sendo a razão entre sensibilidade (identificar corretamente as orelhas com DA) e especificidade (identificar corretamente as orelhas com audição normal). Os resultados demonstraram sensibilidade e especificidade constante entre as frequências de 1.000 e 10.000Hz, com média de 0,83-0,84, significando que as EOA-T em frequências ultra-altas identificaram corretamente 84% das orelhas com audição normal e 84% das orelhas comprometidas, de acordo com os critérios de DA estabelecidos neste estudo, sendo que as respostas foram mais evidentes em níveis de estímulos maiores (76 e 73dBNPS) do que em níveis de estímulos mais baixos (67 e 61dBNPS). Já para as frequências de 500, 12.700 e 16.000Hz, a curva ROC foi menor, independente do critério de normalidade ou DA e nível do estímulo. Ao término do estudo, os autores concluíram que as EOA-T em frequências altas demonstraram capacidade clínica para prever DA, pelo menos até 10.000Hz.

Método

4 - 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 (FMUSP), por isto o mesmo foi enviado para a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) nesta instituição, tendo sido aprovado sob protocolo número 170/10 (Anexo A), e a mudança do título da tese foi aprovada pela comissão supracitada (Anexo B).

A pesquisa foi realizada no município de Maringá (PR) e envolveu duas instituições distintas: o Serviço de Aconselhamento Genético da Universidade Estadual de Maringá (UEM), que permitiu a seleção das famílias dos portadores de DA decorrente por herança autossômica recessiva; e a Faculdade Ingá-Uningá, que permitiu a realização dos exames, cedendo o espaço e equipamentos. Após autorização das devidas instituições, o projeto foi encaminhado para o Comitê de Ética da Faculdade Ingá-Uningá, sendo aprovado sob protocolo número 164/09 (Anexo C).

4.1 - Casuística

A casuística foi composta por 56 indivíduos, na faixa etária entre 20 a 58 anos, divididos em dois grupos distintos: o Grupo Estudo (GE), constituído por 28 pais de deficientes auditivos decorrentes de herança autossômica recessiva, sendo 14 mulheres com idades entre 20 a 55 anos

(média 32,8 anos) e 14 homens com idades entre 20 a 58 anos (média 35,2). Dentre os indivíduos do GE selecionados, um indivíduo de 32 anos apresentava risco de exposição ao ruído ocupacional há 2 anos, e o outro indivíduo de 33 anos apresentava risco por exposição ao ruído há 5 anos, associado à história pregressa de alteração condutiva. Os dois indivíduos utilizavam o equipamento de proteção individual e apresentaram avaliação audiológica normal, assim como nos periódicos realizados nas empresas em que trabalham.

O Grupo Controle (GC) foi formado por indivíduos sem queixa auditiva, composto por 14 homens e 14 mulheres, com idades pareadas ao GE.

4.1.1 - Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão estabelecidos para os dois grupos foram:

Grupo Estudo (GE): composto por pais (mãe e pai) portadores em heterozigose do alelo recessivo da mutação do gene *GJB2*, incluindo o alelo normal e o alelo mutante com mutação na 35delG, identificados por meio da avaliação molecular. Foram incluídos os casais que não apresentavam queixa auditiva, e que possuíam ao menos um filho com DA. Os casais não apresentavam histórico de DA congênita na família, além dos filhos; histórico de alteração condutiva confirmada por timpanograma do tipo A e, quando expostos ao ruído ocupacional, não poderiam ultrapassar 5 anos.

Dessa forma, no GE foram incluídos os pais de 14 deficientes auditivos decorrentes de herança autossômica recessiva, que foram

submetidos ao estudo genético, tendo a análise molecular apontado mutação no gene *GJB2*, sendo 8 indivíduos do gênero feminino com idades entre 10 meses a 22 anos (média 12,8 anos), e 5 indivíduos do gênero masculino com idades entre 02 a 36 anos (média 14,2 anos). A caracterização da audição dos deficientes auditivos cujos pais foram incluídos no estudo referente aos dados da ATL, logaudiometria, reflexos acústicos e EOA-PD em frequências convencionais e ultra-altas frequências, encontram-se no anexo D.

Grupo Controle (GC): constituído por 28 indivíduos que não apresentavam queixas auditivas, sendo os mesmos 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, histórico de exposição a ruído de forte intensidade, consumo de álcool, drogas e ototoxicidade e história pregressa de alteração na orelha média, atestado por timpanograma do tipo A.

4.2 - Procedimentos

Inicialmente, foi realizado levantamento dos prontuários de 21 famílias contendo filhos (as) portadores de DA decorrente por herança autossômica recessiva dentre as atendidas no Serviço de Aconselhamento Genético da UEM. Como nem todas obedeceram aos critérios de inclusão, passou-se a convocar outras famílias de deficientes auditivos oriundos de uma escola de

deficientes auditivos (n=8) e de uma clínica conveniada ao SUS, que fazia seleção e adaptação de aparelhos auditivos (n=15). Estas famílias foram encaminhadas para estudo genético. No total, foram contatadas 44 famílias de deficientes auditivos, sendo 21 famílias contendo filhos deficientes auditivos decorrentes de herança autossômica recessiva, comprovada por meio da avaliação molecular, e 23 famílias de deficientes auditivos para investigar a etiologia. Aqueles que não comprovavam alteração no gene *GJB2* foram excluídos da amostra.

A seguir, os indivíduos foram informados da existência do estudo via telefone, e as famílias que manifestaram interesse tiveram o horário dos exames agendados, comparecendo para a realização da coleta de sangue e avaliação audiológica. Nesta ocasião, foi assinado o Termo de Consentimento Livre Esclarecido, conforme Anexo E.

Para pesquisa da mutação 35delG relacionada ao gene *GJB2*, foi coletado sangue por um técnico farmacêutico da Faculdade Ingá-Uningá, sendo que a análise do material coletado foi realizada no Laboratório de Genética da UEM, conforme protocolo adotado no laboratório utilizando a técnica descrita por Zelante *et al.* (1997), como pode ser verificado no anexo F.

Em ambos os grupos, foram realizadas as avaliações audiológicas sempre no mesmo dia e pelo mesmo profissional, a fim de evitar quaisquer intercorrências que pudessem interferir nos resultados. Após o término das avaliações, os pacientes recebiam cópia do resultado e explicações verbais sobre o exame.

Os procedimentos seguiram a mesma ordem de execução em todos os atendimentos, conforme consta a seguir.

4.2.1 - Anamnese

Foi aplicado um questionário com o objetivo de obter informações relativas à audição, presença ou ausência de queixas auditivas, passado otológico, bem como verificar a presença e/ou ausência dos critérios de inclusão no estudo.

4.2.2 - Inspeção Visual do Meato Acústico Externo

Foi realizada a inspeção visual do MAE, utilizando otoscópio da marca Missouri, para verificar a presença ou ausência de impedimentos para a realização do protocolo da avaliação auditiva. A inspeção do MAE também foi realizada com o propósito de verificar o formato e o tamanho do MAE, para a escolha devida das olivas em borracha, necessárias durante a imitanciometria e emissões otoacústicas.

4.2.3 - Audiometria Tonal Liminar

Foram pesquisados os limiares de via aérea (VA) nas frequências de 250 a 8.000Hz e os limiares de via óssea (VO) nas frequências de 500 a 4.000Hz, utilizando como transdutor o fone supra-aural TDH-39 e o vibrador ósseo B-71, respectivamente. Cabe ressaltar que a intensidade mínima para a pesquisa dos limiares por via óssea foi de 0dBNA.

Para facilitar a análise dos dados da ATL, optou-se por agrupar os resultados em categorias. Desta forma, as categorias estabelecidas para a análise dos limiares audiométricos estão descritas no quadro 1.

Quadro 1 - Categorias de análise dos limiares audiométricos na audiometria tonal liminar

Normal - limiares auditivos $\leq 25\text{dBNA}$.
Rebaixamento auditivo - limiares auditivos $\geq 25\text{dB}$ em uma ou mais frequências.
Deficiência auditiva neurossensorial - média dos limiares auditivos nas frequências de 500, 1.000 e 2.000Hz $\geq 25\text{dB}$.

Foram adotados os critérios de normalidade para a ATL, limiares auditivos $\leq 25\text{dBNA}$, e alterados com limiares auditivos $\geq 25\text{dBNA}$, segundo a classificação de Silman e Silverman (1997).

Para realização da ATL, foi utilizado o equipamento modelo AD229e da marca Interacoustic, calibrado de acordo com as normas ISO 8253/IEC 645/ISO 389.

4.2.4 - Logoaudiometria

Foram pesquisados o Limiar de Reconhecimento de Fala (LRF), o Limiar de Detectabilidade de Fala (LDV) e o Índice Percentual de Reconhecimento de Fala (IPRF) com as listas de vocábulos propostas por Santos e Russo (1991).

Para o LRF compatível, considerou respostas iguais ou até 10dB acima da média dos limiares auditivos das frequências de 500, 1.000 e

2.000Hz na audiometria tonal (Santos e Russo, 1991). Para o IPRF, considerou normal a porcentagem de acerto entre 88% e 100% na intensidade de 30dB acima do LRF (Gates e Chakeres, 1988).

4.2.5 - Imitanciometria

Foram pesquisadas três medidas, a timpanometria, a medida da imitância estática e as medidas do reflexo acústico (RA), utilizando como estímulo acústico o tom de prova na frequência de 226Hz.

As curvas timpanométricas foram classificadas de acordo com os critérios propostos por Jerger (1970) em tipo A, tipo B e tipo C.

Os limiares do RA foram avaliados nas frequências de 500 a 4.000Hz, com os registros contralaterais. Foi considerado RA contralateral normal nas frequências de 500, 1.000, 2.000 e 4.000Hz, entre 90 e 105 dBNA (Carvalho *et al.*, 2000). Os RA foram considerados alterados quando eram ausentes ou excediam 105dBNA em uma ou mais frequências.

O equipamento utilizado para a imitanciometria foi o imitanciômetro modelo AT235 da marca Interacoustics, calibrado de acordo com as normas ISO 8253/IEC 645/ISO 389.

4.2.6 - Emissões otoacústicas Evocada Produto de Distorção

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

Measurement System Starkey, instalado em um computador Pentium do tipo laptop, marca Positivo.

Os componentes originais do equipamento de EOA-PD consistem de: um cartão PCMCIA PC para processamento de sinal digital; um cabo de interface de sonda, conectando a sonda ao computador, que também funciona como pré-amplificador para a sonda; a sonda de EOA-PD *Etymotic* contendo dois transdutores com a função de fornecer dois tons puros, e um microfone para gravar o sinal de entrada; uma sonda de diodo *Network*, para proteção contra danificações devido a descargas eletrostáticas; e olivas para adaptação no MAE do tipo ER10C, com tamanhos variáveis para uso pediátrico, conforme consta na Figura 13.

Figura 13 - Componentes do DP2000/Starkey: cartão PCMCIA (A), sonda (B), cabo de interface de sonda (C), olivas do tipo ER10C (D) e computador (E)

Para registro das EOA-PD, os parâmetros estabelecidos seguiram o padrão recomendado pelo fabricante do equipamento, segundo o proposto por Gorga *et al.* (1997), 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 que se estenderam de 500 a 8.000Hz (frequência convencional) e na faixa de frequência de 9.000 a 16.000Hz (frequência ultra-alta), conforme os quadros 2 e 3.

Quadro 2 - Valores das frequências primárias (f_1 e f_2) do estímulo e da resposta do produto distorcido $2f_1-f_2$ para as frequências convencionais

Frequências primárias		Produto de Distorção $2f_1-f_2$ (Hz)
f_1 (Hz)	f_2 (Hz)	
844	984	703
1.266	1.500	1.031
1.688	2.016	1.359
2.484	3.000	1.969
3.328	3.984	2.672
5.016	6.000	4.031
6.656	8.016	5.297

Quadro 3 - Valores das frequências primárias (f_1 e f_2) do estímulo e da resposta do produto distorcido $2f_1-f_2$ para as frequências ultra-altas

Frequências primárias		Produto de Distorção $2f_1-f_2$ (Hz)
f_1 (Hz)	f_2 (Hz)	
7.266	8.719	5813
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

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 -5dBNPS e quando o nível de resposta estava abaixo de 0dB. Optou-se por este procedimento, para que eventuais movimentações e/ou os ruídos fisiológicos não prejudicassem a obtenção das respostas reais.

O critério utilizado para indicar a presença das EOA-PD foi o proposto por Gorga (1993) e Gorga *et al.* (1997), no qual o nível de resposta devia estar pelo menos 6dBNPS acima do primeiro desvio padrão do ruído na frequência avaliada, ou 3dB acima do segundo desvio padrão do ruído. O nível de ruído de fundo foi sempre igual ou inferior a -5dBNPS para cada frequência avaliada, e o nível da amplitude das EOA-PD maior ou igual a 0dB.

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 MAE e, em seguida, o teste era iniciado. Duas curvas com significativa sobreposição por análise visual foram registradas para verificar uma representação confiável do teste nas faixas de frequências de 1.000 a 8.000Hz e de 9.000 a 16.000Hz, como pode ser visualizado nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

Figura 14 - Calibração da sonda in situ antes do registro de EOA-PD nas frequências de 1.000 a 8.000Hz

Figura 15 - Calibração da sonda in situ antes do registro de EOA-PD nas frequências de 9.000 a 16.000Hz

O tempo de calibração da sonda para as frequências de 1.000 a 8.000Hz foi curto e, geralmente, na primeira tentativa, já era possível calibrar a sonda. Entretanto, o tempo para as frequências de 9.000 a 16.000Hz era longo e difícil para se obter a calibração, sendo necessária em algumas situações a reinserção da sonda do MAE do paciente algumas vezes até a obtenção de um padrão de calibração em que fosse possível prosseguir com

o exame. Mesmo assim, a partir da frequência de 10.000Hz foi possível observar um declínio na curva de resposta da calibração, como demonstra a Figura 15.

4.3 - Método Estatístico

Os resultados foram submetidos à análise descritiva e inferencial, sendo realizada a análise por orelha e em grupos, separadamente, verificando-se os níveis de significância. Foi adotado o nível de significância de 0,05, e os resultados que apresentaram diferença estatisticamente significativa foram assinalados com asterisco (*).

Os testes e técnicas estatísticas utilizados foram: Teste Z de Proporção (compara os resultados normais e alterados em cada grupo); Teste *T-Student* pareado (teste de igualdade de duas médias), Correção de Pearson (mensura o quanto as variáveis estão interligadas), Intervalo de Confiança (analisa o quanto a média pode variar em uma determinada probabilidade de confiança) e Análise Discriminante (variáveis chaves que permitem discriminar os dois grupos).

Resultados

5 - RESULTADOS

Os resultados obtidos foram divididos em partes de acordo com o tipo de análise realizada, conforme se observa a seguir.

Parte 1 - Análise descritiva e comparativa dos exames de Audiometria, Imitanciometria e EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas.

- a) Avaliação comportamental da audição por meio da audiometria tonal liminar no grupo estudo e controle;
- b) Avaliação eletroacústica da audição por meio da imitanciometria no grupo estudo e controle;
- c) Avaliação eletroacústica da audição por meio da EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas no grupo estudo e controle;
- d) Correlação entre os resultados das EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas com a audiometria tonal liminar e imitanciometria no grupo estudo e controle;

Parte 2 - Análise de correlação da idade e EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas.

Parte 3 - Análise inferencial das EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas por meio de intervalos de referência e análise discriminante nos grupos estudo e controle.

5.1 - Análise descritiva e comparativa dos exames de audiometria tonal liminar, imitanciometria e EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas.

a) Avaliação comportamental da audição por meio da audiometria tonal liminar no grupo estudo e controle.

Os resultados apresentados a seguir mostram as análises qualitativas das avaliações obtidas na ATL dos GE e GC. A distribuição da ocorrência de resultados normais e alterados na ATL e o teste Z de proporção entre ambos os resultados encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição da ocorrência de resultados normais e alterados na audiometria tonal liminar entre os grupos estudo e controle

	GE		GC		TESTE Z
	N	%	N	%	P-VALOR
ALTERADO	12	21,4	5	8,9	0,020*
NORMAL	44	78,6	51	91,1	0,089
TOTAL	56	100,0	56	100,0	----

Legenda: N - números de orelhas; P-valor*- resultado estatisticamente significante; Teste estatístico - teste Z

Os achados obtidos na ATL revelaram que, para os grupos avaliados, houve uma maior ocorrência de resultados normais. No teste Z, verificou-se que a proporção de exames alterados no GE foi estatisticamente maior do que no GC. Já o GC apresentou mais exames normais que o GE, porém, não foi estatisticamente significativo.

A distribuição dos tipos de alteração observadas na ATL no GE e GC, bem como o teste Z de proporção entre ambos os resultados, estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição dos tipos de alterações observadas na audiometria tonal liminar entre os grupos estudo e controle

TIPOS DE ALTERAÇÕES	GE		GC		TESTE Z
	N	%	N	%	P-VALOR
DANS	3	25,0	0	0,0	0,007*
REBAIX AUD	9	75,0	5	100,0	0,268
TOTAL	12	100,0	5	100,0	----

Legenda: DANS - Deficiência Auditiva Neurosensorial; REBAIX AUD - Rebaixamento auditivo em algumas frequências; N - número de orelhas alteradas; P-valor*- resultado estatisticamente significativo; Teste estatístico - teste Z

Em ambos os grupos, os achados alterados obtidos na ATL revelaram maior ocorrência de limiares auditivos piores que 25dBNA em algumas frequências, sendo que, no GE, o rebaixamento auditivo aconteceu a partir da frequência de 3.000Hz e, no GC, o rebaixamento aconteceu a partir de 4.000Hz. No GE, observou-se 25% das orelhas com DANS variando de grau leve a moderado. No teste Z, verificou-se que a proporção de exames com DANS foi estatisticamente maior que no GC. Já o GE apresentou maior quantidade de exames alterados que o GC, porém, não foi estatisticamente significativo.

Os resultados obtidos na análise quantitativa da ATL entre as orelhas de ambos os grupos encontra-se na Tabela 3 e a distribuição dos limiares auditivos nas frequências de 250 a 8.000Hz, em cada orelha, podem ser visualizados nos box-plots apresentados na Figura 16. Os valores considerados discrepantes são representados por asteriscos.

Tabela 3 - Comparação entre orelhas direita e esquerda com relação aos resultados obtidos na audiometria tonal liminar nos grupos estudo e controle

AUDIOMETRIA TONAL LIMINAR			MÉDIA (dB)	DESVIO PADRÃO	N	P-VALOR
250Hz	GE	OD	11,8	10,3	28	0,898
		OE	12,1	7,3		
	GC	OD	8,0	4,8	28	0,878
		OE	8,2	4,9		
500Hz	GE	OD	9,6	9,3	28	0,963
		OE	9,5	7,1		
	GC	OD	6,4	5,1	28	0,636
		OE	5,7	5,9		
1.000Hz	GE	OD	7,0	10,0	28	0,741
		OE	6,3	5,4		
	GC	OD	5,5	5,8	28	0,640
		OE	6,3	6,9		
2.000Hz	GE	OD	6,4	9,0	28	0,963
		OE	6,3	7,7		
	GC	OD	6,1	7,4	28	0,891
		OE	6,4	8,1		
3.000Hz	GE	OD	8,2	12,3	28	0,630
		OE	10,0	15,8		
	GC	OD	5,9	7,9	28	0,823
		OE	6,4	8,8		
4.000Hz	GE	OD	10,9	15,4	28	0,999
		OE	10,9	16,4		
	GC	OD	7,1	8,3	28	0,718
		OE	8,0	10,2		
6.000Hz	GE	OD	15,0	15,5	28	0,866
		OE	14,3	16,0		
	GC	OD	10,9	9,7	28	0,938
		OE	10,7	9,5		
8.000Hz	GE	OD	13,8	15,1	28	0,813
		OE	12,9	13,8		
	GC	OD	9,1	10,2	28	0,999
		OE	9,1	10,5		
LRF	GE	OD	11,3	9,8	28	0,857
		OE	10,9	6,5		
	GC	OD	8,2	4,1	28	0,624
		OE	8,9	6,3		
IPRF	GE	OD	94,1%	18,9	28	0,584
		OE	96,1%	3,7		
	CG	OD	97,7%	3,2	28	0,905
		OE	97,6%	3,1		

Legenda: LRF - limiar de reconhecimento de fala; IPRF - índice percentual de reconhecimento de fala; P-valor*- resultado estatisticamente significativo; Teste estatístico - teste t

Figura 16 - *Box-plots* para o Limiar Auditivo (dB) em cada frequência da audiometria tonal liminar por grupo e orelha

Os resultados das avaliações da orelha direita e esquerda mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre as orelhas na ATL, conforme mostra na Tabela 3 e na Figura 16.

Os resultados obtidos na análise quantitativa da ATL entre os grupos encontram-se na Tabela 4, e a distribuição dos valores medianos para os limiares auditivos de cada grupo podem ser visualizados nos box-plots apresentados na Figura 17.

Tabela 4 - Comparação entre as médias das duas orelhas nos grupos estudo e controle com relação aos resultados obtidos na audiometria tonal liminar

AUDIOMETRIA TONAL LIMINAR		MÉDIA (dB)	DESVIO PADRÃO	N	P-VALOR
250Hz	GE	12,0	8,8	56	0,004*
	GC	8,1	4,8		
500Hz	GE	9,6	8,2	56	0,009*
	GC	6,1	5,5		
1.000Hz	GE	6,6	8,0	56	0,608
	GC	5,9	6,3		
2.000Hz	GE	6,3	8,3	56	0,999
	GC	6,3	7,7		
3.000Hz	GE	9,1	14,0	56	0,185
	GC	6,2	8,3		
4.000Hz	GE	10,9	15,8	56	0,179
	GC	7,6	9,2		
6.000Hz	GE	14,6	15,6	56	0,122
	GC	10,8	9,5		
8.000Hz	GE	13,3	14,3	56	0,076
	GC	9,1	10,2		
LRF	GE	11,1	8,2	56	0,057
	GC	8,6	5,3		
IPRF	GE	95,1%	13,5	56	0,179
	GC	97,6%	3,1		

Legenda: LRF - limiar de reconhecimento de fala; IPRF - índice percentual de reconhecimento de fala; P-valor*- resultado estatisticamente significativo; Teste estatístico - teste t

Agrupando-se os valores obtidos entre as orelhas na ATL, a Tabela 4 revelou resultado estatisticamente significativo nas frequências de 250 e 500Hz entre os grupos. Tanto na análise por orelha, como por grupo, não foi observada diferença significativa na logaudiometria.

Figura 17 - *Box-plots* e perfis medianos para o limiar auditivo (dB) em cada frequência da audiometria tonal liminar por grupo

A Figura 17 demonstra que não houve resultado estatisticamente significativo entre os grupos, sendo observada maior diferença nas frequências de 250 e 500Hz.

b) Avaliação eletroacústica da audição por meio da imitanciometria no grupo estudo e controle

Para a avaliação da função da orelha média, foram pesquisados os resultados da imitanciometria por meio da timpanometria e reflexo acústico (RA). Na primeira modalidade, verificou-se curva timpanométrica do tipo A em todos os indivíduos, tanto no GE, quanto no GC.

Nos RA, os resultados foram classificados em normais e alterados, sendo que a distribuição dos mesmos entre os grupos e o teste Z de proporção entre ambos os resultados encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Distribuição da ocorrência de resultados normais e alterados dos reflexos acústicos contralaterais entre os grupos estudo e controle

	GE		GC		TESTE Z
	N	%	N	%	P-VALOR
ALTERADO	10	17,8	4	7,1	0,619
NORMAL	46	82,2	52	92,9	0,108
TOTAL	56	100,0	56	100,0	----

Legenda: N - números de orelhas; P-valor*- resultado estatisticamente significativo; Teste estatístico - teste Z

Na avaliação dos RA contralaterais, verificou-se que houve uma maior ocorrência de resultados dentro da normalidade para ambos os grupos avaliados. No teste Z, verificou-se que a proporção de exames alterados no GE foi maior que no GC, porém, não foi estatisticamente significativa. O GC também apresentou mais exames normais que GE, porém, não apresentou significância estatística.

Os resultados obtidos na análise quantitativa dos RA contralaterais entre as orelhas de ambos os grupos encontram-se na Tabela 6, e os valores do RA em cada orelha encontra-se nos box-plots da Figura 18.

Tabela 6 - Comparação das médias entre as orelhas direita e esquerda com relação aos resultados obtidos no reflexo acústico contralateral nos grupos estudo e controle

REFLEXO ACÚSTICO CONTRALATERAL			MÉDIA (dB)	DESVIO PADRÃO	N	P-VALOR
500Hz	GE	OD	91,8	5,6	28	0,611
		OE	91,1	4,6		
	GC	OD	88,9	5,8	28	0,842
		OE	88,6	5,4		
1.000z	GE	OD	91,3	5,9	28	0,205
		OE	89,5	5,5		
	GC	OD	89,5	5,5	28	0,782
		OE	89,1	5,3		
2.000Hz	GE	OD	89,5	5,2	28	0,943
		OE	89,6	5,3		
	GC	OD	88,9	6,0	28	0,857
		OE	88,6	6,4		
4.000Hz	GE	OD	91,3	8,1	28	0,643
		OE	92,3	8,0		
	GC	OD	89,1	6,5	28	0,913
		OE	88,9	7,2		

Legenda: N - número de orelhas; P-valor* - resultado estatisticamente significante; Teste estatístico - teste t

Figura 18 - Box-plots do reflexo acústico contralateral (dB) em cada frequência por grupo e orelha

Na análise dos resultados obtidos do RA contralateral, foi possível observar que não houve diferença significativa entre as orelhas de ambos os grupos, conforme mostra a Tabela 6 e a Figura 18.

Os resultados obtidos na análise quantitativa dos RA contralaterais entre os grupos encontram-se na Tabela 7, e os box-plots com os perfis medianos do RA por grupo encontram-se na Figura 19.

Tabela 7 - Comparação das médias das orelhas direita e esquerda entre os grupos estudo e controle com relação aos resultados obtidos no reflexo acústico contralateral

REFLEXO ACÚSTICO CONTRALATERAL		MÉDIA (dB)	DESVIO PADRÃO	N	P-VALOR
500Hz	GE	91,4	5,1	56	0,115
	GC	88,8	5,6		
1.000Hz	GE	91,8	8,0	56	0,484
	GC	89,0	6,8		
2.000Hz	GE	89,6	5,2	56	0,456
	GC	88,8	6,1		
4.000Hz	GE	90,4	5,7	56	0,292
	GC	89,3	5,3		

Legenda: N - número de orelhas; P-valor* - resultado estatisticamente significativo; Teste estatístico - teste t

Figura 19 - Box-plots e perfis medianos do reflexo acústico contralateral (dB) em cada frequência por grupo

Agrupando-se os valores obtidos das orelhas dos GE e GC dos reflexos acústicos, notou-se que os resultados não foram estatisticamente significativos, embora maiores para o GE, como pode ser visualizado na Tabela 7 e na Figura 19.

c) Avaliação eletroacústica da audição por meio das EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas no grupo estudo e controle.

Os resultados apresentados a seguir mostram as análises qualitativas das avaliações obtidas nas respostas de EOA-PD geradas na região de $2f_1$ - f_2 em frequências convencionais e frequências ultra-altas. A distribuição da ocorrência de resultados normais e alterados das EOA-PD, bem como o teste Z de proporção entre ambos os resultados, encontram-se demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Distribuição da ocorrência de resultados normais e alterados nas EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas entre os grupos

EMISSÃO OTOACÚSTICA		GE		GC		TESTE Z
		N	%	N	%	P-VALOR
ALTERADO	FC	5	8,9	3	5,3	0,858
	FUA	20	35,7	5	8,9	0,255
NORMAL	FC	51	91,1	53	94,7	0,475
	FUA	36	64,3	51	91,1	0,002*

Legenda: FC - Frequências Convencionais; FUA - Frequências Ultra-Altas; N - número de orelhas; P-valor* - resultado estatisticamente significativo; Teste estatístico - teste Z

Os achados obtidos nas EOA-PD revelaram que o GC obteve maior ocorrência de resultados normais que o GE. A maior diferença ocorreu nas frequências ultra-altas, sendo observado 64,3% de resultados dentro da

normalidade no GE em comparação a 91,1% no GC. No teste Z, verificou-se que a proporção de exames normais no GC foi estatisticamente significativa nas frequências ultra-altas em relação ao GE.

Os resultados obtidos na análise quantitativa das EOA-PD nas frequências convencionais entre as orelhas direita e esquerda de ambos os grupos encontram-se na Tabela 9, e os valores de EOA-PD por orelha encontram-se nos box-plots da Figura 20.

Tabela 9 - Comparação das médias entre as orelhas direita e esquerda com relação aos resultados obtidos nas EOA-PD em frequências convencionais

EMISSÕES OTOACÚSTICAS PRODUTO DE DISTORÇÃO			MÉDIA (dBNPS)	DESVIO PADRÃO	N	P-VALOR
703Hz	GE	OD	11,7	4,7	28	0,663
		OE	11,2	3,8		
	GC	OD	14,8	5,6	28	0,896
		OE	15,0	5,8		
1.031Hz	GE	OD	13,0	4,9	28	0,524
		OE	13,9	5,6		
	GC	OD	19,3	7,2	28	0,655
		OE	18,5	6,1		
1.359Hz	GE	OD	13,7	5,0	28	0,283
		OE	15,3	6,0		
	GC	OD	22,5	7,8	28	0,425
		OE	20,9	7,1		
1.969Hz	GE	OD	14,5	6,4	28	0,561
		OE	15,5	6,4		
	GC	OD	22,9	6,4	28	0,264
		OE	20,8	7,5		
2.672Hz	GE	OD	12,8	3,7	28	0,151
		OE	14,6	5,4		
	GC	OD	21,6	6,1	28	0,811
		OE	21,2	6,4		
4.031Hz	GE	OD	12,9	4,0	28	0,412
		OE	13,9	5,0		
	GC	OD	19,1	6,3	28	0,652
		OE	18,4	5,2		
5.297Hz	GE	OD	10,5	4,2	28	0,545
		OE	11,2	4,4		
	GC	OD	15,3	5,6	28	0,532
		OE	9,4	4,0		

Legenda: N - número de orelhas; P-valor* - resultado estatisticamente significativo; Teste estatístico - teste t

Figura 20 - Box-plots para EOA-PD (dBNPS) em cada frequência convencional por grupo e orelha

Foi possível observar, na Tabela 9 e na Figura 20, que houve uma tendência das EOA-PD apresentarem-se mais elevadas no GC, porém, não houve diferença estatisticamente significante entre as orelhas, quando avaliadas no mesmo grupo. Também foi possível constatar, em relação aos valores médios, vantagem da orelha direita sobre a orelha esquerda, nas respostas de EOA-PD, apenas no GC.

Os resultados obtidos na análise quantitativa das EOA-PD nas frequências convencionais entre os grupos encontram-se na Tabela 10, e os *box-plots* com perfis medianos para EOA-PD por grupo, nas frequências convencionais, encontram-se na Figura 21.

Tabela 10 - Comparação das médias entre os grupos estudo e controle com relação aos resultados obtidos nas EOA-PD em frequências convencionais

EMISSIONES OTOACÚSTICAS PRODUTO DE DISTORÇÃO		MÉDIA (dBNPS)	DESVIO PADRÃO	N	P-VALOR
703Hz	GE	11,4	4,2	56	0,024*
	GC	14,9	5,6		
1.031Hz	GE	13,5	5,2	56	0,001*
	GC	18,9	6,6		
1.359Hz	GE	14,5	5,5	56	0,001*
	GC	21,7	7,5		
1.969Hz	GE	15,0	6,3	56	0,001*
	GC	21,8	7,0		
2.672Hz	GE	13,7	4,6	56	0,001*
	GC	21,4	6,2		
4.031Hz	GE	13,4	4,5	56	0,001*
	GC	18,8	5,7		
5.297Hz	GE	10,9	4,3	56	0,001*
	GC	14,8	5,9		

Legenda: N - número de orelhas; Valor P* - resultado estatisticamente significativo; Teste estatístico - teste t

Figura 21 - Box-plots e perfis medianos para EOA-PD (dBNPS) por grupo nas frequências convencionais

Como pode ser visualizado na Tabela 10 e na Figura 21, houve resultado estatisticamente significativo em todas as frequências entre os grupos, ao agrupar-se os valores obtidos nas orelhas direita e esquerda.

Os resultados obtidos na análise quantitativa das EOA-PD nas frequências ultra-altas entre as orelhas avaliadas de ambos os grupos encontram-se na Tabela 11, e os valores de EOA-PD por orelha encontram-se na Figura 22.

Figura 22 - *Box-plots* para EOA-PD (dBNPS) em cada frequência ultra-alta por grupo e orelha

Tabela 11 - Comparação das médias entre as orelhas direita e esquerda com relação aos resultados obtidos nas EOA-PD em frequências ultra-altas

EMISSIONES OTOACÚSTICAS PRODUTO DE DISTORÇÃO			MÉDIA (dBNPS)	DESVIO PADRÃO	N	P-VALOR
5.813Hz	GE	OD	9,0	3,9	28	0,768
		OE	9,3	3,7		
	GC	OD	12,6	4,4	28	0,426
		OE	11,7	4,0		
6.328Hz	GE	OD	8,9	3,7	28	0,846
		OE	9,1	4,0		
	GC	OD	12,8	3,8	28	0,691
		OE	12,4	3,7		
6.891Hz	GE	OD	9,5	4,1	28	0,926
		OE	9,4	4,0		
	GC	OD	14,5	4,1	28	0,797
		OE	14,8	4,6		
7.547Hz	GE	OD	11,2	4,2	28	0,652
		OE	11,8	5,6		
	GC	OD	15,5	4,8	28	0,999
		OE	15,5	4,7		
8.203Hz	GE	OD	11,2	4,3	28	0,204
		OE	12,8	5,0		
	GC	OD	16,2	4,5	28	0,884
		OE	16,0	5,7		
8.953Hz	GE	OD	10,9	4,4	28	0,814
		OE	11,2	5,1		
	GC	OD	14,7	4,7	28	0,874
		OE	14,5	4,7		
9.797Hz	GE	OD	8,7	3,5	28	0,488
		OE	9,4	4,0		
	GC	OD	13,3	4,4	28	0,301
		OE	12,6	4,2		
10.641Hz	GE	OD	7,6	3,2	28	0,378
		OE	8,5	4,3		
	GC	OD	10,6	3,2	28	0,999
		OE	10,6	3,2		

Legenda: N - número de orelhas; P-valor* - resultado estatisticamente significativo; Teste estatístico - teste t

Foi possível observar na Tabela 11 e na Figura 22 uma tendência das EOA-PD apresentarem-se mais elevadas no GC, porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre as orelhas, quando avaliadas no mesmo grupo.

Os resultados obtidos na análise quantitativa das EOA-PD em frequências ultra-altas entre os grupos encontram-se na Tabela 12, e os perfis medianos para EOA-PD por grupo nas frequências ultra-altas podem ser visualizados nos box-plots apresentados na Figura 23.

Tabela 12 - Comparação das médias entre os grupos estudo e controle com relação aos resultados obtidos nas EOA-PD em frequências ultra-altas

EMISSIONES OTOACÚSTICAS PRODUTO DE DISTORÇÃO		MÉDIA (dBNPS)	DESVIO PADRÃO	N	P-VALOR
5.813Hz	GE	9,1	3,7	56	0,001*
	GC	12,2	4,2		
6.328Hz	GE	9,0	3,8	56	0,001*
	GC	12,6	3,7		
6.891Hz	GE	9,4	4,0	56	0,001*
	GC	14,7	4,3		
7.547Hz	GE	11,5	4,9	56	0,001*
	GC	15,5	4,7		
8.203Hz	GE	12,0	4,7	56	0,001*
	GC	16,1	5,1		
8.953Hz	GE	11,1	4,7	56	0,001*
	GC	14,6	4,7		
9.797Hz	GE	9,7	3,9	56	0,001*
	GC	13,0	4,3		
10.641Hz	GE	8,8	4,3	56	0,013*
	GC	10,6	3,2		

Legenda: N - número de orelhas; P-valor* - resultado estatisticamente significativo; Teste estatístico - teste t

Figura 23 - Box-plots e perfis medianos para EOA-PD (dBNPS) por grupo nas frequências ultra-altas

Verificou-se resultado estatisticamente significativo em todas as frequências entre os grupos, como pode ser visualizado na Tabela 12, e as medianas obtidas no GE foram piores do que as obtidas no GC, sendo constatada diferença estatisticamente significante entre os grupos, como demonstra a Figura 23.

d) Correlação entre os resultados das EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas com a audiometria tonal liminar e reflexo acústico no grupo estudo e controle.

A fim de verificar a correlação entre a ATL e as respostas de EOA-PD geradas na região de $2f_1$ - f_2 em frequências convencionais e em frequências ultra-altas, utilizou-se a Correlação de Pearson entre as orelhas e entre os grupos.

A Tabela 14 demonstra a correlação de Pearson entre os resultados obtidos nas EOA-PD e ATL em ambas as orelhas e grupos, enquanto a Tabela 13 demonstra a correlação de Pearson entre os resultados obtidos nos RA contralaterais e EOA-PD em ambas as orelhas e grupos.

Tabela 13 - Correlação de Pearson entre os resultados obtidos nos reflexos acústicos contralaterais e EOA-PD (dBNPS) em ambas as orelhas e grupos

FREQUÊNCIAS				CORRELAÇÃO DE PEARSON DE PEARSON (ORELHAS)		CORRELAÇÃO DE PEARSON DE PEARSON (GRUPOS)	
RA CONTRA	EOA-PD				P-VALOR		P-VALOR
500Hz	703Hz	GE	OD	0,190	0,332	0,208	0,123
			OE	0,226	0,245		
		GC	OD	0,001	0,992	-0,027	0,840
			OE	-0,056	0,773		
1.000Hz	1.031Hz	GE	OD	0,117	0,928	0,099	0,463
			OE	0,115	0,559		
		GC	OD	-0,350	0,067	-0,146	0,282
			OE	0,098	0,618		
2.000Hz	1.969Hz	GE	OD	0,017	0,928	-0,123	0,366
			OE	-0,264	0,173		
		GC	OD	-0,384	0,043	-0,176	0,193
			OE	-0,019	0,921		
4.000Hz	4.031Hz	GE	OD	-0,071	0,716	-0,036	0,791
			OE	-0,021	0,913		
		GC	OD	-0,248	0,203	-0,122	0,370
			OE	0,009	0,960		

Legenda: P-valor* - resultado estatisticamente significante; Teste estatístico - teste t

Na Tabela 13, notou-se que não houve correlação entre as orelhas e grupos, comparando-se a relação S/R das EOA-PD com os RA contralaterais.

Tabela 14 - Correlação de Pearson entre os resultados obtidos na audiometria tonal liminar e EOA-PD (dBNPS) em ambas as orelhas e grupos

FREQUÊNCIAS				CORRELAÇÃO DE PEARSON (ORELHAS)	P-VALOR	CORRELAÇÃO DE PEARSON (GRUPOS)	P-VALOR
ATL	EOA-PD						
500Hz	703Hz	GE	OD	-0,150	0,444	-0,226	0,099
			OE	-0,158	0,430		
		GC	OD	0,026	0,894	-0,102	0,452
			OE	0,026	0,894		
1.000Hz	1.031Hz	GE	OD	-0,267	0,168	-0,124	0,368
			OE	0,079	0,693		
		GC	OD	-0,264	0,173	-0,337	0,010*
			OE	-0,264	0,173		
2.000Hz	1.969Hz	GE	OD	-0,382	0,044*	-0,108	0,433
			OE	-0,055	0,784		
		GC	OD	-0,108	0,584	-0,172	0,2027
			OE	-0,108	0,584		
3.000Hz	2.672Hz	GE	OD	-0,310	0,107	-0,324	0,016*
			OE	-0,508	0,006*		
		GC	OD	-0,346	0,070	-0,369	0,005*
			OE	-0,346	0,070		
4.000Hz	4.031Hz	GE	OD	-0,014	0,940	-0,151	0,275
			OE	-0,052	0,795		
		GC	OD	-0,524	0,004*	-0,408	0,001*
			OE	-0,524	0,004*		
6.000Hz	5.813Hz	GE	OD	-0,185	0,344	0,050	0,718
			OE	-0,053	0,789		
		GC	OD	-0,269	0,165	-0,209	0,1205
			OE	-0,269	0,165		
8.000Hz	8.203Hz	GE	OD	-0,060	0,758	0,125	0,365
			OE	0,058	0,770		
		GC	OD	-0,116	0,556	-0,247	0,065
			OE	-0,116	0,556		

Legenda: P-valor* - resultado estatisticamente significante; Teste estatístico - teste t

Na Tabela 14, foi possível observar que a correlação entre as orelhas e grupos demonstrou correlações negativas, exceto na faixa de frequência de 500Hz do GC, indicando que, conforme aumentava a relação S/R das EOA-PD, ocorreu uma diminuição nos resultados da ATL ou melhora nos limiares auditivos. No GE, foi observado que o p-valor obteve correlação significativa na frequência de 3.000Hz, enquanto que o GC demonstrou correlação significativa nas frequências de 1.000, 3.000 e 4.000Hz, indicando que a ATL e as EOA-PD são linearmente dependentes ou relacionadas e vice-versa.

5.2 - Análise de correlação entre idade e EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas

O comportamento conjunto das EOA-PD e a idade em cada frequência convencional nos dois grupos podem ser visualizados nos diagramas de dispersão apresentados nas Figuras 24 (orelha direita) e 25 (orelha esquerda). Para as frequências ultra-altas, os diagramas de dispersão são encontrados nas Figuras 26 (orelha direita) e 27 (orelha esquerda).

Figura 24 - Diagramas de dispersão das EOA-PD e a idade nos dois grupos em cada frequência convencional da orelha direita

Figura 25 - Diagramas de dispersão das EOA-PD e a idade nos dois grupos em cada frequência convencional da orelha esquerda

Na Figura 24, é observada uma tendência na nuvem de pontos do GC, nas frequências de 1.969, 2.672 e 4.031Hz; nota-se, ainda, que as EOA-PD tendem a diminuir com o aumento da idade. Na Figura 25, a mesma tendência é observada no GE, nas frequências de 1.031, 1.359 e 2.672Hz.

Figura 26 - Diagramas de dispersão das EOA-PD e a idade nos dois grupos em cada frequência ultra-alta na orelha direita

Figura 27 - Diagramas de dispersão das EOA-PD e a idade nos dois grupos em cada frequência ultra-alta na orelha esquerda

Nas EOA-PD em frequências, não são observadas tendências nas nuvens de pontos conforme o aumento da idade como mostram as Figuras 26 e 27.

Para medir a correlação entre a idade e as EOA-PD, em cada frequência, foram calculados os valores do coeficiente de correlação de Pearson em cada grupo e orelha. Os valores observados são apresentados nas Tabelas 15 (frequências convencionais) e 16 (frequências ultra-altas).

Tabela 14 - Valores observados do coeficiente de correlação de Pearson da idade e as EOA-PD (dBNPS) nas frequências convencionais por grupo e orelha

FREQUÊNCIA (Hz)		CONTROLE		ESTUDO	
		OD	OE	OD	OE
703	R	-0,27	-0,25	-0,28	-0,12
	P	0,160	0,195	0,151	0,560
1.031	R	-0,27	-0,24	-0,26	-0,33
	P	0,158	0,220	0,177	0,088
1.359	R	-0,28	-0,17	-0,26	-0,41*
	P	0,154	0,382	0,177	0,031*
1.969	R	-0,43*	-0,07	-0,22	-0,25
	P	0,022*	0,708	0,261	0,196
2.672	R	-0,47*	-0,26	-0,28	-0,42*
	P	0,012*	0,178	0,153	0,025*
4.031	R	-0,57*	-0,15	-0,21	-0,32
	P	0,002*	0,451	0,295	0,096
5.297	R	-0,28	0,03	0,08	0,02
	P	0,146	0,865	0,687	0,936

Legenda: R - correlação de Pearson; P - resultado estatisticamente significativo

Tabela 15 - Valores observados do coeficiente de correlação de Pearson da idade e as EOA-PD (dBNPS) nas frequências ultra-altas por grupo e orelha

FREQUÊNCIA (Hz)		CONTROLE		ESTUDO	
		OD	OE	OD	OE
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	0,38
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 significativo

Nota-se, na Tabela 15, que há correlação negativa significativa no GC, orelha direita, nas frequências de 1.969, 2.672 e 4.031Hz; no GE, há correlação negativa significativa nas frequências de 1.359 e 2.672Hz na orelha esquerda. Na Tabela 16, nota-se que não há correlação entre a idade e as EOA-PD em todas as frequências ultra-altas, nos dois grupos e orelhas. Vale ressaltar que uma correlação negativa significa que as EOA-PD tendem a diminuir com o aumento da idade.

5.3 - Análise inferencial das EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas por meio de intervalos de referência e análise discriminante nos grupos estudo e controle

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 (Boyd e Harris, 1995). Os percentis 5% e 95% das EOA-PD em cada frequência são encontrados na Tabela 17 (GE e GC) e estão representados nas Figuras 28 e 30 (GE) e 29 e 31 (GC).

Tabela 16 - Percentis de ordem 5% e 95% das EOA-PD (dBNPS) em cada frequência do grupo estudo e grupo controle

CATEGORIA DE FREQUÊNCIA	FREQUÊNCIA (Hz)	GRUPO ESTUDO		GRUPO CONTROLE	
		Percentil		Percentil	
		5%	95%	5%	95%
Convencional	703	6,1	18,9	6,7	25,2
	1.031	6,5	24,1	8,9	30,9
	1.359	6,6	28,1	9,9	35,2
	1.969	7,2	28,4	10,5	34,7
	2.672	7,4	22,7	12,2	33,7
	4.031	6,9	20,3	11,4	29,0
	5.297	5,8	18,2	5,5	25,7
	5.813	4,8	16,4	5,2	19,2
Ultra-Alta	6.328	4,2	17,3	5,2	18,2
	6.891	4,6	17,9	6,0	22,6
	7.547	4,8	21,7	7,8	23,3
	8.203	5,4	19,9	7,5	24,9
	8.953	5,0	20,3	7,1	22,0
	9.797	4,7	16,7	6,6	21,3
	10.641	4,1	18,5	6,5	17,0

Figura 28 - Percentis de ordem 5% e 95% das EOA-PD (dBNPS) nas frequências convencionais do grupo estudo

Figura 29 - Percentis de ordem 5% e 95% das EOA-PD (dBNPS) nas frequências convencionais do grupo controle

Figura 30 - Percentis de ordem 5% e 95% das EOA-PD (dBNPS) nas frequências ultra-altas do grupo estudo

Figura 31 - Percentis de ordem 5% e 95% das EOA-PD (dBNPS) nas frequências ultra-altas do grupo controle

A partir da Tabela 17, é possível observar que, em uma dada frequência, 90% dos indivíduos do grupo têm EOA-PD entre o limite inferior e o limite superior, por exemplo, na frequência de 1.969Hz, 95% dos indivíduos têm EOA-PD entre 7,2 e 20,4dB no GE, enquanto que 95% dos indivíduos têm EOA-PD entre 10,5 e 34,7dB no GC. Possivelmente, os intervalos que têm melhor interpretação são os obtidos no GC, pois definem um padrão de normalidade para as EOA-PD.

Pode ser observado, nas Figuras 32 e 33, que vários indivíduos do GE estão abaixo do limite inferior de referência.

Figura 32 - Diagrama de dispersão das EOA-PD correlacionando as frequências no grupo estudo e os limites de referência para EOA-PD estimados no grupo controle para as frequências convencionais

Figura 33 - Diagrama de dispersão das EOA-PD correlacionado as frequências no grupo estudo e limites de referência para EOA-PD estimados no grupo controle para as frequências ultra-altas

Para a construção das regras de classificação, foi utilizada a técnica de análise discriminante, com a finalidade de obter um número menor de variáveis que forneçam quase a mesma informação das variáveis originais, e que sejam suficientes para discriminar os dois grupos (Johnson e Wichern, 1992).

Desta maneira, o objetivo desta parte da análise é obter regras que permitam classificar um novo indivíduo em um dos grupos: Controle ou Estudo, com base nas EOA-PD em 1.969Hz e 5.297Hz, ou 8.203Hz e 10.641Hz. Conhecidos os valores do teste de um indivíduo nessas frequências, é possível calcular os correspondentes valores das funções discriminantes, denominados escores discriminantes, em cada grupo. O indivíduo é classificado no grupo no qual obteve maior escore.

Inicialmente, foram construídos diagramas de dispersão das EOA-PD em 1.969Hz e 5.297Hz para as frequências convencionais (Figura 34), e em 8.203 Hz e 10.641Hz para as frequências ultra-altas (Figura 35).

A frequência convencional de 1.969Hz e a frequência ultra-alta de 8.203Hz foram selecionadas porque apresentaram a resposta de EOA-PD com melhor relação S/R, enquanto que as frequências de 5.297Hz e de 10.641Hz foram utilizadas porque representam a última porção em $2f_1-f_2$ das frequências convencionais e frequências ultra-altas, respectivamente.

Figura 34 - Diagrama de dispersão das EOA-PD em 1.969 Hz e 5.297Hz

Figura 35 - Diagrama de dispersão das EOA-PD em 8.203 Hz e 10.641Hz

É possível visualizar, nas Figuras 34 e 35, que, quando são considerados os resultados nas frequências convencionais de 1.969Hz e 5.297Hz, e nas frequências ultra-altas de 8.203Hz e 10.641Hz, há uma maior separação entre os grupos nas frequências convencionais.

A regra obtida com base nas EOA-PD em 1.969Hz e 5.297Hz foi:

Classificar o indivíduo no GE se o valor da expressão:

$$3,0 - 0,14 * \text{EOA-PD em 1.969Hz} - 0,03 * \text{EOA-PD em 5.297Hz} > 0;$$

Classificar no GC caso contrário.

Cada indivíduo da amostra foi classificado por meio das funções acima, obtendo-se a matriz de classificação apresentada na Tabela 18. Nota-se que 70% dos indivíduos foram classificados corretamente no GE.

Tabela 17 - Matriz de classificação obtida na análise discriminante considerando as EOA-PD em 1.969Hz e 5.297Hz

CLASSIFICAÇÃO	GRUPO	
	CONTROLE	ESTUDO
Controle	35	17
Estudo	21	39
N	56	56
Nº classificações corretas	35	39
Porcentagem de classificações corretas	63%	70%

Considerando as frequências de 8.203Hz e 10.641Hz obteve-se a seguinte regra de classificação:

Classificar o indivíduo no GE se o valor da expressão:

$$2,8 - 0,14 * \text{EOA-PD em 8.203Hz} - 0,12 * \text{EOA-PD em 10.641 Hz} > 0;$$

Classificar no GC caso contrário.

Aplicando essa regra aos indivíduos da amostra, obteve-se que 71,4% do GE foram classificados corretamente. Os resultados da classificação dos indivíduos de cada grupo estão resumidos na Tabela 19.

Tabela 18 - Matriz de classificação obtida na análise discriminante considerando as EOA-PD em 8.203 Hz e 10.641Hz

CLASSIFICAÇÃO	GRUPO	
	CONTROLE	ESTUDO
Controle	36	16
Estudo	20	40
N	56	56
Nº classificações corretas	36	40
Porcentagem de classificações corretas	64,3%	71,4%

Nas Tabelas 18 e 19 são apresentados os dados da matriz de classificação obtida para os indivíduos da amostra classificados em cada grupo, conforme as funções discriminantes. Nota-se que a porcentagem de

classificação correta no GC é menor, isto ocorre porque este grupo dispersou-se entre os indivíduos, como pode ser observado no diagrama de dispersão das Figuras 34 e 35.

Discussão

6 - DISCUSSÃO

Para facilitar a leitura e o encadeamento das idéias, o capítulo foi organizado na ordem da apresentação dos resultados, da seguinte forma:

6.1 - Análise descritiva e comparativa dos exames de ATL, RA e EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas;

6.2 - Análise de correlação da idade e EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas;

6.3 - Análise inferencial dos resultados das EOA-PD nas frequências convencionais e frequências ultra-altas por meio dos intervalos de referência e análise discriminante nos grupos estudo e controle.

6.1 - Análise dos resultados dos exames de ATL, RA e EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas.

Neste estudo foi testada a hipótese de que pais portadores em heterozigose do alelo recessivo que causa a DA, mesmo sem queixas auditivas, poderiam apresentar alterações discretas na audição, evidenciadas por meio da diminuição nas respostas de EOA-PD, quando comparados a pais assintomáticos e sem fatores de risco para a DA, visto que as CCE na espira basal da cóclea sofrem com alterações cocleares sutis.

De maneira geral, a análise demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as orelhas e grupos nos achados da ATL

e RA, porém, nas respostas de EOA-PD, o GE apresentou menor nível de resposta, demonstrando diferença estatisticamente significativa em todas as frequências em comparação ao GC. Em outras palavras, pode-se afirmar que as EOA-PD, tanto para as frequências convencionais, quanto para as frequências ultra-altas, foram capazes de melhor diferenciar os indivíduos do GE e do GC, sugerindo que alterações nas CCE, resultado do mecanismo defeituoso das junções do tipo *gap*, causado pela mutação no gene *GJB2*, podem ser notadas nas emissões otoacústicas em pais de portadores de DA por herança autossômica recessiva.

Para Engel-Yeger *et al.* (2002) e Silva *et al.* (2010), o estudo das medidas de audição nos pais de deficientes auditivos de herança autossômica recessiva 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.

A casuística deste estudo envolveu sujeitos que não apresentavam queixa auditiva, por isto, os achados da ATL são semelhantes, ou seja, houve uma maior ocorrência de resultados normais em ambos os grupos avaliados (Tabela 1). Entretanto, no grupo de pais (GE) alguns apresentaram perda de audição, o que não era esperado, pois referiram possuir uma audição normal previamente à avaliação audiológica.

Os sujeitos do GE apresentaram maior proporção de exames alterados com limiares auditivos elevados, em nível de intensidade superior

a 25dBNA e DANS variando de grau leve a moderado (Tabela 2). Para Franzé *et al.* (2005), o padrão de curva audiométrica tipicamente encontrada em sujeitos heterozigotos para a mutação do gene *GJB2* é queda nas frequências de 6.000 a 8.000Hz. O que se observou, neste estudo, foi rebaixamento a partir da frequência de 3.000Hz no GE e, a partir de 4.000Hz, no GC (Tabela 2).

Gates *et al.* (1999) encontraram que, em pais de sujeitos com DA de origem genética, há uma grande ocorrência de limiares rebaixados, não só nas altas frequências, mas também nas frequências mais baixas. Entretanto, Rosa *et al.* (2002) e Engel-Yeger *et al.* (2003) encontraram que pais de sujeitos com DA de origem genética apresentam limiares auditivos piores na faixa de frequência entre 9.000 a 20.000Hz e entre 9.000 a 10.000Hz, respectivamente. Para Foiadelli (2001), não é possível identificar, nas famílias que contenham portadores de DA genética herdada recessivamente, um padrão audiométrico sugestivo de alteração que possa ser transmitida aos filhos, sendo necessário a continuidade de estudos dessa natureza com essa população.

No estudo de Retamal *et al.* (2004) com indivíduos normo-ouvintes, a acuidade auditiva decresce de modo progressivo à medida que a frequência testada aumenta, ocorrendo uma piora gradativa dos limiares auditivos a partir da frequência de 11.200Hz. No geral, a investigação da audição, por meio da pesquisa de limiares para frequências ultra-altas, permite a identificação de discretas alterações na função auditiva, associadas a respostas menos robustas nas emissões otoacústicas (Carvallo, 2002).

No presente estudo, a ATL não demonstrou diferença entre as orelhas direita e esquerda no mesmo grupo, confirmando baixa variabilidade entre as orelhas (Tabela 3 e Figura 16). Diante de tal resultado, as orelhas foram analisadas conjuntamente dentro de cada grupo, sendo que não houve diferença significativa entre os grupos, exceto nas frequências de 250 e 500Hz, porém, não foi possível distinguir o GE do GC, já que ambos apresentavam características semelhantes de limiares auditivos dentro dos padrões de normalidade. Desta forma, considerou-se que não houve diferença significativa que diferenciasse os grupos quanto à ATL (Tabela 4 e Figura 17).

Todos os indivíduos do presente estudo apresentaram função normal da orelha média evidenciada por meio da curva timpanométrica do tipo A e presença de RA (Tabela 5). Na realidade, o motivo principal para utilizar a timpanometria neste estudo, foi para excluir alterações condutivas em ambos os grupos avaliados, visando diminuir a variabilidade no registro das emissões otoacústicas, já que a possibilidade de haver ondas estacionárias em orelhas médias comprometidas é maior, segundo Roger (2010). Scheperle (2008) verificou uma redução de até 20dBNPS em frequências ultra-altas, em orelhas que apresentavam altos índices de ondas estacionárias no momento da realização das emissões otoacústicas.

Referente aos RA contralaterais, não foi observada diferença significativa entre as orelhas (Tabela 6 e Figura 18), e, quando foram agrupados os valores obtidos das orelhas de ambos os grupos, também notou-se que os resultados não diferiram de forma estatisticamente

significativa (Tabela 7 e Figura 19), possivelmente devido à ausência de história pregressa de alterações condutivas em ambos os grupos avaliados

No que tange aos resultados das EOA-PD, os achados obtidos revelaram que o GE apresentou menor ocorrência de resultado normal que o GC, sendo que a maior diferença ocorreu nas frequências ultra-altas (Tabela 8). Mesmo observando uma similaridade nos testes audiológicos convencionais, houve diferença nas EOA-PD entre os sujeitos portadores em heterozigose da mutação no gene *GJB2* e não-portadores, sugerindo que as CCE sejam mais sensíveis aos efeitos negativos que a mutação proporciona.

Tal resultado pode ter sucedido porque, para ocorrer alteração nos limiares auditivos, pelo menos 50% das CCE devem estar lesionadas, enquanto que menor lesão das CCE é necessária para diminuir o nível de resposta das EOA, segundo Bohne e Clark (1982). Assim, as EOA são mais sensíveis à disfunção coclear do que a ATL, pois, para haver alteração em tons puros, existe necessidade de maior lesão nas CCE (Avan *et al.*, 1997).

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 dos resultados não se mostrarem significantes, foi possível constatar, em relação aos valores médios, vantagem da OD sobre a OE (Tabelas 9 e 11 e Figuras 20 e 22).

A maioria dos estudos revela maior nível de respostas das emissões otoacústicas quando são coletadas na OD (Gorga *et al.*, 1997; Keogh *et al.*, 2001; Engdahl, 2002; Keefe *et al.*, 2008). Possíveis explicações para os

achados de maior nível de emissões otoacústicas à OD podem ser decorrentes de diferenças entre as orelhas, associadas com a ligeira vantagem da sensibilidade aurál direita e a dominância do hemisfério esquerdo na percepção da fala e na função da linguagem. Outro fator que pode contribuir para a vantagem da OD é atividade eferente assimétrica entre as duas orelhas, privilegiando a detecção do sinal acústico na presença de ruído e a assimetria morfológica entre as regiões crânio-faciais direita e esquerda (Fávero *et al.*, 2005; Cone, 2009). Entretanto, estudos como os de Campos e Carvallo (2005); Gkoritsa *et al.* (2007); Pavlovcinová *et al.* (2010) não observaram diferenças significantes no nível de resposta das emissões otoacústicas em relação ao lado da orelha.

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-se os valores obtidos nas orelhas, e verificou-se resultado estatisticamente significativo em todas as frequências entre os grupos, com vantagem para o grupo controle (Tabelas 10 e 12 e Figuras 21 e 23). Apesar de ambos os grupos não apresentarem queixa auditiva e possuírem características audiológicas semelhantes, os indivíduos heterozigotos para a mutação do gene *GJB2* apresentaram maior dano no processo ativo das CCE.

A alteração nas CCE dos indivíduos heterozigotos para a mutação do gene *GJB2* ocorre no momento em que superfície apical dessas células projetam os estereocílios para abrir os canais de transdução e permitir um influxo de íons de K^+ da endolinfa para as células ciliadas que ficam

hiperpolarizadas, com alta concentração de K^+ intracelular. Para que nova excitação da célula seja possível, o K^+ tem que ser removido por meio das junções comunicantes do tipo *gap* (Friedman *et al.*, 2000 e Davis, 2003). Na mutação no gene *GJB2*, ocorre alterações nessas junções prejudicando a remoção do K^+ das células ciliadas e impede a excitação a novos estímulos sonoros, resultando em falta de funcionamento das células ciliadas e distúrbio do potencial elétrico endococlear, ou ainda na sobrevivência das células sensoriais do epitélio coclear (Kikuchi *et al.*, 2000 e Rabionet *et al.*, 2000).

No caso dos pais portadores em heterozigose da mutação no gene *GJB2* neste estudo, esse movimento de íons de K^+ das células ciliadas para as células de sustentação da cóclea retornando para a endolinfa possivelmente ocorre de maneira ineficiente, sugerindo mecanismos homeostáticos alternativos ou compensatórios que podem sobrecarregar a fisiologia coclear, com consequente efeito negativo sobre as CCE, refletindo em redução no nível de respostas das EOA-PD como observado no GE.

No presente estudo, as frequências ultra-altas apresentaram amplitude média de 3,13dB menor que as frequências convencionais no GE, enquanto que no GC, tal diferença foi de 5,34dB. Desta forma, as EOA-PD em frequências ultra-altas apresentaram nível de EOA-PD mais baixo que as frequências convencionais. Estes resultados corroboram os achados de Dunckley e Dreisbach (2004), os quais constataram que, conforme aumenta a frequência das EOA-PD, diminui o nível de resposta, sendo observado que

as frequências ultra-altas entre 10.000 a 16.000Hz ocorreram com amplitude 13,71dB menor que as frequências convencionais entre 1.000 a 8.000Hz.

No estudo de Dreisbach e Siegel (2005), a resposta na frequência de 16.000Hz foi consistentemente menor em todos os níveis de intensidades, quando comparada às demais frequências. Isto ocorreu segundo os autores porque a região de 16.000Hz é muito próxima ao final da base da cóclea, podendo indicar que a região mais basal da cóclea é menos linear, portanto tem menor amplificação para sons de baixo nível de intensidade. No geral, a intensidade do estímulo é similar para baixas e altas frequências, implicando que o processo biológico responsável por gerar as EOA-PD é o mesmo. Assim, o uso de EOA-PD eliciados com estímulos de frequências ultra-altas pode ter aplicação clínica importante por detectar alterações iniciais.

O menor nível de resposta das EOA-PD nas frequências ultra-altas era esperado neste estudo devido à organização tonotópica coclear, já que essas frequências encontram-se na base da cóclea e, por isto, sofrem maior vulnerabilidade de lesões iniciais (Abdala, 2001; Silva e Feitosa, 2006).

Outro fator que pode ter contribuído para a menor relação S/R das EOA-PD em frequências ultra-altas pode ser devido à dificuldade encontrada no presente estudo na calibração da sonda antes de iniciar o registro das emissões otoacústicas (Figura 15), devido ao curto comprimento de onda envolvida nas frequências altas e às complexas interações entre o comprimento de onda e as dimensões do MAE (Barret, 2007). Para Middlesworth (2012), no futuro, a solução para o problema de calibração será o registro das EOA-PD com dois microfones, sendo um microfone de

referência (algo como um microfone de medição da sonda tubo), inserido próximo da MT, para verdadeiramente calibrar o estímulo, e o outro microfone para captar as respostas das CCE.

Os estudos de Dunckley e Dreisbach (2004), Dreisbach e Siegel (2005), Dreisbach *et al.* (2006), Kei *et al.* (2007), Goodman *et al.* (2009), Keefe *et al.* (2011), realizados com EOA-PD utilizando estímulos de frequências ultra-altas, também demonstraram a preocupação com a calibração nesta faixa de frequência, e apontaram que a grande variabilidade de respostas que ocorre nas frequências ultra-altas pode ser influenciada pela calibração. Dreisbach *et al.* (2006) recomendaram que tal variabilidade pode ser minimizada por meio da exata calibração que é realizada com inserção do microfone no MAE 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 das EOA-PD em frequências ultra-altas, devido às ondas estacionárias nesta faixa de frequência, Dreisbach e Siegel (2005) 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 era uma fibra ótica para visualizar a posição da sonda em relação à membrana timpânica, que deveria ficar cerca de 10-15mm da mesma, isto para garantir o mesmo nível de pressão sonora durante a avaliação de todas as frequências.

Para Goodman *et al.* (2009) e Keefe *et al.* (2011), o principal problema encontrado para medir as emissões otoacústicas em frequências ultra-altas

é devido à limitação nos procedimentos de calibração. Por isto, os autores desenvolveram uma técnica denominada calibração de pressão-incidente, a qual evita os efeitos das ondas estacionárias em frequências altas, por meio de um tubo cilíndrico de 8mm de diâmetro inserido no fone de inserção, o qual funcionou como uma câmara anecóica.

Dreisbach *et al.* (2006) encontraram que as EOA-PD em frequências ultra-altas foram obtidas com menor amplitude, em comparação com as frequências graves, além de ocorrer maior variabilidade nas frequências acima de 8.000Hz para medições do nível das EOA-PD, sendo constatado uma diferença maior que 10dB nas frequências ultra-altas. Esta grande diferença de nível de EOA-PD foi devido à presença de artefatos, sendo o principal motivo a calibração da sonda. Os resultados permitiram aos autores concluir que, embora o nível das EOA-PD obtidas nas frequências acima de 8.000Hz tenha sido mais variável que em baixas frequências, houve boa reprodutibilidade entre as EOA-PD em frequências ultra-altas registradas nas intensidades de L1=70dBNPS e L2=55dBNPS, e aquelas registradas em L1=60dBNPS e L2=50dBNPS. A sugestão na finalização do estudo foi que os resultados encorajam a exploração das medidas de EOA-PD de frequência ultra-alta para ser usado como um teste objetivo para o monitoramento da ototoxicidade.

Neste estudo, a análise da correlação entre a ATL e as respostas de EOA-PD geradas na região de $2f_1$ - f_2 em frequências convencionais e em frequências ultra-altas revelou correlação negativa entre orelha e grupo, indicando que, conforme aumenta a relação S/R das EOA-PD, ocorre uma

diminuição nos resultados da ATL, ou melhora nos limiares auditivos, indicando que a ATL e as EOA-PD são linearmente dependentes ou relacionadas (Tabela 14). Tomiasi (2006) também encontrou correlação negativa entre a ATL e EOA-PD, e os resultados revelaram que, à medida que o limiar auditivo aumentou os níveis de respostas das EOA-PD foram diminuindo. Rosa *et al.* (2002) constataram uma diminuição das EOA-PD e aumento dos limiares auditivos em familiares de portadores de DA de origem genética, quando comparados à população normal. Apesar desses resultados, deve-se lembrar de que as EOA-PD não substituem o exame audiométrico tanto pela variabilidade, quanto pelas estruturas que são avaliadas. Para Gorga *et al.* (1997) e Campos e Carvallo (2011), as EOA-PD podem contribuir no aumento da precisão diagnóstica, prognóstica, e nas decisões clínicas relacionadas ao sistema auditivo, mas não podem estimar com precisão os limiares audiométricos.

A correlação de Pearson entre os resultados dos RA e as EOA-PD geradas na região de 2f1-f2 em frequências convencionais e frequências ultra-altas não demonstrou correlação significativa para ambos os grupos avaliados (Tabela 13). A primeira hipótese para que tal resultado tenha ocorrido é que foi realizada pesquisa do limiar do RA com resolução de 5dBNA, e não com intervalo crescente de 1dBNA, como registradas nas EOA-PD. A segunda hipótese ocorre pelo fato da maioria dos sujeitos apresentarem RA dentro da normalidade para ambos os grupos avaliados e, conseqüentemente, não terem influenciado no registro das EOA-PD.

Kei *et al.* (2007) informaram que as EOA-PD em frequências ultra-altas sofrem menor efeito da disfunção da OM quando comparadas às EOA-PD em frequências convencionais, porém, tal estudo foi realizado em crianças com diferentes achados na imitanciometria. Para Kei *et al.* (2007), mesmo em crianças com patologia na OM, é possível ter-se uma noção do funcionamento coclear nas frequências ultra-altas, porém, a avaliação deve ser realizada com cautela, porque, nestes casos, ocorre uma redução das EOA-PD, embora não tão severa como acontece nas frequências convencionais. Portanto, uma das vantagens da pesquisa das EOA-PD em frequências ultra-altas seria a menor interferência de alterações de OM, bem como menos influência de ruído de fundo, como ocorre em frequências convencionais.

No geral, análise dos resultados de ATL, RA e EOA-PD permitiram verificar que as EOA-PD, tanto para as frequências convencionais, quanto para as frequências ultra-altas, foram capazes de distinguir os indivíduos do GE e do GC, sugerindo que pais portadores do alelo normal e do alelo com mutação no gene *GJB2* podem apresentar dano no processo ativo das CCE, afetando a fisiologia coclear, antes da manifestação clínica por meio de alteração nos limiares da ATL e RA.

6.2 - Análise de correlação da idade e as EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas

As respostas cocleares são afetadas por algumas condições, dentre elas, merece destaque o fator idade. Por este motivo, o interesse nesta parte do estudo foi verificar qual a contribuição da faixa etária nos resultados evidenciados. A formação do GE composto por pais de portadores de DA por herança autossômica recessiva, limitou a idade entre 20 e 58, e, para evitar que a idade não influenciasse o registro das EOA-PD diferentemente, o GC foi então organizado na mesma faixa etária, sendo os grupos formados por participantes com intervalo de 38 anos, entre a menor e maior idade da casuística.

Considerando o extenso intervalo de tempo entre os participantes e que alterações na audição são consequências frequentes e natural com o passar dos anos, era esperado que houvesse relação entre as medidas de EOA-PD e a idade. Para Uchida *et al.* (2008) as EOA-PD são deterioradas com a idade, independente da sensibilidade auditiva, e por isto, as EOA-PD são consideradas aptas a detectar indícios de danos cocleares causados pela idade.

Assim como nos estudos de Vento *et al.* (2004), Calais *et al.* (2007) e Lopes *et al.* (2007), 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 CCE, observadas ao longo da vida, e deterioração das

CCE com o passar dos anos, ocorrendo aumento sistemático nos limiares de audibilidade em função do aumento da frequência.

A idade dos sujeitos do GE com maior alteração nas emissões otoacústicas variou de 38 anos 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 alterações nas emissões otoacústicas nos sujeitos que estavam na faixa etária entre 55 a 57 anos, provavelmente em decorrência da deterioração 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 (Menezes *et al.*, 2002).

Desta forma, ambos os grupos teriam as mesmas chances de manifestarem 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 qual causa a DA na herança autossômica recessiva.

Para a população em geral, a deterioração da audição nas frequências ultra-altas já começa na infância, sendo acompanhada por uma diminuição nas respostas das EOA-T e EOA-PD, bem como ausência das emissões otoacústicas espontâneas (Groh *et al.*, 2006). Assim, a avaliação das frequências ultra-altas pode ajudar a detectar a DA de forma precoce, a qual não pode ser revelada por meio da avaliação audiológica convencional.

A perda de sensibilidade auditiva na faixa de frequência de 15-18.000Hz começa em torno de 20 anos de idade, e tem sido demonstrado por muitos autores, como Schechter *et al.*, 1986; Stelmachowicz *et al.*, 1989; Trehub *et al.*, 1989; Reuter *et al.*, 1998. 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 (Brizzee *et al.*, 1980; Trehub *et al.*, 1989; Schuknecht e Gacek, 1993; Mazelova *et al.*, 2003).

Os diagramas de dispersão que correlacionam a idade e o comportamento das EOA-PD em frequências convencionais, em ambos os grupos, revelaram uma tendência na nuvem de pontos do GC em algumas frequências na OD (Figura 24) e em algumas frequências na OE do GE (Figura 25). O coeficiente de correlação de Pearson em cada grupo e orelha comprovou correlação negativa significativa no GC, nas frequências de 1.969, 2.672 e 4.031Hz da OD, e correlação negativa significativa nas frequências de 1.359 e 2.672Hz na OE do GE (Tabela 15). Para as EOA-PD em frequências ultra-altas, não foram observadas tendências nas nuvens de pontos (Figuras 26 e 27) e o coeficiente de Pearson não demonstrou correlação negativa significativa em ambos os grupos (Tabela 16). Desta maneira, houve maior correlação nas EOA-PD em frequências convencionais que nas frequências ultra-altas.

Diante do número reduzido de estudos envolvendo a percepção sonora em frequências ultra-altas associado a não correlação entre idade e as EOA-PD nesta faixa de frequência, sugere-se que estudos posteriores

com casuísticas maiores seriam válidos para inferir mais precisamente sobre a influência da idade no registro das EOA-PD, já que era esperada correlação significativa nas frequências ultra-altas.

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, sobretudo à 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. Engel-Yeger *et al.* (2003) acrescentaram que poucos estudos procuraram determinar o quadro clínico da DA de herança autossômica recessiva, porque apenas um número pequeno de famílias/sujeitos são examinados.

Além disso, existiu no presente estudo, o problema na obtenção da amostra para ser submetida à avaliação audiológica. Em relação à dificuldade na obtenção da amostra, destacam-se altos índices de resistência dos pacientes em realizar a avaliação audiológica, principalmente por estes indivíduos serem comumente assediados a participar de pesquisas envolvendo a DA, além de alegarem que os exames não reverteriam a DA, 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, devido ao 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, sinônimo de exame de DNA para os leigos (ou compreendido como comprovante de paternidade), muitas mães, conhecedoras de tal fato, negam-se a realizar tais exames, temendo que possam levar a uma suspeita de paternidade.

6.3 - Análise das EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas por meio de intervalos de referência e análise discriminante nos grupos estudo e controle

Nesta parte, foram utilizados os testes de intervalos de referência e análise discriminante, na tentativa de determinar qual tipo de estímulo nas EOA-PD, as frequências convencionais ou as frequências ultra-altas, distinguem melhor os indivíduos do GE e GC. Caso os pais de deficientes auditivos por herança autossômica recessiva tenham maior comprometimento na base da cóclea, as EOA-PD com frequências ultra-altas poderiam apresentar um padrão próprio nestes indivíduos. Entretanto, por tratar-se de recurso apenas recentemente disponibilizado, ainda há poucos estudos que avaliem as frequências de 9.000 a 16.000Hz, tanto em EOA-PD, como 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. Para Goodman *et al.* (2009), o primeiro

empecilho é que a maioria dos sons de fala está presente em frequências até 8.000Hz, 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. Outra razão é que a disponibilidade de equipamentos no mercado de EOA-PD em frequências ultra-altas é recente, além de haver até o momento, uma ausência de padronização em relação à normalidade do nível de resposta para as EOA-PD na faixa de 9.000 a 16.000Hz.

Quando há disponibilidade de equipamentos de EOA-PD em frequência ultra-alta, ocorre dificuldade na calibração correta dos transdutores com segurança. Por isto, Middlesworth (2012) informou que existem poucos estudos confiáveis envolvendo as EOA-PD em frequências ultra-altas, porque a calibração nesta faixa de frequência é árdua, o que faz com que os pesquisadores abandonem os estudos mesmo antes de completá-los.

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 aplicabilidade das mesmas, como nos casos de monitoramento de pacientes com presença ou suspeita de patologias relacionadas à audição como ototoxicidade, sequelas de otite média, presbiacusia, exposição ao ruído e em portadores de insuficiência renal (Zeigelboim *et al.*, 1996; Pialarissi e

Gattaz, 1997; Vallejo *et al.*, 2001; Carvallo, 2002; Garcia *et al.*, 2003; Klagenberg *et al.*, 2011).

Shaw *et al.* (1996) e Vallejo *et al.* (2001) 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 que são 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.

A fim de investigar se havia diferença entre as EOA-PD com frequências convencionais e frequências ultra-altas, foi utilizado o intervalo de referência de 90% para verificar o quanto a média podia variar em uma determinada probabilidade de confiança (Tabela 17). Ao comparar o intervalo de referência entre as frequências convencionais e as frequências ultra-altas nas Figuras 28 a 31, notou-se que a amplitude máxima das EOA-PD em frequências ultra-altas foi menor que as EOA-PD em frequências convencionais.

No GC, o intervalo de referência das EOA-PD demonstrou maior variabilidade, tanto para as frequências convencionais, quanto para as frequências ultra-altas, pois grande parte dos sujeitos neste grupo apresentava audição normal, contudo, outros indivíduos possuíam alteração na audição (Figura 29 e 31). Já no GE, o intervalo de referência

das EOA-PD não revelou grande variabilidade em comparação ao GC (Figuras 28 e 30). Embora a maioria dos sujeitos do GC não tenha apresentado alteração auditiva, houve maior variabilidade em relação ao GE, o qual se apresentou mais homogêneo.

Ao confrontar os valores médios de EOA-PD em frequências convencionais e frequências ultra-altas, nos diagramas de dispersão das Figuras 32 e 33, notou-se que vários indivíduos do GE estão abaixo do limite inferior de referência estimado no GC. Porém, nas frequências ultra-altas, existem menos sujeitos abaixo do limite inferior de referência, e alguns sujeitos acima do limite superior de referência. Isto sugere que a faixa de frequência ultra-alta foi menos precisa em identificar os indivíduos do GE, em relação às frequências convencionais.

Pelo menos dois fatores podem ter contribuído para o menor desempenho das EOA-PD em frequências ultra-altas, tais como limitação nos padrões de calibração e função das CCE, sendo que, nesta faixa de frequência, parece ser mais vulnerável a discretas alterações auditivas.

Deve-se lembrar que o pior desempenho das EOA-DP em frequências ultra-altas ocorreu no GE, sugerindo maior comprometimento na base da cóclea. O fato dos 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 (Lefevbre e Van de Water, 2000; Shibata *et al.*, 2001).

Silva *et al.* (2010), em um estudo para avaliar o perfil audiológico de pais de sujeitos com DA de herança autossômica recessiva, não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os limiares da ATL em frequências convencionais e altas frequências, nem das EOA-PD em frequências convencionais, mas foi observado que há uma tendência de pais de indivíduos com DA de herança autossômica recessiva apresentarem piores resultados nos testes audiológicos, verificada já nos limiares de 250 a 8000Hz da audiometria convencional.

Na tentativa de buscar pistas para descobrir diferenças entre os dois grupos e fazer generalizações para um novo indivíduo dentro do GC ou GE, a etapa seguinte no estudo foi a construção das regras de classificação a partir da análise discriminante, tendo sido consideradas as frequências convencionais de 1.969Hz e 5.297Hz e as frequências ultra-altas de 8.203Hz e 10.641Hz. Por meio dos diagramas de dispersão apresentados nas Figuras 34 e 35, percebeu-se que houve maior separação entre os grupos nas frequências convencionais, quando comparados com as frequências ultra-altas. Portanto, as EOA-PD em frequências convencionais identificaram melhor os sujeitos do GE.

A regra de classificação da análise discriminante identificou corretamente 70% dos indivíduos do GE e 64,3% dos indivíduos do GC para as EOA-PD em frequências convencionais (Tabela 18). Já a regra identificou corretamente 71,4% dos indivíduos do GE e 64,3% dos indivíduos do GC

para as EOA-PD em frequências ultra-altas (Tabela 19). Notou-se que a porcentagem de classificação correta no GC é menor, possivelmente porque, neste grupo, houve maior variabilidade entre os indivíduos, como pode ser observado no diagrama de dispersão das Figuras 30 e 31. Embora a regra seja útil, um fator de dificuldade para a diferenciação entre grupos com base nesta regra de classificação das EOA-PD é o fato de ambos os grupos apresentarem perfis audiológicos semelhantes, contendo indivíduos com e sem alteração auditiva, decorrente do efeito idade no grupo controle pareado. Mesmo assim, a regra conseguiu identificar corretamente elevada proporção dos indivíduos do grupo estudo (Tabelas 18 e 19).

Keefe *et al.* (2011) também utilizaram regras de classificação para separar indivíduos com e sem alteração auditiva, visando aumentar a confiabilidade dos resultados com emissões otoacústicas em frequências ultra-altas, e os resultados demonstram sensibilidade e especificidade constante entre as frequências de 1.000 e 10.000Hz, sendo que as frequências ultra-altas identificaram corretamente 84% das orelhas com audição normal e 84% das orelhas comprometidas. Desta forma, as emissões otoacústicas em frequências ultra-altas demonstraram capacidade clínica para prever DA, pelo menos até 10.000Hz, e passa a ser um procedimento importante na bateria de avaliação audiológica, fornecendo informações adicionais sobre as limitações sensoriais que podem acometer a função coclear.

De maneira geral, as EOA-PD obtiveram desempenho semelhante para classificar um novo indivíduo dentro do GE, sendo que a porcentagem

foi ligeiramente maior para as frequências ultra-altas. Desta forma, as EOA-PD em frequências ultra-altas podem ser úteis para individualizar protocolos, especialmente para indivíduos que necessitam de monitoramento até a região capaz de gerar respostas em frequências mais altas, e a utilização desse método diagnóstico pode alertar para lesões cocleares, fazendo com que se possam prevenir futuras alterações auditivas (Dunckley e Dreisbach, 2004).

Para Goodman *et al.* (2009), embora os resultados com as EOA-PD em frequências ultra-altas sejam promissores, mais estudos são necessários em sujeitos com ampla variação de limiares auditivos, incluindo diferentes graus de DA. E se tais pesquisas demonstrarem a detecção precoce de alteração em frequências ultra-altas, este será mais um recurso diagnóstico útil para monitorar as frequências altas em pacientes que são de risco para desenvolverem DA, como os pacientes que recebem medicação ototóxica, mesmo porque, quanto maiores forem as informações obtidas a respeito do sistema auditivo e de sua ampla gama de frequência, maior será a compreensão deste, sendo maiores as chances de chegarmos a um prognóstico mais preciso sobre as lesões auditivas.

De forma resumida, as EOA-PD em frequências convencionais foram capazes de mensurar com maior precisão os sujeitos do GE do que as ultra-altas frequências. Entretanto, ambas as faixas de frequências conseguiram identificar alterações na função auditiva, sugerindo que, nos indivíduos do GE, mesmo sendo heterozigotos para a mutação do gene *GJB2*, pode haver

dano no processo ativo das CCE antes da manifestação clínica por meio dos resultados alterados na avaliação audiológica convencional.

O presente estudo demonstrou a importância de avaliar a função coclear por meio de EOA-PD em frequências convencionais e em frequências ultra-altas, porém, ainda ficou incerta uma possível justificativa do que leva os indivíduos heterozigotos a apresentarem alteração apenas nas EOA-PD, sem mesmo apresentarem queixa auditiva. Um estudo longitudinal que monitorasse a audição destes sujeitos iria esclarecer algumas questões como: será que tais indivíduos teriam maior predisposição a apresentar DA precocemente, ou será que as EOA-PD alteradas constituem indicador que diferencie os indivíduos heterozigotos para a mutação do gene *GJB2*? Tais reflexões reforçam a necessidade de mais estudos sobre as medidas de EOA-DP em frequências ultra-altas em um grupo maior de sujeitos com características distintas, como gênero, faixa etária e diferentes graus de DA.

Para verificar se seria possível identificar uma diminuição nas respostas da função coclear dos pais portadores em heterozigotos da mutação do gene *GJB2*, o presente estudo adotou uma metodologia eletroacústica que foi 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.

Conclusões

7 - CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos nesse estudo, pode-se concluir que:

- Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados da audiometria tonal e reflexos acústicos dos pais de indivíduos com deficiência auditiva de herança autossômica recessiva, quando comparados aos do grupo controle sem queixa de deficiência auditiva.
- Os estímulos de frequências ultra-altas apresentaram menor nível de respostas das EOA-PD em relação às frequências convencionais, sugerindo que a função coclear nesta faixa de frequência possa ser mais vulnerável à mutação em heterozigose do alelo recessivo que causa deficiência auditiva.
- Houve correlação entre os limiares da audiometria tonal e as respostas de EOA-PD, indicando que, conforme aumenta o nível de resposta das EOA-PD, ocorre uma melhora nos limiares auditivos.
- Não houve correlação significativa entre os resultados, os limiares dos RA e as EOA-PD em frequências convencionais e em frequências ultra-altas para ambos os grupos avaliados.
- Houve correlação entre a idade e o comportamento das EOA-PD em frequências convencionais, indicando correlação negativa significativa em algumas frequências. Entretanto, esta correlação não se repetiu nas frequências ultra-altas.
- As EOA-PD, tanto para as frequências convencionais, quanto para as 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.

Anexos

8 - ANEXOS

ANEXO A - Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **15.09.10**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **170/10** intitulado: "Função coclear em altas frequências na deficiência auditiva de herança autossômica recessiva." e seus anexos, apresentado pelo Departamento de **Fisioterapia, Fonoaudiologia e Terapia Ocupacional**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa.

Pesquisador (a) Responsável: Renata Mota Mamede Carvallo
Pesquisador (a) Executante: Jaqueline Medeiros de Mello

CEP-FMUSP, 15 de setembro de 2010.

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B - Aprovação da mudança do título da tese pelo Comitê de Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 20.06.12, **APROVOU A MUDANÇA DE TÍTULO** do Protocolo de Pesquisa nº 170/10 intitulado: **"Função coclear em altas frequências na deficiência auditiva de herança autossômica recessiva"** para **"Função coclear em frequência ultra-altas em pais de indivíduos com deficiência auditiva autossômica recessiva"** e seus anexos, apresentado pelo Departamento de Fisioterapia, Fonoaudiologia e Terapia Ocupacional.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa.

Pesquisador (a) Responsável: Renata Mota Mamede Carvalho

Pesquisador (a) Executante: Jaqueline Medeiros de Mello

CEP-FMUSP, 20 de junho de 2012.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO C - Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética da Faculdade Ingá-Uningá.

COMITÊ PERMANENTE DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS - REGISTRADO NA CONEP EM 20/12/2006

CAAE Nº 0164.0.362.015 – 09

PARECER Nº 0164/09

Pesquisador(a) Responsável: Ms. Jaqueline Medeiros de Mello

Curso de graduação/Curso pós-graduação/Empresa: Curso de Fonoaudiologia - UNINGÁ

Título do Projeto: Função coclear em altas frequências na deficiência auditiva de herança autossômica recessiva.

Considerações:

A pesquisa tem como objetivo verificar a amplitude de emissões otoacústicas evocadas produto de distorção (EOA-DP) em altas frequências em pais de sujeitos com deficiência auditiva de herança autossômica recessiva. Participarão da pesquisa 45 indivíduos os quais serão divididos em três grupos: 15 indivíduos portadores de deficiência auditiva, 15 pais ouvintes e 15 não portadores de deficiência auditiva. Estes passarão por questionário para obter informações relativas a audição, visualização do meato acústico externo, audiometria tonal, imitanciométrica e avaliação genética. Para a análise será utilizado a estatística inferencial para comparação e descritiva.

Após a análise, o comitê verificou que o projeto está aprovado.

Situação:

PENDENTE () APROVADO (X)

() para registro SISNEP () para análise e parecer CONEP Data: / /

O pesquisador(a) deverá apresentar:

(x) Relatório(s) semestral (ais)

() Relatório final para este comitê em Julho/2010.

O protocolo foi aprovado de acordo com a resolução nº 196/96 e complementares do CNS/MS, na 003ª reunião do CEP-INGÁ em 12/03/2010.

Maria do Rosário Martins
Profª. Ms. Maria do Rosário Martins
Coordenadora CEP- INGÁ

ANEXO D - Caracterização da audição dos deficientes auditivos cujos pais foram incluídos no estudo referente aos dados da audiometria tonal liminar, logaudiometria, reflexos acústicos e EOA-PD em frequências convencionais e em frequências ultra-altas.

Comparação das médias entre as orelhas com relação aos resultados obtidos na audiometria tonal liminar no grupo de deficientes auditivos

AUDIOMETRIA TONAL LIMINAR		MÉDIA (dB)	DESVIO PADRÃO	N	P-VALOR
250Hz	OD	85,7	15,4	14	0,999
	OE	85,7	16,3		
500Hz	OD	91,4	17,7	14	0,787
	OE	89,6	17,3		
1.000Hz	OD	94,3	18,8	14	0,660
	OE	91,5	14,2		
2.000Hz	OD	100,0	20,3	14	0,738
	OE	97,5	18,9		
3.000Hz	OD	103,6	20,6	14	0,548
	OE	98,9	20,3		
4.000Hz	OD	103,6	23,2	14	0,584
	OE	98,9	21,7		
6.000Hz	OD	103,9	19,5	14	0,999
	OE	103,9	20,9		
8.000Hz	OD	105,0	19,4	14	0,957
	OE	105,4	19,9		

Legenda: N - número de orelhas; P-valor* - resultado estatisticamente significativo.

Comparação das médias entre as orelhas com relação aos resultados obtidos na logaudiometria no grupo de deficientes auditivos

LOGOAUDIOMETRIA		OD		OE	
		N	MÉDIA	N	MÉDIA
LRF	PRES	6	91dB	5	90dB
	AUS	8	---	9	---
SDT	PRES	5	86dB	5	92dB
	AUS	1	---	2	---
	NR	2	---	2	---

Legenda: N - número de orelhas; PRES - resposta presente; AUS - resposta ausente; NR - não realizado.

Resultados dos reflexos acústicos contralaterais e ipsilaterais bilateral

FREQUÊNCIAS		CONTRA		IPSI	
		AUS	PRES	AUS	PRES
500Hz	OD	7	112dB	NR	NR
	OE	7	115dB	NR	NR
1.000Hz	OD	7	115dB	8	110dB
	OE	7	113dB	8	110dB
2.000Hz	OD	7	113dB	8	110dB
	OE	7	114dB	8	110dB
4.000Hz	OD	8	115dB	NR	NR
	OE	8	116dB	NR	NR

Legenda: AUS - RA ausente; PRES - RA presente; NR - não realizado

Comparação entre as orelhas dos resultados obtidos nas EOA-PD (dBNPS)
em frequências convencionais e ultra-altas no grupo de deficientes auditivos

FREQUÊNCIAS		MÉDIA	DESVIO PADRÃO	N	P-VALOR
703Hz	OD	-1,44	2,10	14	0,745
	OE	-1,73	3,12		
1.031Hz	OD	-1,47	2,02	14	0,364
	OE	-0,81	2,28		
1.359Hz	OD	-1,62	1,90	14	0,076
	OE	-2,18	2,01		
1.969Hz	OD	-0,62	1,18	14	0,319
	OE	-1,04	1,31		
2.672Hz	OD	-0,65	1,03	14	0,741
	OE	-0,54	0,95		
4.031Hz	OD	-0,91	0,74	14	0,419
	OE	-1,09	0,57		
5.297Hz	OD	-0,93	1,26	14	0,869
	OE	-0,99	0,88		
5.813Hz	OD	-2,37	2,34	14	0,079
	OE	-3,73	2,17		
6.328Hz	OD	-2,83	1,72	14	0,851
	OE	-2,95	2,09		
7.547Hz	OD	-3,41	2,29	14	0,138
	OE	-2,51	1,04		
8.203Hz	OD	-2,59	2,79	14	0,110
	OE	-1,39	1,36		
8.953Hz	OD	-2,12	1,26	14	0,360
	OE	-2,60	1,80		
9.797Hz	OD	-1,72	1,17	14	0,447
	OE	-2,07	1,54		
10.641Hz	OD	-1,06	1,19	14	0,007
	OE	-2,32	1,43		

Legenda: N - número de orelhas; P-valor* - resultado estatisticamente significativo.

Anexo E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL

1. NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO.:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD
 (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

3. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Função coclear em altas frequências na deficiência auditiva de herança recessiva
 PESQUISADOR : Dra. Renata Mota Mamede Carvallo.
 CARGO/FUNÇÃO: Docente FMUSP
 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 4027
 UNIDADE DO HCFMUSP: Faculdade de Medicina.

4. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

5. DURAÇÃO DA PESQUISA: 32 meses.

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA

Essas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária no estudo intitulado “**Função coclear em altas frequências na deficiência auditiva de herança recessiva**” que tem o objetivo de investigar a audição dos pais de indivíduos com deficiência auditiva de origem genética.

Para tanto, serão convidados a participar deste estudo, pais e mães de famílias com pelo menos um filho com deficiência auditiva e, outros pais e mães de famílias sem deficiência auditiva entre seus filhos, para efeito de comparação da audição entre eles.

Caso o estudo de sua família (genealógico) indique que seu filho possui uma deficiência auditiva de origem genética, o Sr (a Sra.) será incluído(a) no grupo pesquisa. Se não houver deficiência auditiva em sua família, o Sr (a Sra.) será incluído(a) no grupo controle.

Para analisar a sua audição, vamos realizar uma entrevista inicial, com o objetivo de obter informações relativas a audição e a seguir testes auditivos para verificar a forma que o Sr (a Sra.) responde para sons de diferentes níveis de intensidade. Para isso vamos testar sua audição para sons graves e agudos (que variam de 250 a 8000 Hz). O Sr (a Sra.) vai ouvir estes sons por meio de fones e terá que levantar as mãos sempre que ouvi-los. Eles parecem apitos curtos que ficam cada vez mais “baixinhos”, por isso o Sr (a Sra.) tem que prestar atenção para ouvi-los. Vamos ainda ver as respostas da sua orelha interna a sons de diversas frequências. Estas respostas são internas, chamadas de emissões otoacústicas e, para estes sons, você não precisa levantar as mãos, porque o aparelho mede as respostas sozinho. Os sons que o Sr (a Sra.) vai ouvir não são em volume alto; eles não incomodam. O único desconforto da avaliação é que ela demora mais ou menos 45 minutos.

Toda a avaliação audiológica terá duração de aproximadamente 90 a 120 minutos, sem contra-indicação (risco), sem provocar dor ou incômodo. Desta forma, não são esperados riscos ou desconfortos nos procedimentos que serão aplicados.

Não há benefício direto para o participante desta pesquisa. Trata-se de estudo testando a hipótese de que pais de portadores de DA de herança autossômica recessiva possam apresentar deficiências auditivas precoces, Essa informação poderá ser importante para outros filhos e outros membros da família. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Profa. Dra. Renata Mota Mamede Carvalho que pode ser encontrada no endereço R. Cipotânea, 51 – Cidade Universitária – São Paulo. Telefone(s) (11) 3091-7455. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

É direito do participante da pesquisa ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Função coclear em altas frequências na deficiência auditiva de herança recessiva**”. Eu discuti com a Dra Renata Mota Mamede Carvalho sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a acompanhamento fonoaudiológico caso necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante
legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

ANEXO F - Protocolo para investigação de mutações 35delT e 167delT no gene da conexina 26 (*GJB2*)

Mutação 35 delG

O teste da mutação 35delG no gene da conexina 26 (*GJB2*) consiste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de digestão do produto com a enzima de restrição *Mva* I (Fermentas) ou o isoesquisômero *Bst*N I (New England BioLabs) (Wilcox et al., 2000). PCR Utiliza-se de 100 ng a 200 ng de DNA total; 0,2 μ M de cada “primer” (“mismatch” 5’GCT GGT GGA GTG TTT GTT CACA CCCGC3’ e “35 Δ -C” 5’ TC TTTT CCA GAG C AAA CGGC3’); 1 U de Taq polimerase (Invitrogen); 1,5 mM $MgCl_2$; 20 mM TRIS pH = 8,4 e 50 mM KCl, 0,2 mM de cada dNTPs (Invitrogen). O produto da PCR apresentará 87pb. Realizar a digestão do produto em estufa a 37°C. Submeter o produto digerido a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% a 100V por 1h30min no Vertical Gel *Eletroforesis Apparatus*, modelo V16-2 (GibcoBRL) e corado por impregnação com $AgNO_3$ para visualização do resultado. Resultando no: (1) Homozigoto normal (1 banda de 69 pb); (2) Homozigoto para 35delG (1 banda de 87 pb) e (3) Heterozigoto (2 bandas, uma de 69 pb e uma de 87 pb).

Mutação 167 delT

Para a detecção da mutação 167delT são utilizados os primers 1F e 3R (os mesmos utilizados sequenciamento do gene *GJB2* que amplificam o fragmento de 425 pb que contém a mutação 167delT). Esse fragmento será digerido com a enzima *Pst*I (Zelante et al., 1997). A digestão com essa enzima, origina quatro fragmentos de restrição (150pb, 138pb, 69pb e 68pb) em indivíduos que não apresentam a mutação e três fragmentos (219pb, 138pb e 68pb) para aqueles que apresentam a mutação, uma vez que essa deleção faz com que se perca um sítio de restrição para essa enzima. Heterozigotos para esta deleção irão apresentar os fragmentos de 219pb, 150pb, 138pb, 69pb e 68pb. PCR utiliza-se 100ng de DNA total: 0.6 μ M dos primers 1F – 5’ GTG TTG TGT GCA TTC GTC TTT TC- 3’ e 3R – 5’ ACC TTC TGG GTT TTG ATC TCC TC 3’, 1U de Taq polimerase, 1.5mM de $MgCl_2$, 20mM TRIS pH = 8.4, 50mM KCl e 0.24mM dNTPs. Após a PCR, verificar se os produtos foram amplificados por meio de gel de agarose 2%. O produto amplificado apresentará 425pb. A Digestão com a enzima de restrição *Pst*I (Invitrogen nº 15215-015 – 10U/ μ L). Além do padrão, é importante aplicar um controle digerido (amostra com padrão de bandas já conhecido - de preferência o mutante).

Referências

9 - REFERÊNCIAS

Abdala C. Maturation of the human cochlear amplifier: Distortion product otoacoustic emission suppression tuning curves recorded at low and high primary tone levels. *J Acoust Soc Am.* 2001; 110: 1465-76.

Abissamra RGC. Latência das emissões otoacústicas da orelha normal de portadores de perda auditiva sensorial unilateral [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2001.

Alves FRA, Ribeiro FAQ. Roteiro diagnóstico e de conduta frente à perda auditiva sensorioneural genética. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007; 73 (3): 412-17.

Arnold DJ, Lonsbury-Martin BL, Martin GK. High frequency hearing influences lower frequency distortion - product otoacoustic emissions. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999; 125: 215-22.

Avan P, Elbez M, Bonfils P. Click-evoked otoacoustic emissions and the influence of high-frequency hearing losses in humans. *J Acoust Soc Am.* 1997; 101 (5): 2771-77.

Azevedo MF. Triagem auditiva neonatal. In: Ferreira LP, Befi-Lopes DM, Limongi SCO. Tratado de Fonoaudiologia. São Paulo: Roca, 2004. 604-16.

Ballana E, Ventayol M, Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Connexins and deafness Homepage. 2011. Disponível em <<http://www.crg.es/deafness>> Acesso em 03 de março de 2011.

Barret AR. The contribution of ultra-high frequency hearing on distortion product otoacoustic emission amplitudes [dissertation] Harrisonburg: James Madison University, 2007.

Bassetto MCA, Chiari BM, Azevedo MF. Emissões otoacústicas evocadas transientes: amplitude das respostas em recém nascidos a termo e pré-termo. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2003;69 (1): 84-92.

Bento RF, Miniti A, Marone SAM. Tratado de otologia. São Paulo: Edusp, 1998.

Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br Med Bull.* 2002; 63: 73-94.

Bohne BA, Clark WW. Growth of hearing loss and cochlear lesion with increasing duration of noise exposure. In: Hamernick R, Henderson D, Salvi R. New perspectives on noise-induced hearing loss. New York: Raven Press (1982). 283-301.

Boothroyd A. The sense of hearing. In: Boothroyd A. Speech acoustics and perception. Texas: Pro-ed; 1986. 65-73.

Boyd JC, Harris EK. Statistical bases of reference values in laboratory medicine. New York: Marcel Dekker, 1995.

Brizzee KR, Ordj JM, Bartus RT. Localization of cellular changes within multimodal sensory regions in aged monkey brain: possible implications for age-related cognitive loss. *Neurobiol.* 1980; 1: 45-52.

Brobby GW, Muller-Myshok B, Hortsman RD. Connexin 26 mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *NEJM*. 1998; 338: 548-50.

Calais LL, Borges ACL, Baraldi GS, Almeida LC. Efeitos do envelhecimento na função coclear. *Distur Comum*. 2007; 19 (3): 365-73.

Campbell DA, McHale DP, Brown KA, Moynihan LM, Houseman M, Karbani G, Parry G, Janjua AH, Newton V, Al-Gazali L, Markham AF, Lench NJ, Mueller RF. A new locus for non-syndromal, autosomal recessive, sensorineural hearing loss (DFNB16) maps to human chromosome 15q21-q22. *J Med Genet*. 1997; 34 (12): 1015-1017.

Campos UP, Carvalho RMM. Correlação entre os limiares das curvas de crescimento das EOAPD e tons puros. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2011; 77 (6): 754-60.

Carnicelli MVF. O uso das emissões otoacústicas no diagnóstico e prevenção da perda auditiva induzida pelo ruído. In: Nudelman AA, Costa EA, Seligman J, Ibañez RN. *Perda auditiva induzida por ruído*. Porto Alegre: Bagagem Comunicação, 1997. 237-45.

Carvalho M. Limiares de alta frequência e emissões otoacústicas em portadores de desordem pigmentar do tipo vitiligo. [dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

Carvallo RMM, Ravagnani MP, Sanches SGG. Influência dos padrões timpanométricos na captação de emissões otoacústicas. *Acta Awho*, 2000; 19: 18-25.

Carvallo RMM. *Audição em altas frequências: repercussões no reconhecimento de fala no ruído e nas emissões otoacústicas*. [tese livre docência] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Carvallo RMM, Koga MC, Carvalho M, Ishida IM. Limiares auditivos para altas frequências em adultos sem queixa auditiva. *Acta Otolaryngol*. 2003; 21 (1): 62-66.

Carvallo RMM, Koga MC, Carvalho M, Ishida, IM. Limiares auditivos para altas frequências em adultos sem queixa auditiva. *Acta Orl*. 2007; 25 (1): 62-6.

Chapchap MJ, Segre CM. Universal newborn hearing screening and transient evoked emission: new concepts in Brazil. *Scand Audiol Suppl*. 2001; 23: 33-6.

Claros P, Antich J, Claros Jr A, Demenech AC. Consejo genético a los sordos profundos. *Acta Otorrinolaringol*. 1996; 47:169-74.

Cohen MMJ, Gorlin RJ. Epidemiology, etiology and genetic patterns. In: Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen Junior MM. Hereditary hearing loss and its syndromes. Oxford: Oxford University Press: 1995. 9-21.

Cohn ES, Kelley PM, Fowler TS, Gorga MP, Lefkowitz DM, Kuehn HJ, Schaefer GB, Gobar LS, Hahn FJ, Harris DJ, Kimberling WJ. Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (*GJB2/DFNB1*). *J Pediatrics*. 1999;103:546-550.

Cordeiro-Silva MF, Barbosa A, Santiago M, Provetti M, Bortolini ER. 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.

Davis RL. Gradients of neurotrophins, ion channels, and tuning in the cochlea. *Neuroscientist*. 2003; 9: 311-6.

Denoyelle F, Marlin S, Weil D, Moatti L, Chauvin P, Garabedian PT, Petit C. 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.

Dreisbach LE, Siegel JH. Level dependence of distortion product otoacoustic emissions measured at high frequencies in humans. *J Acoust Soc Am*. 2005; 117, 2980-88.

Dreisbach LE, Long KM, Lees SE. Repeatability of high-frequency distortion-product otoacoustic emissions in normal hearing adults. *Ear Hear*. 2006; 27: 466-79.

Dunckley KT, Dreisbach LE. Gender Effects on High Frequency Distortion Product Otoacoustic Emissions in Humans. *Ear Hearing*. 2004; 25: 554-64.

Eckley CA, Duprat A, Lopes Filho O. Revisão: emissões otoacústicas. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 1993; 59 (1): 41-45.

Engdahl B. Otoacoustic emissions in the general adult population of Nord-Trøndelag, Norway. Distributions by age, gender, and ear side. *Int J Audiol.* 2002; 41 (1): 64-77.

Engel-Yeger B, Zaaroura S, Zlotogora J, Shalev S, Hujeirat Y, Carrasquillo M, Barges S, Pratt H. 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, Saleh B, Pratt H. Otoacoustic emissions and brainstem evoked potentials in compound carriers of connexin 26 mutations. *Hear Res.* 2003; 175:140-51.

Fausti SA, Erickson DA, Frey RH, Rappaport BZ, Schechter MA. The effects of noise upon human hearing sensitivity from 8000 to 20.000 Hz. *J Acoust Soc Am.* 1981; 69: 1343-47.

Fausti SA, Larson VD, Nofsinger D, Wilson RH, Phillips DS, Fowler CG. High frequency audiometric monitoring strategies for early detection o ototoxicity. *Ear Hear.* 1994; 15: 232-40.

Feghali JG, Bernstein RS. A new approach to serial monitoring of ultra-high frequency hearing. *Laryngoscope.* 1991; 101 (8): 825-29.

Foiadelli F. Audição em altas frequências em familiares de portadores de deficiência auditiva [monografia] São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2001.

Frank T, Dreisbach LE. Repeatability of high-frequency thresholds. *Ear Hearing*. 1991; 12: 294-5.

Franzé A, Caravelli A, Leva F, Marciano E, Auletta G, D'Aulos F. Audiometric evaluation of carriers of the connexin 26 mutation 35delG. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2005; 262 (11): 921-24.

Friedman T, Battey J, Kachar B, Sheikh R, Noben-Trauth K, Griffith A, Wilcox E. Modifier genes of hereditary hearing loss. *Curr Opin Neurobiol*. 2000; 10 (4): 487-93.

Frota S, Lório MCM. Emissões otoacústicas por produto de distorção e a audiometria tonal limiar: estudo da mudança temporária de limiar. *Rev. Bras. Otorrinolaringol*. 2002; 68 (1): 15-20.

Garcia AP, Lório MCM, Petrilli AS. Monitoramento da audição de pacientes expostos à cisplatina. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003; 69 (2): 215-21.

Gasparini P, Estivill X, Volpini V. Linkage of DFNB1 to non-syndromic neurosensory autosomal-recessive deafness in Mediterranean families. *Eur J. Hum Genet*. 1997; 5 (2): 83-8.

Gates GA, Chakeres DW. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation - Interpretation of diagnostic tests for acoustic neuroma. Washington: American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation, 1988.

Gates GA, Couropmitree NN, Myers, RH. Genetic associations in age-related hearing thresholds. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1999; 125: 654-59.

Gattaz G. Registro das emissões otoacústicas e sua aplicação clínica na audiologia Infantil. In: Caldas N, Neto SC, Sih T. Otologia e audiologia em pediatria. Rio de Janeiro: Revinter, 1999. 211-15.

Gayva DLC, Porto, MAA, Lopes AC. Estudos dos limiares de audibilidade em audiometria de frequências ultra-altas. 2002. In: Anais IX Jornada Fonoaudiológica. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2002.

Gkoritsa E, Korres S, Segas I, Xenelis I, Apostolopoulos N, Ferekidis E. Maturation of the auditory system: Transient otoacoustic emission suppression as an index of the medial olivocochlear bundle maturation. *Int J Audiol.* 2007; 46 (6): 277-86.

Godinho R, Keogh I, Eavey R. Perda auditiva genética. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2003; 69 (1): 100-04.

Goodman SS, Fitzpatrick DF, Ellison JC, Jesteadt W, Keefe DH. High-frequency click-evoked otoacoustic emissions and behavioral thresholds in humans. *J Acoust Am.* 2009; 125 (2): 1014-32

Gorga MP, Neely ST, Bergman B, Beauchaine KL, Kaminski JR, Peters J. et al. Otoacoustic emissions from normal-hearing and hearing-impaired subjects: distortion product responses. *J Acoust Soc Am*. 1993; 93 (4): 2050-60.

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.

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.

Guilford P, Ben AS, Blanchard S, Levilliers J, Belkahia A, Petite C. A non-syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature*. 1994a; 6: 24-28.

Guilford P, Avadi H, Blanchard S, Chaib H, Le Paslier D, Drira M, Petit C. A human gene responsible for neurosensory, non-syndromic recessive deafness is a candidate homologue of the mouse sh-1 gene. *Hum Mol Genet*. 1994b; 3 (6): 989-93.

Hall JW. Handbook of otoacoustic emissions. San Diego: Singular publishing group, 2000.

Hoffmann FMR, Rodrigues PF, Santos TMM, Sartorato EL, Maciel-Guerra AT, Matas CG, Moraes VCS. Interação entre audiologia e genética no estudo de uma família: a complexidade do diagnóstico molecular e do aconselhamento genético. *Rev Bras Otorrinol*. 2008; 74 (5): 698-702.

Hoth S. Effect of inner ear hearing loss on delayed otoacoustic emissions (TEOAE) and distortion product (DPOAE). *Laryngorhinootologie*. 2006; 75 (12): 709-18.

Jerger L. Clinical experience with impedance audiometry. *Arch Otolaryngol*. 1970; 92: 311-24.

Johnson RA, Wichern DW. *Applied Multivariate Statistical Analysis* New Jersey: Prentice-Hall, 1992.

Jürgens A, Buisan A, Canela M, Abelló, P. Study of the correspondence between pure tone and distortion product otoacoustic emissions audiometric: basis for an objective cochlear audiometrics model. *Acta Otorrinolaring Esp*. 1999; 50 (4): 253-9.

Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on heritary loss. *Hum Mol Genet Rev*. 1998; 7 (10): 1589-97.

Keats BJ, Berlin CI. Genomics and hearing impairment. *Genome Res*. 1999; 9 (1): 7-16.

Keefe DH, Gorga MP, Jesteadt W, Smith LM. Ear asymmetries in middle-ear, cochlear and brainstem responses in human infants. *J Acoust Soc Am*. 2008; 123 (3):1504-12.

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.

Kei J, Bronwyn B, Crebbin K, Richards A, Willeston N. High frequency distortion product otoacoustic emissions in children with and without middle ear dysfunction. *Inter J Pediat Otorh*. 2007; 71: 125-33.

Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*. 1997; 387 (6628): 80-3.

Kemp DT. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J Acoust Soc Am*. 1978; 64 (5): 1386-91.

Kemp DT. Evidence of Mechanical Nonlinearity and Frequency Selective Wave Amplification in the Cochlea. *Arch Otorhinolaryngol*. 1979; 224: 37-45.

Kemp DT, Ryan S, Bray PA. A guide to the effective use of otoacoustic emissions. *Ear Hear*. 1990; 11: 93-105.

Keogh T, Kei J, Driscoll C, Smyth V. Distortion-product otoacoustic emissions in schoolchildren: effects of ear asymmetry, handedness, and gender. *J Am Acad Audiol*. 2001; 12 (10): 506-13.

Kikuchi T, Adams JC, Miyabe Y, So E, Kobayashi T. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc*. 2000; 33 (2): 51-6.

Kimberley BP, Nelson DA. Distortion product emissions and sensorineural hearing loss. *J Otolaryngol*. 1989; 18 (7): 365-9.

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.

Knight KR, Kraemer DF, Winter C, Neuwelt EA. (2007). Early changes in auditory function as a result of platinum chemotherapy: use of extended high-frequency audiometry and evoked distortion product otoacoustic emissions. *J Clin Oncol*. 2007; 25:1190-5.

Kochhar A, Hildebrand MS, Smith RJH. Clinical aspects of hereditary hearing loss. *Genet Med*. 2007; 9 (7): 393-408.

Kowalska S, Matyja W, Guzek W, Wesolowski W, Szymczak W, Kostrzewski P. Effects of occupational exposure to a mixture of solvents on the inner ear: a field study. *Intern J Occup Med*. 2002; 15 (3): 247-56.

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.

Li F, Zhao M, Zhang Z, Ni D. Study on distortion otoacoustic emissions and expanded high frequency audiometry in noise exposure workers. *J Clin Otorhinolaryngol*. 2003; 17 (1): 16-19.

Liu XZ, Xia X, Ke X, Ouyang X, Du L, Liu Y, Angeli S, Telischi FF, Nance WE, Balkany T. The prevalence of connexin 26 (*GJB2*) mutations in the Chinese population. *Hum Genet.* 2002; 111 (4-5): 394-97.

Lonsbury-Martin BL, Mccoy MJ, Whitehead ML, Martin GK. Clinical testing of distortion-product otoacoustic emissions. *Ear Hearing.* 1993; 14 (1): 11-22.

Lonsbury-Martin BL, Martin GK, Telischi FF. Emissões otoacústicas na prática clínica. In: Musiek FE, Rintelmann WF. *Perspectivas Atuais em Avaliação Auditiva.* Barueri: Manole, 2001. 163-92.

Lopes AC, Almeida BK, Zanconato CM, Mondelli MFCG. Estudo dos limiares de audibilidade de altas frequências em crianças ouvintes com idades entre 7 e 13 anos. *Distúrb Comun.* 2007; 19 (2): 173-80.

Lopes AC, Godoy JB. Considerações Metodológicas para investigação dos limiares de frequências ultra-altas em indivíduos expostos ao ruído ocupacional. *Salusvita*, 2006; 25 (2): 149-160.

Lopes Filho O, Redondo MC. Produto de distorção nas emissões otoacústicas. *Rev Brasil Otorrinolaringol.* 1999; 61 (6): 485-94.

Lubianca Neto JF, Pereira AC. O que há de novo no campo da genética molecular da surdez: descoberta de gene para surdez. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 1999; 65: 106-13.

Magni C. Deficiência auditiva não sindrômica: avaliação genética (genes de conexinas) e fenotípica (clínica e audiológica) [tese] Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2007.

Martinho T, Zeigelboim BS, Marques JM. Perfil audiológico nas altas frequências em indivíduos de 30 a 40 anos com audição normal. *Arq Otorrinolaringol*. 2005; 9 (1):18-25.

Matsunaga T, Hirota E, Bito E, Niimi S. Clinical course of hearing and language development in GJB2 and non-GJB2 deafness following habilitation with hearing aids. *Audiol Neurotol*. 2006; 11 (1): 59-68.

Mazelova J, Popelar J, Syka J. Auditory function in presbycusis: peripheral vs. central changes. *Exp. Gerontol*. 2003; 38: 87-94.

Mello JM. Emissões otoacústicas evocadas por estímulos transientes em crianças submetidas à palatoplastia [dissertação] Curitiba: Universidade Tuiuti do Paraná, 2006.

Menezes PL, Soares IA, Albuquerque RRC, Moraes MFT. Distortion Product otoacoustic emissions: a study of the cochlear function. *J Bras Fonoaudiol*. 2002; 3: 104-7.

Middlesworth LV. Advanced otoacoustic emissions testing in the clinic. Apresentado no 27º Encontro Internacional de Audiologia (EIA). 2012, Bauru. Resumo em anais.

Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth LG, Friderici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin CI, Oddoux C, Ostrer H, Keats B, Friedman TB. Mutation in the connexin 26 gene (GJB2) among ashkenazi jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J. Med.* 1998; 339: 1500-05.

Moulin A, Bera JC, Collet L. Distortion product otoacoustic emissions and sensorineural hearing loss. *Audiology.* 1994; 33 (6): 305-26.

Mueller R. Connexin 26 (GJB2) deafness homepage. In: Martini A, Mazzoli M, Stephens D, Read A. Definitions, Protocols and Guidelines in Genetic Hearing Impairment. London: Whurr Publishers; 2001. 176-80.

Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi E, Arslan E, Zacchello F. Cx26 deafness mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet.* 1999; 36 (11): 829-32.

Northern JL, Downs MP. Testes audiológicos clínicos em crianças. In:_____. Audição em crianças. 3ed. São Paulo: Manole; 1989. 148-51.

Norton SJ, Stover LJ. Emissões Otoacústicas: Um novo instrumento clínico. In: Katz J. Tratado de Audiologia Clínica. São Paulo: Manole, 1999. 444-58.

Oliveira CA, Maciel-Guerra AT, Sartorato EL. Deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene on Brazilian patients. *Clin Genet.* 2002; 61: 354-8.

Oliveira CA, Alexandrino F, Abe-Sandes K, Silva WA, Maciel-Guerra AT, Magna LA, Sartorato EL. Frequency of the 35delG mutation in the *GJB2* gene in samples of European, Asian and African Brazilians. *Hum Biol.* 2004; 76 (2): 313- 16.

Oliveira CA, Pimpinati CJ, Alexandrino F, Magna LA, Maciel-Guerra AT, Sartorato EL. Allelic frequencies of the 35delG mutation of the *GJB2* gene in different Brazilian regions. *Genet Test.* 2007; 11 (1): 1-3.

Pavlovcinová G, Jakubíková J, Trnovec T, Lancz K, Wimmerová S, Sovčíková E, Palkovicová L. A normative study of otoacoustic emissions, ear asymmetry, and gender effect in healthy schoolchildren in Slovakia. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2010; 74 (2): 173-7.

Petersen MB. Non-syndromic autosomal-dominant deafness. *Clin Genet.* 2002; 62: 1-13.

Pialarissi PR, Gattaz G. Emissões Otoacústicas: Conceitos Básicos e Aplicações Clínicas. *Rev Arq Inter Otorrinolaringol.* 1997; 1 (2): 13-6.

Piatto VB, Maniglia JV. Importância do Gene Conexina 26 na etiologia da deficiência auditiva sensorineural não-sindrômica. *Acta Awho.* 2001; 20 (2): 106-12.

Piatto VB, Oliveira CA, Alexandrino F, Sartorato EL. Perspectivas para triagem da deficiência auditiva genética: rastreamento da mutação 35delG em neonatos. *J Pediatr.* 2005a; 81 (2): 139-42.

Piatto VB, Nascimento ECT, Alexandrino F, Oliveira CA, Lopes ACP, Sartorato EL, Maniglia JV. Genética molecular da deficiência auditiva não-sindrômica. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2005b; 71 (2): 216-23.

Piatto VB, Moreira OAV, Silva MAOM, Maniglia JV, Pereira MC, Sartorato EL. Correlação entre dados audiométricos e mutação 35delG em dez pacientes. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2007; 73 (6): 777-83.

Piatto VB, Secches LV, Arroyo MAS, Lopes ACP, Maniglia JV. Nonsyndromic Deafness - Molecular Update. *Open Biol J*. 2009; 2: 80-90.

Pickles JO, Comis SD, Osborne MP. Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti and their possible relation to sensory transduction. *Hear Res*. 1994; 15: 103-12.

Probst R, Harris FP. Transiently evoked and distortion-product otoacoustic emissions: comparison of results from normally hearing and hearing-impaired human ears. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993; 119: 858-60.

Probst R, Lonsbury-Martin BL, Martin GK. A review of Otoacoustic Emissions. *J Acoust Soc Am*. 1991; 89 (5): 2027-62.

Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Human Mutation*. 2000; 16: 190-202.

Ramos CS, Pereira LD. Processamento auditivo e audiometria de altas frequências em escolares de São Paulo. *Pró-Fono*. 2005;17 (2): 153-64.

Retamal MCR, Arochi R, Zeigelboim BS, Marques JM. Estudo dos limiares de audibilidade nas altas frequências em indivíduos normo-ouvintes de 12 a 19 anos. *Distúrb Comum*. 2004; 16 (1): 35-42.

Reuter W, Schonfeld U, Fischer R, Gross, M. Extended High Frequency Audiometry in Pre-school Children. *Intern J Audiology*, 1998; 37 (5): 285-94

Rissato MR, Santos TMM. Limiares tonais em frequências ultra-altas e reconhecimento de fala em portadores de perda auditiva neurossensorial. *Rev Cefac*. 2003; 5 (3): 279-83.

Robinette MS, Gattke TJ. *Otoacoustic emissions: clinical applications*. New York: Thieme, 2000.

Rogers AR, Burke SR, Kopun JG, Tan H, Neely ST, Gorga MP. Influence of calibration method on distortion-product otoacoustic emission measurements: II. Threshold prediction. *Ear Hear*. 2010; 31(4): 546-54.

Rosa AHO, Foiadeli F, Carvallo RMM, Lichtig I, Couto MIV. Emissões otoacústicas - produto de distorção em familiares de portadores de deficiência auditiva. Apresentado no 17º Encontro Internacional de Audiologia (EIA), 2002, Bauru. Resumo em anais.

Roslyng-Jensen AMA. Importância do diagnóstico precoce na deficiência auditiva. In: Lopes Filho O. Tratado de fonoaudiologia. São Paulo: Roca; 1997. 297-309.

Roush J, Holcomb MA, Roush PA, Escolar, ML. When hearing loss occurs with multiple disabilities. *Semin Hear.* 2004; 25 (4): 333-45.

Ruggero M, Rich N, Recio A, Naryan SS, Robles L. Basilar membrane responses to tones at the base of the chinchilla cochlea. *J Acoustic Soc Am.* 1997; 101: 2151-63.

Shayeb DR, Costa Filho OA, Alvarenga KF. Audiometria de alta frequência: estudo com indivíduos audiológicamente normais. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2003; 69 (1): 93-9.

Santos TMM, Russo ICP. A prática da audiologia clínica. 3ed. São Paulo: Cortez; 1991.

Sartorato EL, Gottardi E, Oliveira CA, Magna LA, Annichino-Bizzacchi JM, Seixas CA, Maciel-Guerra AT. Determination of the frequency of 35delG allele in Brazilian neonates. *Clin Genet.* 2000; 58 (1): 339-40.

Schechter MA, Fausti SA, Rappaport BZ, Frey RH. Age categorization of high-frequency auditory threshold data. *J Acoust Soc Am.* 1986; 79: 767-71.

Scheperle RA, Neely ST, Kopun JG, Gorga MP. Influence of in situ, sound-level calibration on distortion-product otoacoustic emission variability. *J Acoust Soc Am.* 2008; 124(1): 288-300.

Schmidt PMS, Tochetto TM. Investigação genética da surdez hereditária: mutação do gene da conexina 26. *Rev Soc Bras Fonoaudiol.* 2009; 14 (1):142-7.

Schmuziger N, Probst R, Smurzynski J. Otoacoustic emissions and extended high-frequency hearing sensitivity in young adults. *Int J Audiol*. 2005; 44 (1): 24-30.

Schrijver I. Hereditary non-syndromic sensorineural hearing loss. *Journal of Molecular Diagnostic*. 2004; 6 (4): 275-84.

Schuknecht HF, Gacek MR. Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1993; 102: 1-16.

Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Srisailapathy CR, Rosengren SS, Markham AF, Mueller RF, Lench NJ, Van Camp G, Smith RJ, Sheffield. Identification of mutation on the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat*. 1998; 11 (5): 387- 394.

Shaw GM, Jardine CA, Fridjhon P. A pilot investigation of high-frequency audiometry in obscure auditory dysfunction patients. *Brit J Audiol*. 1996; 30 (4): 233-37.

Shibata YKM, Kumai M, Nishii K, Nakamura K. Diversity and molecular anatomy of gap junctions. *Med Electron Microsc*. 2001; 34 (3):153-9.

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.

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*. 2010; 22 (4): 403-8.

Simões AM, Maciel-Guerra AT. A surdez evitável: predominância de fatores ambientais na etiologia da surdez neurossensorial profunda. *J Ped*. 1992; 68: 245-57.

Skinner MW, Miller JD. Amplification bandwidth and intelligibility of speech in quiet and noise for listeners with sensorineural hearing loss. *Audiology*. 1983; 22: 253-79.

Skotnika B, Hassmann-Poznanska E. Distortion product otoacoustic emissions in sensorineural hearing loss. *Otolaryngol Pol*. 1999; 53 (6): 693-8.

Smurzynski J, Leonard G, Kim DO, Lafreniere DC, Jung MD. Distortion product otoacoustic emissions in normal and impaired adult ears. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1990; 116 (11): 1309-16.

Soares JC, Carvalho RMM. Emissões otoacústicas evocadas por estímulo "tone burst" em neonatos. *Brazil J Otorhinolaryngol*. 2009; 75 (3): 441-8.

Steel KP. Perspectives: biomedicine. The benefits of recycling. *Science*. 1999; 285 (5432): 1363-4.

Stelmachowicz PG, Bauchaine KA, Kalberer A, Jesteadt W. Normative thresholds in the 8-20 kHz range as a function of age. *J Acoust Soc Am*. 1989; 86: 1384-91.

Stephens D. The detection of carriers of genetic hearing loss. Apresentado no IX Encontro Internacional de Audiologia (EIA). 1994, Bauru. Resumo em anais.

Suckfull M, Schneeweiss S, Dreher A, Schorn K. Evaluation of TEOAE and DPEOA measurements for the assessment of auditory thresholds in sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol*. 1996; 116 (4): 528-33.

Sundstrom RA, Van Laer L, Van Camp G, Smith RJH. Autosomal recessive non syndromic hearing loss. *Am J Med Gen*. 1999; 89: 123-29.

Thompson MW, Mcinnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson Genética Médica. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Tomiasi AA. Análise de registros das emissões otoacústicas evocadas - produto de distorção em indivíduos com perda auditiva coclear [dissertação] Curitiba: Universidade Tuiuti do Paraná, 2006.

Tondorf J, Kurman B. High frequency audiometry. *Ann Oto Rhinol Laryngol*. 1984; 93: 576-82.

Trehub SE, Schneider BA, Morrongiello BA, Thorpe LA. Developmental changes in high-frequency sensitivity. *Audiology*. 1989; 28: 241-249.

Uchida Y, Ando F, Shimokata H, Sugiura S, Ueda H, Nakashima T. The effects of aging on distortion-product otoacoustic emissions in adults with normal hearing. *Ear Hear*. 2008; 29 (2): 176-84.

Vallejo JC, Silva MN, Oliveira JAA, Carneiro JJ, Rocha LSO, Figueiredo JFC. Detecção precoce de ototoxicidade usando emissões otoacústicas produtivas de distorção. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2001; 67 (6): 845-51.

Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage, 2011. Disponível em <<http://hereditaryhearingloss.com>>. Acesso em 03 de março de 2011.

Van Camp G, Willems PJ, Smith RJ. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. *Am J Hum Genet*. 1997; 60 (4): 758-64.

Vento BA, Durrant JD, Sabo DL, Boston JR. Development of f1/f2 ratio functions in humans. *J Acoust Soc Am*. 2004; 115 (5): 2138-47.

Wilcox SA. Connexin 26 deafness in several interconnected families. *J Med Genet*. 1999; 36 (5): 383-385.

Zeigelboim BS, Fukuda Y, Iorio MCM. Audiometria de alta frequência. *Acta Awho*. 1996; 15 :155-8.

Zeigelboim BS. Os limiares de audibilidade nas altas frequências em pacientes com insuficiência renal crônica submetidos a tratamento conservador [tese] São Paulo. Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, 2000.

Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, Mila M, Monica MD, Lutfi J, Shohat M, Mansfield E, Delgrosso K, Rappaport E, Surrey S, Fortina P. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet.* 1997; 6 (9): 1605-9.