

**RELAÇÃO ENTRE PERDA AUDITIVA E ALTERAÇÕES  
GENÉTICAS EM PACIENTES TRATADOS DE CÂNCER  
NA INFÂNCIA**

**PATRÍCIA HELENA PECORA LIBERMAN**

**Tese apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para a obtenção do título de Doutor  
em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro**

**Co-Orientadora: Dra. Maria Valéria Goffi  
Gomez**

**São Paulo**

**2015**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Liberman, Patrícia Helena Pecora

**Relação entre perda auditiva e alterações genéticas em  
pacientes tratados de câncer na infância** / Patrícia Helena Pecora

Liberman - São Paulo; 2015.

61p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:  
Oncologia.

Orientadora: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. PERDA AUDITIVA/genética. 2. NEOPLASIAS.  
3. PEDIATRIA. 4. QUIMIOTERAPIA. 5. PERDA AUDITIVA/diagnóstico.

## DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais muito obrigada pelos ensinamentos e valores de vida.

Ao meu marido, Sami, agradeço o incentivo e participação na realização deste trabalho. Aos meus queridos filhos por estarem sempre presentes.

AMO VOCES!!!

Aos pacientes por me ensinarem que a única forma de chegar ao impossível é acreditar que é possível.

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra Dirce Maria Carraro, pelo carinho e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

À Dra Edi Lúcia, pelo incentivo e ajuda na realização deste trabalho.

À Priscila Lima Jacob pelo apoio, ensinamentos em biologia molecular e ajuda na análise genética dos pacientes.

Ao Rogério Marins pela ajuda na análise genética dos pacientes.

À querida Maria Valéria Goffi Gomez, pela amizade, paciência estímulo e ensinamentos.

À querida Christiane Schultz, pelo apoio, amizade, atenção e ajuda para realização deste trabalho.

Ao Neviçolino Carvalho, pelo apoio e ajuda na coleta dos pacientes e ensinamentos em oncologia.

A equipe da Pediatria pelo apoio na coleta da amostra.

À querida Suely e bibliotecários pela disposição e colaboração na aquisição de artigos e organização do material.

Ao Vinícius Calsavara pelos conhecimentos de estatística e ajuda na organização dos resultados.

À Elisa Ferreira e Claudia de Paula pela disposição, ensinamentos em genética e ajuda na análise dos dados.

À Louise Danielle de Carvalho Mota e Eloisa Olivieri pela ajuda na organização das amostras de DNA.

À equipe de enfermagem, pela colaboração e cuidado na coleta da amostra de sangue.

## RESUMO

Liberman PHP. **Relação entre perda auditiva e alterações genéticas em pacientes tratados de câncer na infância.** São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

A ototoxicidade é uma das sequelas do tratamento oncológico com uso de quimioterápicos derivados da platina cisplatina (CDDP) e carboplatina (CBDCA). Tal tratamento pode provocar a lesão do órgão periférico da audição acometendo a estria vascular e células ciliadas externas (CCE) do giro basal. A perda auditiva causada pela ototoxicidade é neurosensorial bilateral prejudicando inicialmente altas frequências e o seu uso contínuo pode acometer frequências  $\leq 4$  kHz prejudicando o reconhecimento de fala. Estudos recentes têm demonstrado uma associação entre algumas variantes genéticas e a toxicidade dos derivados da platina. O objetivo do nosso estudo foi identificar se há influência de fatores genéticos na perda auditiva encontrada em pacientes tratados de câncer na infância submetidos a quimioterápicos derivados da platina. Avaliamos a ocorrência de perda auditiva e sua associação com a dose de CDDP e CBDCA assim como, a associação entre a ototoxicidade e a presença das variantes *MT-RNR1*-m.1555A>G, *GJB2*-c.35delG, e *GSTP1*-c.313A>G. **Material e Método:** Foram selecionados pacientes que tiveram câncer na infância e estavam fora de tratamento por pelo menos cinco anos. Setenta e três pacientes preencheram os critérios e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Sessenta e um pacientes realizaram tratamento de risco para a audição com derivados da platina e 12 pacientes sem tratamento de risco para audição. Todos realizaram avaliação audiológica (audiometria tonal, vocal e imitanciometria) e extração do DNA sendo analisada pela técnica de PCR e sequenciamento capilar das seguintes variantes: *GJB2*-c.35delG, c. *MT-RNR1*-m.1555A>G e *GSTP1*-c.313A>G. **Resultados:** Na avaliação audiológica identificamos ocorrência de perda auditiva de 66% para os

pacientes que receberam CDDP e 15% para os pacientes que receberam CBDCA. Houve uma associação estatisticamente significativa entre perda auditiva e dose de CDDP ou CBDCA ( $p=0,001$  e  $p=0,002$ , respectivamente). Não foi identificada a variante *GJB2*-c.35del G e *MT-RNR1*-c.1555A>G. A variante *GSTP1*-c.313A>G (A/G, G/G) foi identificada em 52% da amostra. Não encontramos uma associação entre presença da variante *GSTP1*-c.313A>G (A/G, G/G) e presença de perda auditiva. Identificamos uma associação estatisticamente significativa entre a presença da variante *GSTP1*-c.313A>G (A/G, G/G) e perdas auditivas em frequências  $\leq 4$  kHz ( $p=0,002$ ) (OR=10,0 IC (95%)[1,03 – 97,1]RR=1.56 IC (95%) [ 1,01 – 2.40 ]).

**Conclusão:** A ocorrência de perda auditiva nos pacientes que receberam CDDP foi 66,6% enquanto que nos pacientes que receberam CBDCA foi 15,7%, com associação entre dose de CDDP e CBDCA e perda auditiva sendo a dose de risco para perda auditiva com uso de CDDP de 492,1mg/m<sup>2</sup>. Não foram encontradas as variantes *GJB2*-35delG e *MT-RNR1*-m.1555A>G nos pacientes avaliados, e não houve associação da presença da variante *GSTP1*-c.313A>G e a presença de perda auditiva. Entretanto, os pacientes com a variante *GSTP1*-c.313A>G (A/G e G/G) apresentaram maior risco (**OR=10.0 (IC95% -1.03-97.1)**) para adquirirem perdas que interferem na inteligibilidade de fala ( $\leq 4$  kHz).

## SUMMARY

Liberman PHP. [**Relations between hearing loss and genetic alterations in patients treated from cancer during childhood**]. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Ototoxicity is one of the adverse effects in the oncological treatment using chemotherapy with platin agents such cisplatin (CDDP) and/or carboplatin (CBDCA). Such treatment may lead to end organ lesions in the auditory system involving the stria vascularis and outer hair cells, mainly at the basal turn. Hearing loss caused by ototoxicity is bilateral, sensorineural affecting initially the high frequencies, but it may progress to frequencies below 4 kHz and compromise the speech recognition. Recent studies have demonstrated that the association of some genetic variants with the toxicity of platin agents. The aim of this study was to identify whether there is any influence of genetic factors on the hearing loss found in patients treated from cancer during childhood with platin agents. The occurrence of hearing loss and its association with the cisplatin and carboplatin dosages, as well as the presence of variants of A1555G in the mitochondrial gene *MT-RNR1* (*12S rRNA*), 35delG in the *GJB2* gene, and c.313A>G in the *GSTP1* gene were evaluated. **Material and Methods:** Patients who had cancer during childhood, who were released from treatment for at least 5 years were selected. Seventy-three patients fulfilled the criteria and signed the informed consent. Among the participants, 61 patients had been involved in treatment with platin agents, considered at risk for hearing loss. Twelve patients were not treated with platin agents, with no risk for hearing loss. All of them were submitted to hearing evaluation, including pure tone audiometry, speech audiometry and immittance audiometry, as well as blood collection and DNA extraction. DNA was analyzed by PCR procedure and capilar sequencing of the following variants: 35delG in *GJB2* gene, A1555G in the mitochondrial *MT-RNR1* gene (*12S rRNA*) and c.313A>G in the *GSTP1* gene. **Results:** In

the hearing evaluation 66,6% were identified with hearing loss among the patients treated with cisplatin and 15,7% among those treated with carboplatin. There were a statistically significant association between hearing loss and the cisplatin and carboplatin dosages ( $p= 0,001$  and  $p=0,002$ , respectively). The 35del G variant in the *GJB2* gene and m.1555A>G variant in the *MT-RNR1* gene were not identified in any of the participants. The c.313A>G (A/G, G/G) variant in the *GSTP1* gene was identified in 52% of the whole sample. We did not find any association between the presence of the c.313A>G (A/G, G/G) variant in the *GSTP1* gene and the presence of hearing loss. Nevertheless, we did find an association between the c.313A>G (A/G, G/G) variant in the *GSTP1* gene and hearing losses that involve frequencies  $\leq 4$  kHz ( $p=0,002$ ) (OR=10,0 IC (95%)[1,03 – 97,1]RR=1.56 IC (95%) [1,01 – 2.40]). **Conclusion:** Occurrence of hearing loss in patients that were treated with cisplatin was 66,6% while it was 15,7% in those patients treated with carboplatin, with an association between the total dose of CDDP or CDBCA and hearing loss. The risk dose of CDDP for hearing loss was 492,1mg/m<sup>2</sup>. No *GJB2*-35delG or *MT-RNR1*-m.1555A>G variants were found in the evaluated patients, and there were no association between the presence of *GSTP1*-c.313A>G variant and hearing loss. However, patients with the *GSTP1*-c.313A>G variant (A/G and G/G) presented more risk to develop hearing loss that interfere in the speech intelligibility (OR=10.0 (IC95% -1.03-97.1)).

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	PCR alelo específico para a mutação.35delG no gene GJB2.	16
<b>Figura 2</b>	Ciclos utilizados na amplificação do gene <i>GJB2</i> .....	17
<b>Figura 3</b>	Ciclos de amplificação para posterior sequenciamento do gene <i>GJB2</i> .....	18
<b>Figura 4</b>	Ciclos de amplificação para o estudo da mutação mitocondrial m.1555A>G.....	20
<b>Figura 5</b>	Estratégia de análise de restrição para a variante m.1555A>G.....	21
<b>Figura 6</b>	Análise do polimorfismo Ile-105 -Val do gene GSTP1.....	23
<b>Figura 7</b>	Análise do polimorfismo Ile-105-Val do gene GSTP1 por sequenciamento capilar.....	25
<b>Figura 8</b>	Média dos limiares tonais da orelha direita e orelha esquerda segundo o tipo de tratamento.....	29
<b>Figura 9</b>	Organograma mostrando a distribuição dos pacientes selecionados.....	30
<b>Figura 10</b>	Dose de CDDP e presença de perda auditiva.....	31
<b>Figura 11</b>	Dose de risco de CDDP.....	33
<b>Figura 12</b>	Dose de CBDCA e presença de perda auditiva.....	34

<b>Figura 13</b>	Audiogramas (orelha direita e esquerda) dos pacientes tratados com dose até 400mg/m <sup>2</sup> de CDDP.....	40
<b>Figura 14</b>	Audiogramas dos Pacientes com dose de 401 a 600 mg/m <sup>2</sup> CDDP(orelha direita e esquerda).....	40
<b>Figura 15</b>	Audiogramas dos Pacientes com dose de 601 a 800 mg/m <sup>2</sup> CDDP(orelha direita e esquerda).....	41
<b>Figura 16</b>	Audiogramas dos Pacientes com dose de 801 a 1000 mg/m <sup>2</sup> de CDDP(orelha direita e esquerda).....	41
<b>Figura 17</b>	Audiogramas dos Pacientes com dose maior que 1000 mg/m <sup>2</sup> de CDDP(orelha direita e esquerda).....	42
<b>Figura 18</b>	Audiogramas dos Pacientes com perda auditiva que receberam CBDCA(orelha direita e esquerda).....	42

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b>	A distribuição dos pacientes estudados de acordo com o tipo de neoplasia primária.....	12
<b>Tabela 2</b>	Distribuição dos pacientes em relação ao gênero nos grupos estudados.....	27
<b>Tabela 3</b>	Média e desvio-padrão das idades ao diagnóstico e idades na avaliação nos grupos estudados.....	28
<b>Tabela 4</b>	Número de pacientes com perda auditiva e sem perda auditiva em relação a dose de CBDCA e CDDP.....	30
<b>Tabela 5</b>	Associação entre perda auditiva e dose de risco de CDDP.....	32
<b>Tabela 6</b>	Associação entre perda auditiva e dose de CBDCA.....	34
<b>Tabela 7</b>	Distribuição das variantes genéticas ( <i>GJB2</i> -35delG; <i>MTRNR1</i> -m.1555A>G; <i>GSTP1</i> -c313A>G) nos pacientes submetidos a tratamento de risco e sem tratamento de risco...	38
<b>Tabela 8</b>	Variantes no gene <i>GSTP1</i> encontrados nos pacientes que realizaram tratamento de risco (CDDP ou CBDCA) com e sem perda auditiva.....	39
<b>Tabela 9</b>	Variantes no gene <i>GSTP1</i> encontradas nos pacientes que realizaram tratamento de risco (CBDCA ou CDDP) com perda auditiva em relação a perdas com acometimento de frequências $\leq 4$ kHz e $> 4$ kHz.....	43

<b>Tabela 10</b>	Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão logística ajustado aos dados.....	44
<b>Quadro 1</b>	Sequências dos primers utilizados para a amplificação do gene <i>GJB2</i> e tamanho dos fragmentos gerados.....	16
<b>Quadro 2</b>	Sequência dos <i>primers</i> para amplificar a região de interesse.	22
<b>Quadro 3</b>	Apresentação dos pacientes em relação ao tratamento (com risco e sem risco para perda auditiva), a presença e ausência de perda, as variantes c.35delG gene <i>GJB2</i> , m.1555A>G gene <i>MTRNR1</i> e c.313A>G(A/G ou G/G) gene <i>GSTP1</i> e dose de CDDP e CBDCA.....	34

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>°C</b>	<i>Grau Celsius</i>
<b>μM</b>	Micromolar
<b>ASHA</b>	American Speech Language Hearing Association
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>CBDCA</b>	Carboplatina
<b>CCE</b>	Célula ciliada externa
<b>CDDP</b>	Cisplatina
<b>daPa</b>	Decapascal
<b>dB</b>	Decibel
<b>deIG</b>	Deleção da base nitrogenada guanina
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxinucleotídeo trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>IC</b>	Intervalo de Confiança
<b>IPRF</b>	Índice Percentual de Reconhecimento de Fala
<b>kHz</b>	quilohertz
<b>LRF</b>	Limiar de Reconhecimento de Fala
<b>m<sup>2</sup></b>	metro quadrado
<b>mg</b>	miligrama
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NA</b>	Nível de audição
<b>ng</b>	Nanograma
<b>OD</b>	Orelha Direita
<b>OE</b>	Orelha Esquerda
<b>OR</b>	Odds Ratios
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
<b>pH</b>	<b>Potencial hidrogeniônico</b>
<b>pmol</b>	Picomolar

<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RR</b>	Risco Relativo
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphim
<b>STO</b>	Sistema tímpano Ossicular
<b>Tu</b>	Tumor
<b>U</b>	Unidade
<b>µL</b>	Microlitro

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
2.1	Objetivo Geral.....	10
2.2	Objetivos Específicos .....	10
<b>3</b>	<b>PACIENTES E MÉTODO .....</b>	<b>11</b>
3.1	População de estudo .....	11
3.2	Procedimentos.....	12
3.2.1	Avaliação Auditiva .....	13
3.2.2	Avaliação Genética.....	14
3.3	Análise Estatística .....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
4.1	Resultados da Avaliação Audiológica em relação ao tratamento .....	28
4.2	Pacientes que receberam CDDP com perda e sem perda auditiva.....	35
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>53</b>

## ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
- Anexo 2** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão 1)
- Anexo 3** Extração de DNA de sangue periférico
- Anexo 4** Valores acústicos médios de frequência e intensidade dos sons da fala do português brasileiro, dispostos no registro gráfico do audiograma
- Anexo 5** Classificação de Chang

# 1 INTRODUÇÃO

A audição é um sentido de extrema importância para a vida, pois é através dela que adquirimos conhecimento para nos comunicarmos com o mundo. A comunicação oral é o principal meio para expressarmos nossas ideias e, para que isto ocorra adequadamente, a audição, compreensão e articulação das palavras devem estar intactas.

Perder a audição significa perder uma importante forma de contato com o mundo e nossos semelhantes. Apesar de existirem diferentes graus de perdas auditivas, qualquer impedimento na condução do som ao sistema nervoso central significa perda do conteúdo da mensagem.

As perdas auditivas podem ser classificadas em graus: leve (de 26 a 40dB), moderada (de 41 a 55 dB), moderadamente/severa (de 56 a 70 dB), severa (de 71 a 90 dB) e profunda (acima de 91dB) (SILVAN e SILVERMAN 1991). Cada grau tem implicações específicas na perda da informação acústica.

O sistema auditivo periférico é dividido em orelha externa, orelha média e orelha interna. A orelha externa e média são responsáveis pela absorção das ondas sonoras e encaminham essa energia mecânica aos líquidos labirínticos com a correção de energia necessária para reproduzir no líquido a mesma energia que trafegava pelo ar. A orelha interna absorve e transforma a energia mecânica em energia elétrica, desencadeando uma série de impulsos neurais transmitidos para o sistema nervoso central

(ZEMPLIN 2000). A perda auditiva condutiva acontece quando ocorre uma alteração na orelha externa e/ou média e a perda auditiva neurossensorial quando a lesão é na orelha interna. Quando ambas as orelhas (média e interna) estiverem comprometidas denominamos de perda auditiva mista (ZEMPLIN 2000). As perdas auditivas neurossensoriais usualmente são definitivas, enquanto as perdas auditivas com componente condutivo, em que a aeração da orelha média e/ou o mecanismo do sistema tímpano-ossicular (STO) estão prejudicados podem ser temporárias e, eventualmente, podem ser corrigidas após tratamento otorrinolaringológico.

As perdas auditivas podem ser decorrentes de doenças de orelha média e interna, lesões traumáticas, envelhecimento, exposição a ruídos, associadas a síndromes, causas idiopáticas e por uso de drogas ototóxicas.

Dentre as drogas ototóxicas podemos citar a cisplatina (CDDP) e a carboplatina (CBDCA) sendo antineoplásicos com atividade antitumoral comprovada. A CBDCA é uma droga análoga à CDDP e sua ototoxicidade é menor. Apesar disso, quando usada em doses elevadas, dose total acima de  $2000\text{mg}/\text{m}^2$ , pode causar o mesmo tipo e grau de perda que a CDDP, sendo a dosagem de risco da CDDP  $400\text{mg}/\text{m}^2$  (RYBAK 1999; BERTOLINI et al. 2004). Em um estudo anterior PECORA LIBERMAN et al. 2011 avaliando crianças com retinoblastoma tratadas com CDDP ou CBDCA conforme o estadiamento do tumor, encontraram 6,6% de perdas auditivas nas crianças tratadas com CBDCA e 66,6% no grupo que recebeu CDDP demonstrando que CDDP apresenta maior risco para perda auditiva em relação a CBDCA.

Tais drogas alteram o sistema antioxidante celular pois as vias de detoxificação, os níveis de glutathione e a atividade de enzimas antioxidante estão reduzidas levando a peroxidação lipídica instalando assim a toxicidade celular. Na cóclea sua administração tem ação sobre as células ciliadas do órgão de Corti, nas células da estria vascular e nos neurônios do gânglio espiral (MUKHERJEA e RYBAK 2011). Alguns estudos têm demonstrado que os mecanismos citotóxicos da CDDP incluem dano do DNA mitocondrial e formação de radicais livres (RYBAK 1999, POIRRIER et al. 2010, MUKHERJEA e RYBAK 2011).

A perda auditiva caracterizada pela ototoxicidade é neurosensorial descendente bilateral e irreversível (HYPPOLITO e OLIVEIRA 2005). A ocorrência de perda auditiva varia entre 20% e 60% (LIBERMAN 2005; ZUUR et al. 2007; KATZENSTEIN et al. 2009), devido as diferenças nas populações estudadas ou dependendo da classificação de perda auditiva adotadas (SCHULTZ et al. 2009). As alterações auditivas podem variar também pelo modo de administração da droga, localização do tumor, função renal, idade do paciente, medicamentos associados, irradiação prévia, pré-existência de perda auditiva, dose cumulativa, dose total do tratamento, ou susceptibilidade individual (PEDALINI et al. 2000; TESTA et al. 2002). Os sintomas no paciente podem variar entre zumbido e diminuição da acuidade auditiva, sendo a principal queixa a dificuldade de compreender a fala em ambiente ruidoso, compatível com perda auditiva em frequências altas. Porém, existem muitos pacientes sem queixas, que apresentam diminuição da acuidade auditiva (LIBERMAN et al. 2004). Perdas auditivas, em geral,

podem gerar limitações sociais (ZUUR et al. 2007), entretanto, na criança, qualquer perda de audição pode trazer consequências irreversíveis para o desenvolvimento da linguagem e da fala (SKINNER 1978), pois a percepção dos sons da fala depende de um sistema auditivo perceptual periférico íntegro (SCHOCHAT 1997).

A perda auditiva neurossensorial é ocasionada por qualquer alteração no funcionamento da cóclea. O funcionamento coclear pode ser explicado da seguinte forma: o som provoca movimentos oscilatórios da membrana basilar, as células ciliadas externas (CCE) são estimuladas pelo movimento relativo entre a membrana tectória e o órgão de Corti. Os esterocílios das células ciliadas externas (CCE) sofrem deflexão por esse movimento abrindo os canais de transdução havendo a entrada de cargas positivas na forma de cálcio e potássio produzindo um potencial de recepção e desencadeando movimentos de alongamento e contração nas células ciliadas externas (CCE) na frequência do estímulo. Tal contração muscular necessita da energia do ATP e da presença de proteínas específicas (KURK 1999).

A proteína conexina 26 é codificada pelo gene *GJB2* que se localiza na região cromossômica 13q12. Ela está associada à comunicação celular, relacionando-se aos *gap junctions* (junções intercelulares), é responsável pela remoção rápida de íons  $K^+$  nas células na cóclea permitindo a reciclagem de íons potássio nos líquidos cocleares mantendo a capacidade auditiva. Alterações no mecanismo de *gap junctions* resultam em perda de função das células ciliadas e distúrbio do potencial elétrico endococlear ou na sobrevivência das células sensoriais do epitélio coclear levando a perda

auditiva sensorineural. Sendo assim alterações no gene *GJB2* acarretam modificações na estrutura protéica prejudicando a remoção de íons potássio das células ciliadas e impedindo a excitação a novos estímulos sonoros resultando em perda auditiva (KIKUCHI et al. 2000).

Acredita-se que mutações no gene da conexina 26 sejam responsáveis por 20% de todas as perdas auditivas neurosensoriais (WILCOX et al. 2000). A principal mutação é a c.35delG, deleção simples de uma Guanina (G) em uma série de seis guaninas, que se estendem da posição 30 à posição 35 do gene *GJB2*. A mutação ocasiona a presença de um stop códon prematuro levando à síntese de uma proteína incompleta, com 12 aminoácidos, ao invés do polipeptídeo normal, com 226 aminoácidos (DENOYELLE et al. 1997). Esta mutação está envolvida em 70% dos casos de surdez com herança autossômica recessiva (WILCOX et al. 2000) sendo uma das causas das perdas auditivas no Brasil justificando a importância da pesquisa desta mutação como rotina (BATISSOCO et al. 2009). A variante *GJB2* 35delG em heterozigose não diagnostica a causa da surdez, somente demonstra que o indivíduo é portador e resulta em um menor número de conexinas 26 codificadas. A pesquisa desta variante é muito importante pois 2 a 4% dos indivíduos são portadores dessa mutação em heterozigose e não apresenta perda auditiva (COHN e KELLEY 1999; COHN et al. 1999).

Além de mutações em genes nucleares já foram identificadas mutações em genes mitocondriais também associados a casos de surdez síndrômica e não síndrômica. Algumas dessas mutações têm sido atribuídas à predisposição à surdez quando associadas a agentes ototóxicos ou outros

mecanismos que prejudiquem o funcionamento normal das mitocôndrias. A função da mitocôndria é disponibilizar energia para as células sob a forma de trifosfato de adenosina (ATP). A cóclea consome grande quantidade de energia, então alterações no DNA mitocondrial de células ciliadas causam deficiência auditiva em uma proporção de 0,5% a 1% de todas as deficiências de origem genética (CARVALHO e RIBEIRO 2002).

O gene *MT-RNR1* que codifica a subunidade 12S do RNA ribossômico apresenta uma variante específica, *MT-RNR1-m.1555A>G*, sendo a troca de uma Adenina (A) por uma Guanina (G) na posição 1555. Esta variante foi a primeira alteração molecular identificada como causa de surdez não-sindrômica. A variante *MT-RNR1 m.1555A>G* pode predispor indivíduos à surdez pelo uso de medicamentos aminoglicosídeos e está associado à surdez não-sindrômica (ESTIVILL et al. 1998). Dados apontam que esta variante está associada à hipersensibilidade a aminoglicosídeos, uma vez que a alteração no gene *12SrRNA*, torna-o mais similar à subunidade ribossomal bacteriana, levando a um aumento da ligação do antibiótico aminoglicosídico, que causa um efeito tóxico na cóclea (GUAN et al. 2000). ABREU-SILVA et al. (2006) estudaram indivíduos com perda auditiva não sindrômica em nosso meio e sugeriram que a mutação A1555G é causa comum de perda auditiva com prevalência de 2%. Esta quando identificada em casos isolados ou familiares de surdez, o uso de aminoglicosídeos ou outros fatores de risco devem ser evitados sendo o aconselhamento genético importante na prevenção da surdez.

As evidências da associação de mutações mitocondriais com o uso de aminoglicosídeos, levando à suscetibilidade de perda auditiva, torna o rastreamento dessas mutações muito importante, principalmente em grupos de risco como o caso de crianças submetidas à quimioterapia. Alguns estudos sugerem uma relação entre a presença de variantes genéticas e susceptibilidade à ototoxicidade da CDDP (RYBAK et al. 2009).

KNOLL et al. (2006) hipotetizaram que mutações ou polimorfismos nos genes envolvidos nos mecanismos da audição podem se manifestar em pacientes que sofrem ototoxicidade e não na população geral.

A exposição ao ruído, a radioterapia, a cisplatina/carboplatina e uso de aminoglicosídeos induz o estresse oxidativo (THOMAS et al. 2006), provocando danos às células ciliadas na cóclea. O estresse oxidativo ocorre quando há produção aumentada de radicais livres ou quando os mecanismos antioxidantes estão prejudicados ocasionando a morte da célula (POIRRIER et al. 2010).

Riedemann et al 2008 estudaram variantes no gene *LRP2*, que codifica a proteína megalina, membro da família das lipoproteínas altamente expressa nos rins e nas células da orelha interna. Compararam 25 pacientes que receberam CDDP e apresentaram perda auditiva com 25 pacientes que receberam CDDP e não apresentaram perda auditiva e receberam em média 400mg/m<sup>2</sup>. Encontraram uma alta frequência de A-alelo de rs2075252 em pacientes com perda auditiva comparado com pacientes com audição normal, sugerindo que variantes no gene da megalina podem afetar a susceptibilidade individual da ototoxicidade da CDDP.

LANGER et al. (2013) apontam genes como candidatos a ototoxicidade da CDDP quando associados a exposição de fármacos específicos. Um dos genes estudados é o *GSTP1* que está localizado na região cromossômica 11q13 e codifica a proteína glutathione S transferase P que está envolvida na proteção do DNA contra o dano oxidativo. A variante genética *GSTP1-c.313A>G* ocorre no exon 5 do respectivo gene, leva a substituição da isoleucina a valina (p- Ile – 105- Val) resultando em uma baixa atividade enzimática e menor capacidade de detoxificação (HU et al 1998).

HENG et al 2015 estudaram variantes no gene *ACYP2* que é expresso na cóclea e está envolvido na homeostase coclear, em 238 crianças com tumor em SNC e relataram a associação de tais variantes com a ototoxicidade da CDDP (rs1872328:  $p= 3.9 \times 10^{-8}$ ), OR = 4.5).

Certos polimorfismos parecem desempenhar um papel importante seja aumentando ou diminuindo a probabilidade de ototoxicidade em pacientes tratados com cisplatina (RYBAK et al. 2009; LANGER et al. 2013)

LIBERMAN (2005) estudou 200 pacientes com idade média de 21 anos que tiveram câncer na infância sendo 77% (n=64) pacientes que receberam CDDP, destes 23% (n=15) não apresentaram perda auditiva, mesmo recebendo dosagem de risco para audição.

Uma das hipóteses da predisposição ao desenvolvimento da perda auditiva estaria relacionada à presença de variantes genéticas. Uma vez estabelecida a associação entre variantes genéticas e a ototoxicidade de

derivados da platina, o tratamento oncológico poderia ser melhor gerenciado e os pacientes melhor orientados.

O presente estudo destina-se a estudar se existe influência genética identificável no desenvolvimento da perda auditiva em pacientes submetidos ao tratamento oncológico com derivados da platina.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi identificar se há influência de fatores genéticos na perda auditiva encontrada em pacientes tratados de câncer na infância submetidos a quimioterápicos derivados da platina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar a ocorrência de perda auditiva em pacientes submetidos ao tratamento com derivados da platina e sua associação com a dose;
- 2 Avaliar a associação entre ototoxicidade e a presença das variantes *MTRNR1*-m.1555A>G, *GJB2*- c.35delG e *GSTP1*-c.313A>G (p.Ile105 Val);

### **3 PACIENTES E MÉTODO**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C.Camargo Cancer Center sob número 1020/07 (Anexo 1). Os pacientes elegíveis ou seu responsável foram convidados a participar do estudo e se concordassem assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

#### **3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO**

No período de 2011 a 2013, foram incluídos no estudo 73 pacientes com diagnóstico de câncer na infância, tratados no período de 1984 – 2004, acompanhados no Departamento de Pediatria do A.C.Camargo Cancer Center e que se encontravam fora de tratamento oncológico, no mínimo há 5 anos. Destes, 61 pacientes realizaram tratamento de risco para audição com uso de derivados da platina (CDDP ou CBDCA) e 12 não realizaram tratamento de risco para audição.

A nossa casuística foi composta predominantemente por pacientes que tiveram osteossarcoma, retinoblastoma e tumores de células germinativas.

**Tabela 1** - A distribuição dos pacientes estudados de acordo com o tipo de neoplasia primária.

Neoplasia	Tratamento de risco N (%)	Sem tratamento de risco N (%)	Total N (%)
Osteossarcoma	20 (32,8)	0 (0,0)	<b>20 (27,4)</b>
Retinoblastoma	28 (46,0)	3 (25,0)	<b>31 (42,4)</b>
Tu células germinativas (seio endodérmico)	10 (16,4)	0 (0,0)	<b>10 (13,6)</b>
Hepatoblastoma	1 (1,6)	0 (0,0)	1(1,4)
Neuroblastoma	1 (1,6)	0 (0,0)	1(1,4)
Tumor de bexiga	0 (0,0)	1 (8,3)	1(1,4)
Tumos de wilms	0 (0,0)	3 (25,0)	3(4,1)
Hodgkin	0 (0,0)	1 (8,3)	1(1,4)
LLA	0 (0,0)	3 (25,0)	3(4,1)
Tumor de Ewing	0 (0,0)	1 (8,3)	1(1,4)
Rabdomiossarcoma	1 (1,6)	0 (0,0)	1(1,4)
<b>Total</b>	<b>61 (100)</b>	<b>12 (100)</b>	<b>73(100)</b>

### 3.2 PROCEDIMENTOS

Todos os pacientes foram submetidos à avaliação audiológica: audiometria tonal limiar, audiometria vocal, imitanciometria e avaliação genética. Foram excluídos pacientes que tivessem qualquer impedimento de realizar as avaliações audiológicas, que realizaram radioterapia em região de cabeça e pescoço ou aqueles que receberam CBDCA e CDDP concomitante por não ser possível classificá-los nos grupos para análise estatística.

### **3.2.1 Avaliação Auditiva**

#### **A Audiometria Tonal Limiar e Vocal**

Para a avaliação auditiva foi utilizado o audiômetro Madsen Orbiter 922. Na audiometria tonal convencional foram determinados os limiares de audibilidade nas frequências de 250 a 8000 Hz. Quando estes limiares se encontravam acima de 25 dBNA, obtivemos os limiares tonais por via óssea nas frequências de 500 a 4000 Hz. Limiares até 25 dBNA foram considerados normais, em cada frequência testada (YANTIS 1994).

Além disso foi determinado o Limiar de Reconhecimento de Fala (LRF), com palavras trissilábicas, e o Índice Percentual de Reconhecimento de Fala (IPRF), utilizando-se a lista de palavras monossilábicas. Os resultados do LRF deveriam ser compatíveis com a média dos limiares das frequências 500 a 4000 Hz.

#### **B Imitanciometria**

Para a imitanciometria foi utilizado o equipamento Madsen Zodiac 901. O funcionamento do sistema tímpano-ossicular (STO), foi avaliado por meio da timpanometria e da pesquisa do reflexo estapediano para afastar qualquer componente condutivo nas perdas identificadas. A timpanometria mede a mobilidade do sistema a variações de pressão. Os timpanogramas são classificados em três tipos A, B e C (JERGER1970). O limiar do reflexo estapediano é definido como a menor intensidade do estímulo acústico capaz de provocar uma mudança mínima mensurável na complacência do STO. Em indivíduos com audição normal a intensidade mínima necessária

para eliciar o reflexo está entre 70 e 100 dBNA (NORTHERN e GABBARD 1994). Esse exame foi realizado para confirmação dos resultados da audiometria tonal e descartar alterações de orelha média.

Tanto pacientes que receberam tratamento de risco para perda auditiva como aqueles submetidos a tratamento sem risco para audição, foram classificados em dois grupos, sem perda auditiva e com perda auditiva considerando limiares superiores a 25 dB NA em qualquer frequência testada (SCHULTZ et al. 2009). Além disso, foram divididos os pacientes com perda auditiva envolvendo frequências  $\leq 4$  kHz e perda auditiva com acometimento em frequência acima de 4 kHz pois a presença de queixa auditiva e redução da inteligibilidade auditiva ocorre a partir do acometimento da frequência de 4kHz conforme descrito em LIBERMAN et al. (2012; 2013).

A dose total de CBDCA e CDDP recebida pelos pacientes, foi calculada e ajustada para superfície corpórea de  $1\text{m}^2$  com o oncologista pediátrico.

### **3.2.2 Avaliação Genética**

#### **A Extração de DNA genômico de sangue periférico**

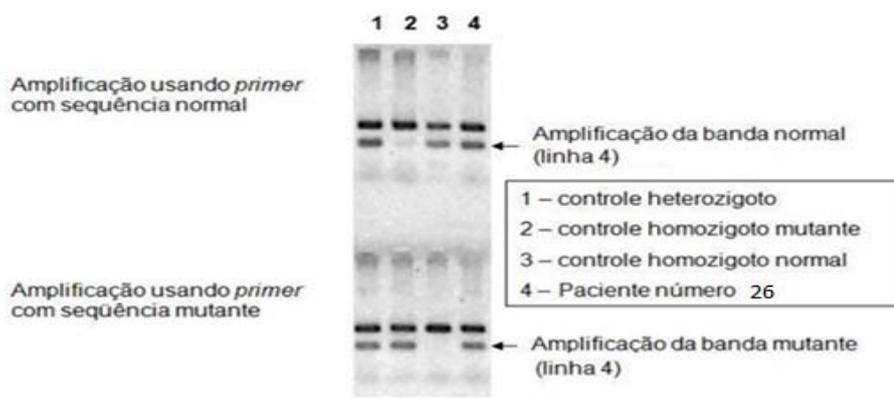
A extração do DNA genômico foi realizada a partir das amostras de sangue periférico dos pacientes que estavam armazenadas no banco de macromoléculas que faz parte do biobanco dessa instituição (A.C.Camargo Cancer Center) (CAMPOS et al. 2012). O protocolo utilizado na extração está apresentado no Anexo 3. Foram enviados cerca de  $2\ \mu\text{g}$  de DNA para o

Laboratório de Genética Humana (LGH) - CBMEG-UNICAMP para o rastreamento da variante c.35delG no gene nuclear *GJB2*, da alteração A1555G no gene mitocondrial *MTRNR1* e análise da variante c313A>G no gene nuclear *GSTP1*.

O DNA restante cerca de 1 µg foi armazenado em nosso Laboratório de Genômica e Biologia Molecular (LGBM) para finalização da avaliação da variante *GSTP1* c313A>G (p.Ile105Val) e confirmação de alguns resultados relacionados à mesma.

#### **B Rastreamento da mutação c.35delG no gene *GJB2*:**

A mutação c.35delG no gene *GJB2* foi rastreada pela técnica de PCR alelo específico a partir do DNA extraído do sangue periférico total dos pacientes. Os *primers forward* normal (NOR) e mutante (MUT) foram utilizados, em reações diferentes, para amplificar os alelos sem e com a mutação, respectivamente. O *primer* comum (COM) foi usado como *primer* reverso nas duas reações. Com essas duas reações (NOR e MUT) é possível identificar cada indivíduo como sendo homozigoto normal, homozigoto mutante ou heterozigoto para a mutação c.35delG (Figura 1). Os *primers* A e B foram usados como controles internos de amplificação para as reações. Esta técnica foi desenvolvida no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG, a qual se encontra patenteada (Patente nº P10005340-6; Método de teste para surdez de origem genética – UNICAMP, 2002).



**Figura 1** - PCR alelo específico para a mutação, 35delG no gene *GJB2*

- **Sequenciamento automático do gene *GJB2*:**

**1 Amplificação do gene *GJB2*:** O éxon codificante do gene *GJB2*, com 681 pb, foi dividido para a amplificação pela técnica de PCR, de acordo com as condições previamente descritas por KELSELL et al. (1997) e DENOYELLE et al. (1997). As sequências dos *primers* e o tamanho dos fragmentos resultantes são mostrados no Quadro 1.

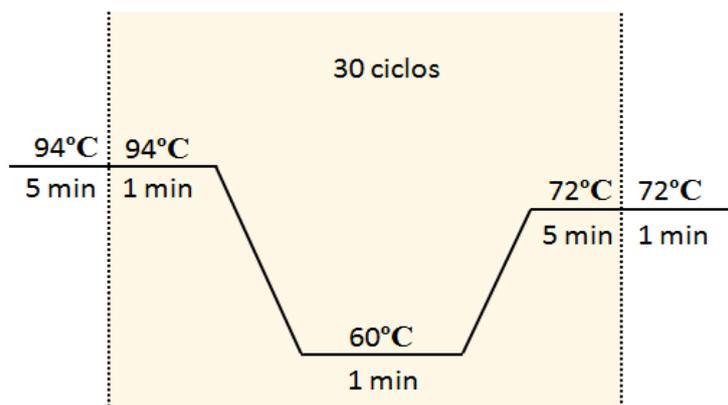
**Quadro 1** - Sequências dos *primers* utilizados para a amplificação do gene *GJB2* e tamanho dos fragmentos gerados.

PAR	POSIÇÃO EM RELAÇÃO AO ATG	PRIMERS 5' → 3'	TAMANHO (pb)
1	-32 254	Cx1F – CTC CCT GTT CTG TCC TAG Cx1R – GAC ACG AAG ATC AGC TGC	284
2	172 692	Cx2F – GCT ACG ATC ACT ACT TCC C Cx2R – GGT TGC CTC ATC CCT C	520

Para um volume de 50  $\mu$ L de reação, foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 $\mu$ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (forward e reverse), 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase em 1X tampão de PCR (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, completando com água até o volume final.

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), sendo realizados 30 ciclos de aquecimento a 94°C para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 60°C para o anelamento dos *primers*, e então de 72°C para a extensão das novas fitas. As condições da PCR estão resumidas na Figura 2.

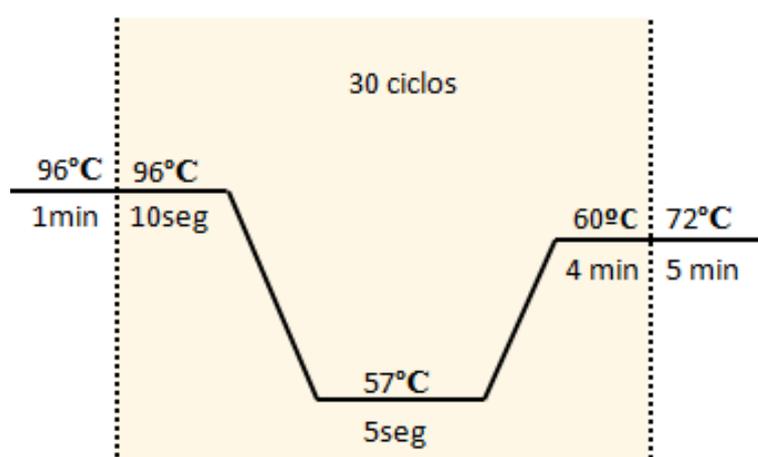
Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1%, após coloração com brometo de etídio (Sigma). Os fragmentos do gene foram amplificados para posterior rastreamento de mutações por sequenciamento.



**Figura 2** - Ciclos utilizados na amplificação do gene *GJB2*.

**2 Purificação dos produtos de PCR:** Os fragmentos amplificados pela técnica de PCR foram purificados utilizando-se o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega Corporation, EUA). Após a purificação, a quantidade e a pureza das amostras de DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop® ND-8000 (Thermo Scientific).

**3 Reação para Sequenciamento:** As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador automático ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer utilizando-se o *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Para o preparo das reações foram utilizados: 40-80ng de DNA, 2µL do *mix BigDye*, 5pmol do *primer* forward ou reverse H<sub>2</sub>O deionizada para completar 10µL. As condições de amplificação estão especificadas na Figura 3.



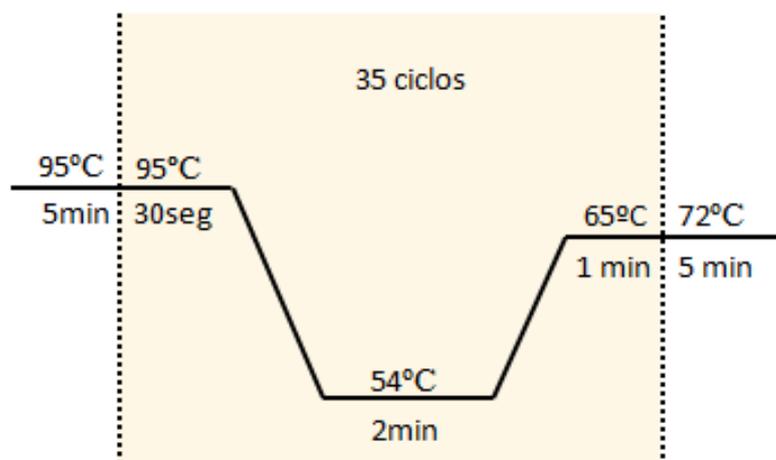
**Figura 3** - Ciclos de amplificação para posterior sequenciamento do gene *GJB2*.

Após a amplificação, as reações de sequenciamento foram purificadas. Primeiramente foram adicionados 2,5 µL de EDTA 125 mM e 25 µL de etanol 100%, após 15 min de incubação à temperatura ambiente (protegido da luz), a placa foi centrifugada por 45 min a 3.700 rpm (4°C). O etanol foi descartado e, posteriormente, foram adicionados 30 µL de etanol 70%. Foi realizada uma nova centrifugação, por 10 min a 3.700 rpm, sendo o etanol novamente descartado. Antes da colocação da placa no sequenciador, foram adicionados 10 µL de formamida seguida de homogeneização e centrifugação rápida. A amostra foi desnaturada (5 min a 95 °C) e em seguida colocada no gelo por 10min.

**4 Análise das sequências obtidas:** As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com as sequências normais dos genes, com o auxílio dos programas *Chromas Lite*® ([http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)) e *CLC Sequence Viewer*.

**C. Rastreamento da variante m.1555A>G no gene mitocondrial MT-RNR1:** Para o rastreamento da mutação m.1555A>G foram utilizadas as condições previamente descritas por Friedman e colaboradores (1999) e Iwasaki e colaboradores (2000), com o par de *primers* MIT-F (5' – GTC GAA GGT GGA TTT AGC AGT – 3') e MIT-R (5' – CAG AAG GTA TAG GGG TTA GTC – 3'). Para um volume de 50 µL de reação foram utilizados: 200 a 500 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeos trifosfato (dATP,

dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmol de cada *primer* (forward e reverse), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase em 1X tampão de PCR (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, completando com água até o volume final. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As condições da PCR estão resumidas na Figura 4.

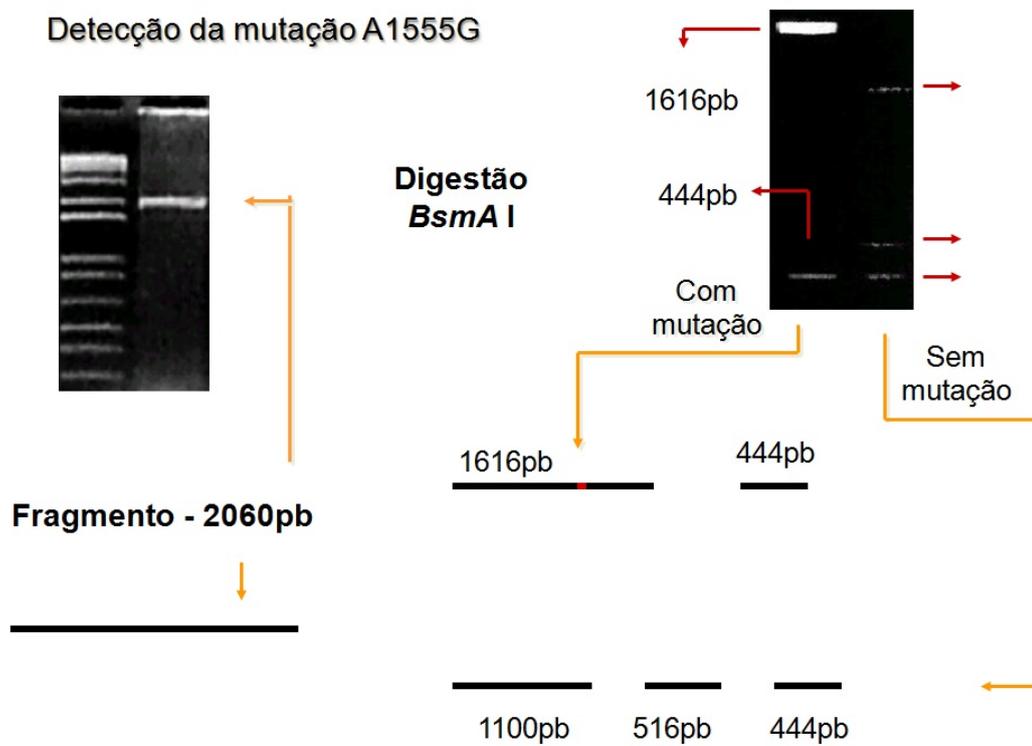


**Figura 4** - Ciclos de amplificação para o estudo da variante mitocondrial m.1555A>G.

Após a amplificação pela técnica de PCR, foram gerados fragmentos de 2060pb. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à análise de restrição utilizando a enzima *Bsm*AI (Invitrogen), por 2 h a 55°C. Para o preparo da reação de digestão foram utilizados: 17,5 µL do produto de PCR, 2,0 µL do tampão da enzima e 0,5 µL da enzima *Bsm*AI (5000U/µL).

A análise dos produtos gerados foi realizada em gel de agarose 1,5%, após coloração com brometo de etídio (Sigma). Em indivíduos que não são portadores da mutação m.1555A>G são gerados 3 fragmentos: de 1100, 516

e 444 pb. E em indivíduos portadores da mutação, um dos sítios de restrição é abolido, sendo gerados apenas 2 fragmentos: de 1616 e 444 bp.



**Figura 5** - Estratégia de análise de restrição para a variante m.1555A>G.

**D. Análise do genótipo *GSTP1*:** O sítio polimórfico (Ile-105-Val) no éxon 5 do gene *GSTP1*, foi avaliado pela técnica de PCR seguida por análise de fragmentação com a enzima de digestão *BsmAI* ou PCR seguida de sequenciamento.

- **Análise de fragmentação com enzima de digestão *BsmAI***

Para um volume de 30 µL de reação de PCR foram utilizados: 50 ng de DNA genômico, 200 µM de cada dNTP, 200 ng de cada primer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, Tampão de PCR 1X PCR [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3)] e 1 unidade da Taq DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e por fim, extensão final de 72°C por 15 minutos. Os pares de *primers* utilizados na reação de PCR estão expressos no Quadro 2.

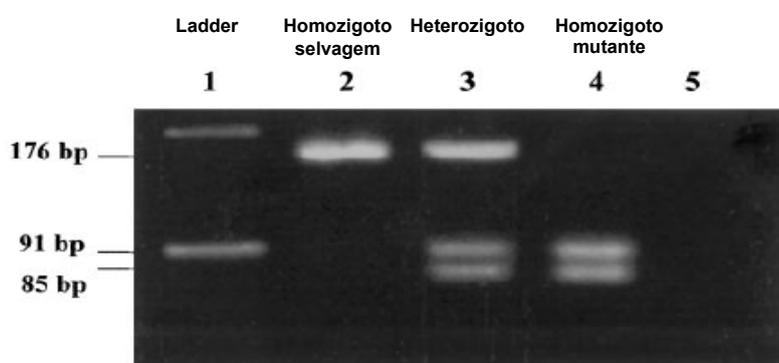
**Quadro 2** - Sequência dos *primers* para amplificação da região de interesse.

Par de <i>primers</i>	Gene	Sequência dos <i>Primers</i> 5'→3'	Tamanho do fragmento (pb)
1	<i>GSTP1</i>	F- ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA R- TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT	176

F("Forward"); R("Reverse"); pb (pares de base)

Os produtos do PCR (tamanho de 176 pb) foram visualizados em gel de agarose a 1,5% e posteriormente digeridos em banho maria na presença da enzima de digestão *BsmAI* por 2 horas à temperatura de 55°C. A detecção de diferentes alelos (91 e 85 pb) foi realizada através do gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio utilizando um marcador

molecular (ladder) de 100 pb. Em indivíduos que não são portadores do polimorfismo Ile-105-Val (homozigoto selvagem A/A) é gerado um fragmento único de 176 pb. Em indivíduos portadores do polimorfismo (heterozigoto A/G) são gerados 3 fragmentos: 176, 91 e 85 pb e finalmente em indivíduos homozigotos mutantes (G/G) são gerados 2 fragmentos: 91 e 85 pb (Figura 6).



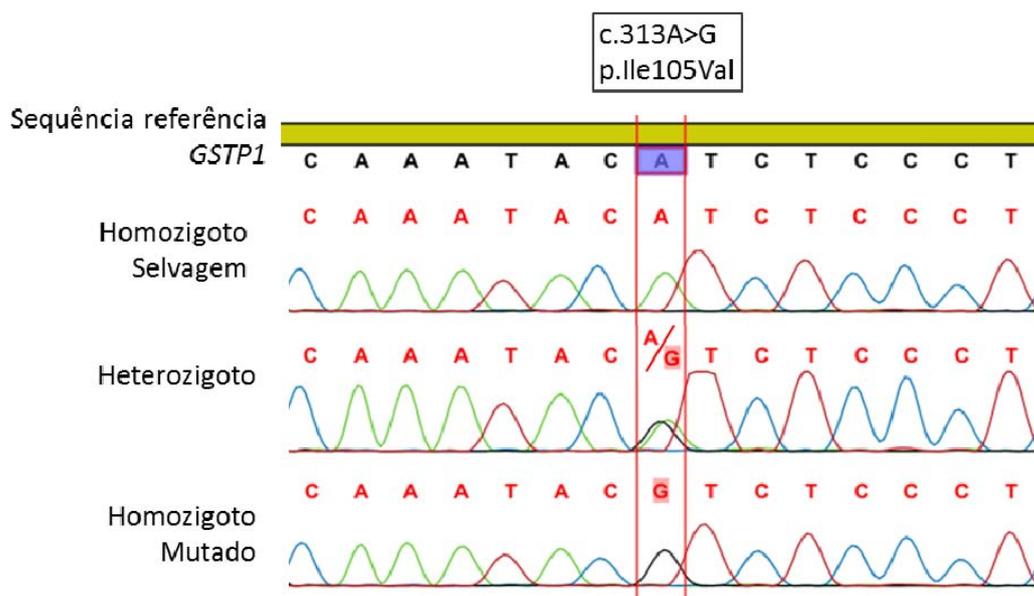
**Figura 6** - Análise do polimorfismo Ile-105-Val do gene *GSTP1*

- **Análise de sequenciamento:** As amostras de DNA foram quantificadas e diluídas para que ficassem entre 30 a 50 ng/  $\mu$ L. Assim, seguiu-se com a reação de PCR. Para um volume de 15  $\mu$ L de reação foram utilizados: 30 a 50 ng de DNA genômico, 1X Go Taq Mix (2x) (promega), 3 pmol de cada primer (forward e reverse- Quadro 2). As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well ThermalCycler (AppliedBiosystems) nas seguintes condições: desmaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 57°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos, e por fim, extensão de 72°C por 15 minutos.

Os produtos de PCR com 176 pb foram resolvidos em gel de agarose 1% e seguido por purificação enzimática em reação contendo 1X tampão, 3 unidades de Exonuclease e 1 unidade de Shrimp Alkaline Phosphatase. A reação foi realizada em aparelho nas seguintes condições: 37°C por 30 minutos e 80°C por 15 minutos.

Após a purificação do produto de PCR, seguiu-se com a reação de sequenciamento em volume final de 10 µL, contendo 1X tampão, 0,7 µL de Big Dye v3.1 (Life Technologies) e 4 pmoles de primer direto ou reverso. As reações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96-Well ThermalCycler (AppliedBiosystems) nas seguintes condições: 95°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 18 segundos, 55°C por 18 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após a reação de sequenciamento, seguiu-se com a precipitação do DNA e sequenciamento no equipamento ABI3130xl (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. A análise do sequenciamento permite identificar os indivíduos não portadores do polimorfismo Ile-105-Val do gene *GSTP1* (homozigoto selvagem A/A) e os indivíduos portadores, heterozigotos (A/G) e homozigotos mutantes (G/G) (Figura 7).



**Figura 7** - Análise do polimorfismo Ile-105-Val do gene *GSTP1* por sequenciamento capilar.

#### **Avaliação das sequencias obtidas**

As sequencias obtidas foram alinhadas e comparadas com a sequência referência dos genes *GJB2*, *MTRNR1* e *GSTP1*. As sequências geradas pelo grupo LGH-CBMEG foram analisadas pelos programas Chromas e Gene Runner. O LGBM- CIPE utilizou o software CLC- Genomics Workbench (**CLC** Bio, Aarhus, Dinamarca).

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação entre os grupos foram analisadas as variáveis quantitativas e categóricas pelos testes t de *Student* ou os equivalentes não paramétricos de *Mann - Whitney*. Para verificar a associação entre as variáveis categóricas foi utilizado o teste do qui quadrado ou o teste exato de Fisher. Para todos os testes foi estabelecido nível de significância  $\alpha= 5\%$ , isto é,  $p < 0,05$ . Além disso foi ajustado um modelo de regressão Logística com objetivo de encontrar os fatores preditivos para perda auditiva. Os dados foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism 6*.

## 4 RESULTADOS

A amostra foi composta por 73 pacientes que apresentaram câncer na infância e estavam fora de tratamento oncológico e seguiam acompanhamento no ambulatório de Pediatria do A.C. Camargo Cancer Center. Destes, 61 pacientes realizaram tratamento de risco para audição e 12 não realizaram tratamento de risco. Dos pacientes que realizaram tratamento de risco 31 apresentaram perda auditiva e 30 pacientes não apresentaram perda auditiva. Já nos pacientes que não realizaram tratamento de risco nenhum paciente apresentou perda auditiva. Sendo assim podemos inferir que a perda auditiva foi em função do tratamento.

**Tabela 2** - Distribuição dos pacientes em relação ao gênero nos grupos estudados.

	Tratamento de risco	Sem tratamento de risco	Total	Valor P
	N (%)	N (%)	N (%)	
<b>Gênero</b>				
<b>Masculino</b>	27 (79)	7 (21)	34(100)	0,37
<b>Feminino</b>	34 (87)	5 (13)	39(100)	

\*Teste do Qui-quadrado

Na nossa casuística tivemos 34 (47%) pacientes do sexo masculino, havendo uma similaridade em relação ao gênero.

**Tabela 3** - Média e desvio-padrão das idades ao diagnóstico e idades na avaliação nos grupos estudados.

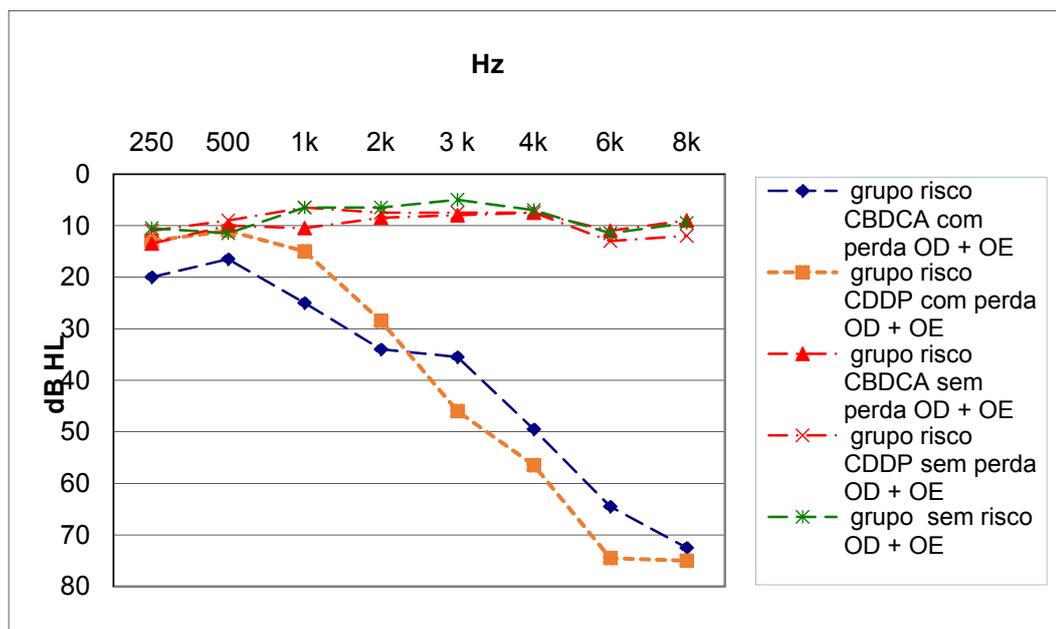
	<b>Tratamento de risco</b>	<b>Sem Tratamento de risco</b>	<b>p</b>
	Média (DP)	Média (DP)	
<b>Idade ao diagnóstico (meses)</b>	68,7 (65,2)	46,0 (35,7)	<b>0,34*</b>
<b>Idade na avaliação (anos)</b>	20,6 (8,7)	18,8 (6,6)	<b>0,02*</b>

\*Teste de Mann Whitney

Observamos na tabela 3 que a média da idade do grupo que realizou tratamento de risco foi maior em relação ao grupo que não realizou tratamento de risco porém não existe uma diferença estatisticamente significativa. Em relação a média das idades na avaliação entre os grupos houve uma diferença estatisticamente significativa. Esta diferença ocorreu devido ao tipo de neoplasia.

#### **4.1 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO AUDIOLÓGICA EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO**

Na Figura 8 apresentamos a média dos limiares tonais da orelha direita e orelha esquerda no grupo de pacientes que realizaram tratamento de risco para audição (CDDP ou CBDCA) e sem tratamento de risco para audição.

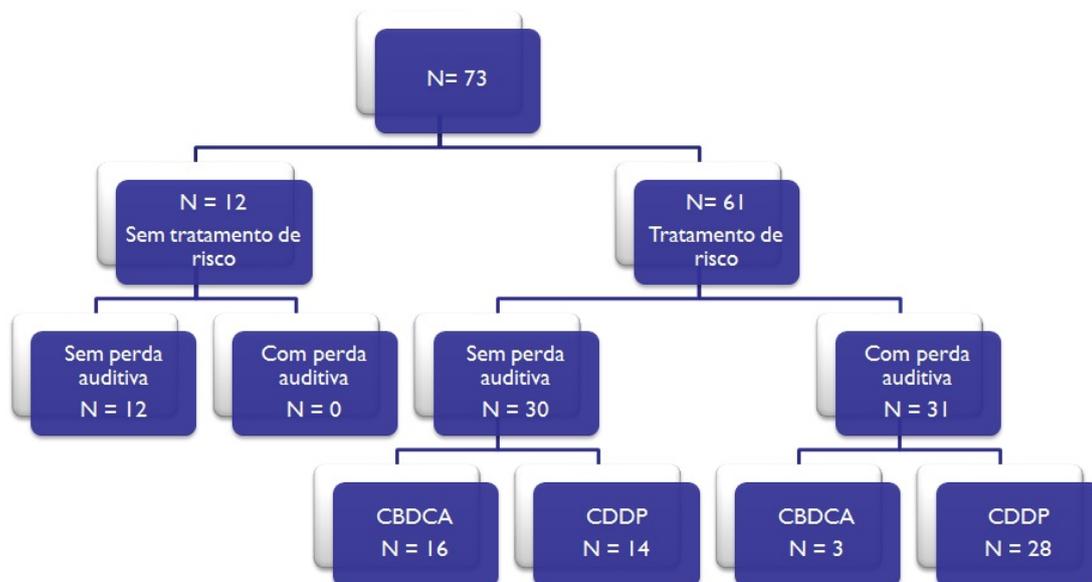


**Figura 8** - Média dos limiares tonais da orelha direita e orelha esquerda segundo o tipo de tratamento

Observamos pelo audiograma que as perdas auditivas são bilaterais simétricas descendentes com acometimento maior nas frequências altas tanto nos pacientes que fizeram tratamento de risco com CDDP como com CBDCA. Pela média dos limiares notamos que os pacientes que apresentaram perda auditiva nas frequências acometidas foram a partir de 2 kHz e não encontramos perdas auditivas nos pacientes que não realizaram tratamento de risco para a audição.

O grupo que recebeu tratamento de risco foi formado por 61 pacientes, 31 com perda auditiva e 30 sem perda auditiva (figura 9). Dos pacientes com perda auditiva 3 receberam CBDCA e 28 CDDP sendo a dose média de 4802,0 (479,9) mg/m<sup>2</sup> e 726,4 (323,0) mg/m<sup>2</sup> respectivamente. Dos pacientes sem perda auditiva 16 receberam CBDCA e

14 CDDP sendo a dose média de 2481,0 (1210,0) mg/m<sup>2</sup> e 453,9 (308,6) mg/m<sup>2</sup> respectivamente (Tabela 4).



**Figura 9** - Organograma mostrando a distribuição dos pacientes selecionados.

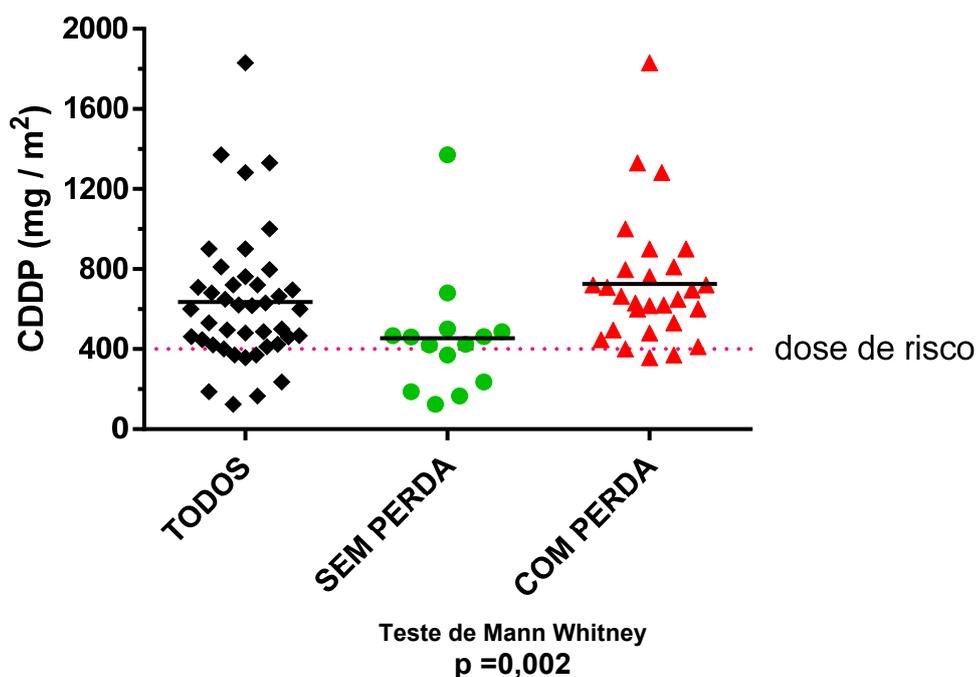
**Tabela 4** - Número de pacientes com perda auditiva e sem perda auditiva em relação a dose de CBDCA e CDDP.

Droga	Com perda		Sem perda		Total N (%)	p
	N (%)	Dose (mg/m <sup>2</sup> ) media (DP)	N (%)	Dose (mg/m <sup>2</sup> ) media (DP)		
CBDCA	3 (15,7)	4802 (479.9)	16 (84,3)	2481.0 (1210)	19	<b>0,010*</b>
CDDP	28 (66,6)	726.1 (323.0)	14 (33,3)	453.9 (308.6)	42	<b>0,002*</b>
<b>Total</b>	<b>31 (46)</b>		<b>30 (54)</b>		<b>61 (100)</b>	

\* Teste de Mann Whitney

Observamos na Tabela 4 uma diferença estatisticamente significativa entre as doses de CBDCA ( $p=0.010$ ) e de CDDP ( $p= 0.002$ ) entre os grupos com presença e ausência de perda auditiva. Nosso estudo apresentou 15,7% de perda auditiva em pacientes que receberam CBDCA e 66,6% em pacientes que receberam CDDP.

Na Figura 10 e na tabela 5 observamos a distribuição dos pacientes submetidos a tratamento com CDDP em relação à dose de risco descrita na literatura (YANCEY et al. 2012).



**Figura 10** - Dose de CDDP e presença de perda auditiva

Como apresentado na Tabela 5 observamos grande associação de perda auditiva com altas doses de CDDP. Um alto percentual de pacientes (93%) apresentou perda auditiva recebendo doses de CDDP  $\geq 400$  mg/m<sup>2</sup> comprovando que doses a partir de 400 mg/m<sup>2</sup> estão associadas com maior

risco para perda auditiva ( $p=0.01$ ,  $OR =7.22$ ) (IC 95% - 1.19 – 44.0),  $RR=1.44$  (IC 95% - 0.96 – 2.16). Por outro lado, 9 pacientes (64%) receberam CDDP acima de  $400 \text{ mg/m}^2$  não apresentaram perda auditiva e 2 pacientes (7%) receberam dose de CDDP inferiores a  $400 \text{ mg/m}^2$  e apresentaram perda auditiva.

**Tabela 5** - Associação entre perda auditiva e dose de risco de CDDP.

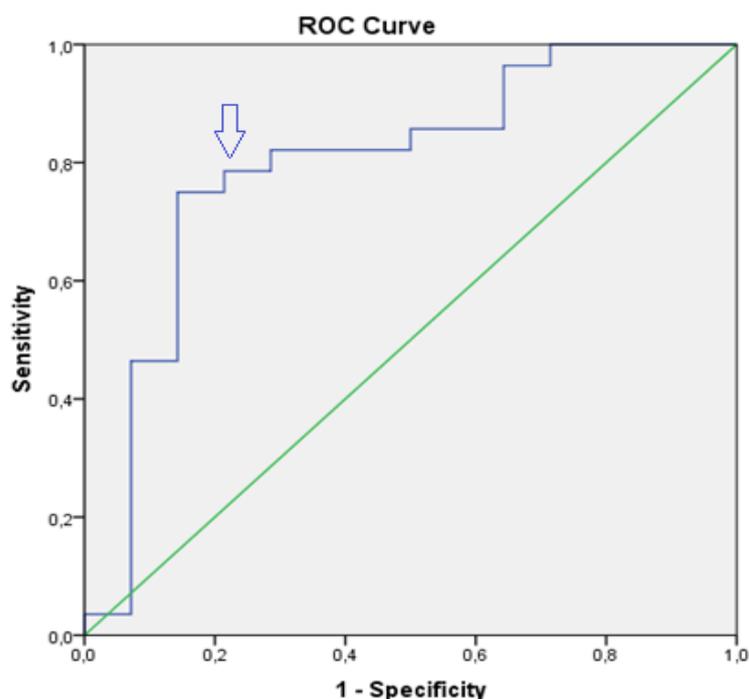
	Dose $\geq 400 \text{ mg/m}^2$ N (%)	Dose $< 400 \text{ mg/m}^2$ N (%)	Total N	p
Com perda	26(93)	2 (7)	28 (100)	<b>0,01*</b>
Sem perda	9 (64)	5 (36)	14 (100)	

**\*Teste do Qui-quadrado**

**OR= 7,22 IC (95%)= [1.19 - 44.0]**

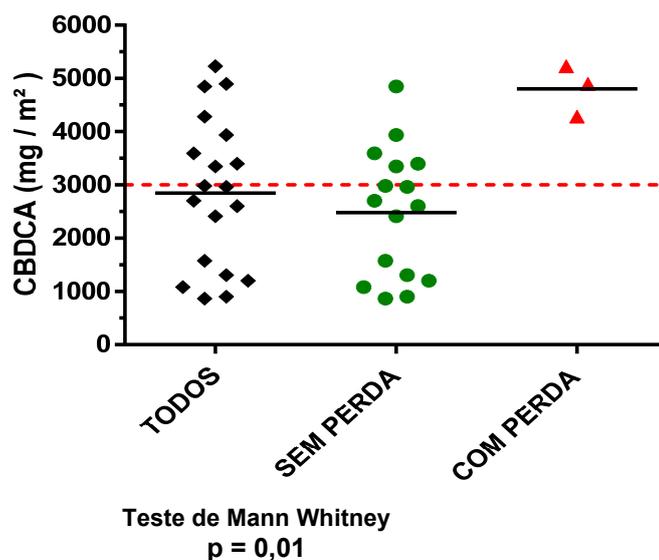
**RR= 1,44 IC (95%)= [ 0.96 – 2.16]**

Com o objetivo de determinar a dose de risco da CDDP, utilizamos a curva ROC e observamos que o valor que maximiza a sensibilidade (Sens) e a especificidade (Esp) simultaneamente foi  $492,1 \text{ mg/m}^2$  (Sens= 78,6% e Esp=78,6%).



**Figura 11** - Dose de risco de CDDP

Na Figura 12 e na Tabela 6 observamos a distribuição dos pacientes submetidos a tratamento com CBDCA. A dose de risco de CBDCA descrita na literatura envolve tratamentos combinados (RYBAK et al. 1999), a dose considerada em nossa casuística abrangeu a média de todos os pacientes que receberam CBDCA. Observamos que a dose de CBDCA do grupo que apresentou perda auditiva foi estatisticamente maior do que do grupo com limiares dentro da normalidade (4802,0 (479,9)  $\text{mg}/\text{m}^2$  vs 2481,0 (1210,0)  $\text{mg}/\text{m}^2$   $p=0.01$ ) (Figura 11).



**Figura 12** - Dose de CBDCA e presença de perda auditiva

**Tabela 6** - Associação entre perda auditiva e dose de CBDCA.

	Dose $\geq 3000\text{mg/m}^2$ N (%)	Dose $< 3000\text{mg/m}^2$ N (%)	Total N	p
Com perda	3 (100)	0 (0)	3 (100)	<b>0,02*</b>
Sem perda	5 (31)	11 (69)	16 (100)	

\*Teste exato de Fisher

OR=14,64 IC(95%) [0,63 – 335,9]

RR= 3,20 IC (95%) [ 1,54 – 6,62]

Na Tabela 6 observamos que os 3 pacientes que apresentaram perda auditiva receberam dose de CBDCA  $\geq 3000\text{ mg/m}^2$ . No entanto notamos que 16 (84%) dos pacientes que receberam CBDCA não apresentaram perda auditiva, sendo que 5 (31%) receberam dose  $\geq 3000\text{mg/m}^2$  enquanto que 11(69%) receberam dose  $< 3000\text{mg/m}^2$ . Assim com base nestes dados, podemos inferir que na nossa amostra os pacientes que receberam dose de CBDCA  $< 3000\text{mg/m}^2$  tiveram um risco de desenvolver perda auditiva 14,64 vezes menor do que receberam dose acima deste valor (OR=14,64 IC (95%)[0,63 – 335,9], p=0,02).

## 4.2 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO GENÉTICA

A avaliação das variantes genéticas foi realizada em toda amostra independente do tratamento recebido e a presença ou não de perda auditiva.

**Quadro 3** - Apresentação dos pacientes em relação ao tratamento (com risco e sem risco para perda auditiva), a presença e ausência de perda, as variantes c.35delG gene *GJB2*, m.1555A>G gene *MTRNR1* e c.313A>G (A/G ou G/G) gene *GSTP1* e dose de CDDP e CBDCA.

Paciente com tratamento de risco sem perda					
	<i>GJB2</i> - c35delG	<i>MTRNR1</i> - c1555A>G	<i>GSTP1</i> -c313A>G (A/G ou G/G)	dose CDDPmg/m <sup>2</sup>	dose CBDCA mg/m <sup>2</sup>
1	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	-	2600,00
2	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	-	3936,00
3	Selvagem	Selvagem	Homozigoto (G/G)	-	1200,00
4	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	-	2980,80
5	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	-	2700,00
6	Selvagem	Selvagem	Homozigoto (G/G)	-	1080,00
7	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	-	900,00
8	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	-	2413,63
9	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	-	868,40
10	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	-	3345,50
11	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	-	1575,00
12	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	-	4846,15
13	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	-	3396,22
14	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	-	2962,18
15	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	-	3591,00
16	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	-	1308,00
17	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	370,64	-
18	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	488,28	-

## Cont/ Quadro 3

Paciente com tratamento de risco sem perda					
	<b>GJB2-c35delG</b>	<b>MTRNR1-c1555A&gt;G</b>	<b>GSTP1-c313A&gt;G</b> (A/G ou G/G)	dose CDDPmg/m2	dose CBDCA mg/m <sup>2</sup>
19	Selvagem	Selvagem	Homozigoto G/G	461,70	-
20	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	1370,96	-
21	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	424,97	-
22	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	236,60	-
23	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	420,00	-
24	Selvagem	Selvagem	Homozigoto (G/G)	165,86	-
25	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	187,50	-
26	35delG/N*	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	500,00	-
27	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	681,50	-
28	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	124,44	-
29	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	467,50	-
30	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	461,40	-
Sem tratamento de risco (sem perda)					
	<b>GJB2-c35delG</b>	<b>MTRNR1-c1555A&gt;G</b>	<b>GSTP1-c313A&gt;G</b> (A/G ou G/G)	dose CDDPmg/m2	dose CBDCA mg/m <sup>2</sup>
31	Selvagem	Selvagem	Homozigoto (G/G)	-	-
32	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	-	-
33	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	-	-
34	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	-	-
35	Selvagem	Selvagem	homozigoto (G/G)	-	-
36	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	-	-
37	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	-	-
38	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	-	-
39	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	-	-
40	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	-	-
41	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	-	-
42	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	-	-

## Cont/ Quadro 3

Pacientes com tratamento de risco e perda auditiva					
	<b>GJB2-c35delG</b>	<b>MTRNR1-c1555A&gt;G</b>	<b>GSTP1-c313A&gt;G (A/G ou G/G)</b>	dose CDDPmg/m <sup>2</sup>	dose CBDCA mg/m <sup>2</sup>
43	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)		4282,00
44	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)		5228,57
45	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)		4895,52
46	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	810,98	
47	Selvagem	Selvagem	Homozigoto (G/G)	370,74	
48	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	620,00	
49	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	1830,00	
50	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	1331,42	
51	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	600,00	
52	Selvagem	Selvagem	Homozigoto (G/G)	664,00	
53	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	600,00	
54	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	358,33	
55	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	447,76	
56	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	400,00	
57	Selvagem	Selvagem	Homozigoto (G/G)	900,00	
58	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	1283,00	
59	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	631,57	
60	Selvagem	Selvagem	Homozigoto (G/G)	720,00	
61	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	480,00	
62	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	798,00	
63	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	412,00	
64	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	648,82	
65	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	1000,00	
66	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	720,00	
67	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	530,00	
68	Selvagem	Selvagem	Homozigoto selvagem(A/A)	617,50	
69	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	900,00	
70	Selvagem	Selvagem	Homozigoto (G/G)	762,00	
71	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	709,67	
72	Selvagem	Selvagem	Homozigoto (G/G)	696,43	
73	Selvagem	Selvagem	Heterozigoto (A/G)	496,00	

**Legenda:** Selvagem =sem alteração

\*35delG/N =variante 35 del G em um dos alelos

**Tabela 7** - Distribuição das Variantes genéticas (c.35delG do gene *GJB2*; m.1555A>G do gene *MTRNR1*; c.A313G no gene *GSTP1*) nos pacientes que realizaram tratamento de risco e sem tratamento de risco.

Gene		Com tratamento de risco (N=61)	Sem tratamento de risco (N=12)
<i>GJB2</i>	Selvagem	60 (98%)	12(100%)
	(c.35delG/N)	1 (2%)	0 (0%)
<i>MTRNR1</i>	Selvagem	61(100%)	12 (100%)
	(m.1555A>G)	0 (0%)	0 (0%)
<i>GSTP1</i>	Selvagem	30 (49%)	5 (42%)
	c. 313A>G (A/G ou G/G)	31 (51%)	7(58%)

No Quadro 3 e Tabela 7 observamos que nenhum paciente apresentou a variante *MTRNR1* m.1555A>G e apenas 1 paciente apresentou a variante *GJB2* - c.35delG em um dos alelos demonstrando se tratar de polimorfismos pouco frequentes e impossibilitando a análise de associação de perda auditiva com as respectivas variantes. Por outro lado, a variante *GPTP1* c. 313A>G (A/G ou G/G) foi frequente tanto no grupo que realizou tratamento de risco (51%) quanto no grupo que não realizou tratamento de risco (58%).

Ao analisamos a associação entre a presença das variantes em relação ao grupo de pacientes que realizaram tratamento de risco com perda e sem perda auditiva observamos que no grupo sem perda auditiva encontramos 50% da amostra com a presença da variante e 50% com genotipagem selvagem, não havendo uma relação estatisticamente significativa entre a presença das variantes *GSTP1*c.313A>G (A/G e G/G) em relação à presença de perda auditiva.

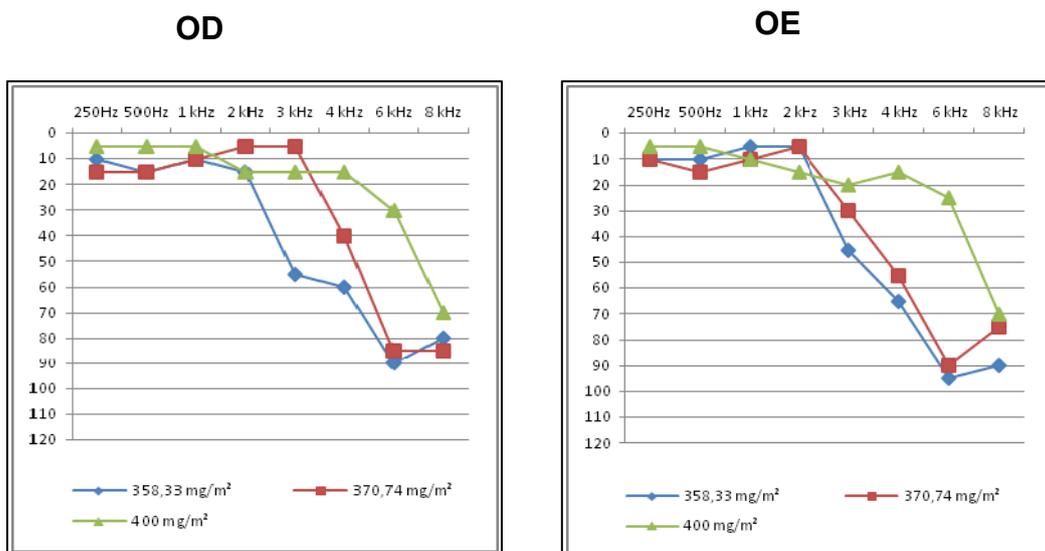
**Tabela 8** - Variantes no gene *GSTP1* encontrados nos pacientes que realizaram tratamento de risco (CDDP ou CBDCA) com e sem perda auditiva

	Com perda N(%)	Sem perda N(%)	p
<b><i>GSTP1</i></b>			
<b>c.313A&gt;G (A/G e G/G)</b>	15 (48)	<b>15 (50)</b>	0,900*
c.313A (selvagem)	16 (52)	15 (50)	
Total	31 (100)	30 (100)	

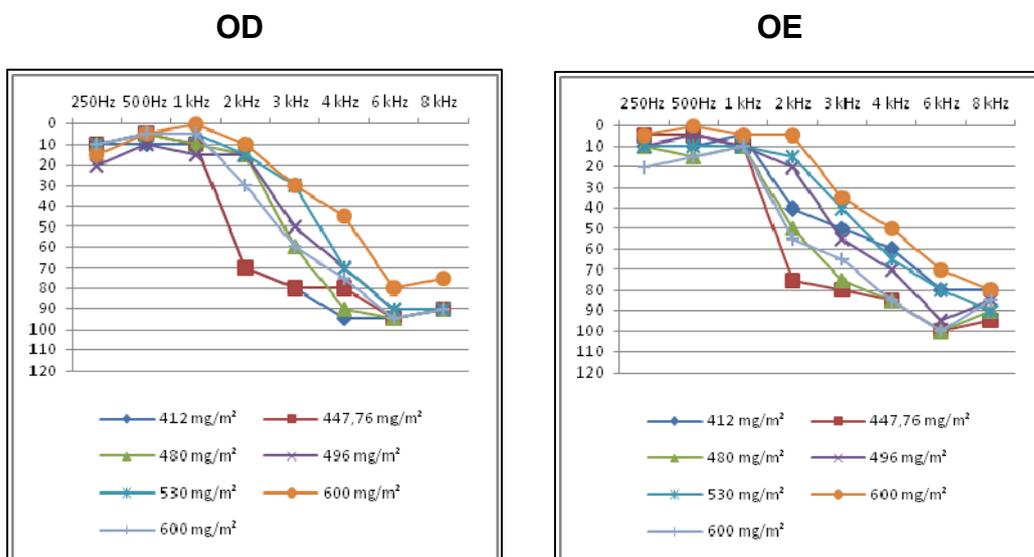
**\*Teste do Qui-quadrado**

RR = 0,97 IC (95%)[ 0,59 – 1,59] OR= 0,94 IC (95%) [0,34 – 2,56]

A observação clínica da perda em relação à dose de CDDP e CBDCA mostrou que o acometimento das frequências da fala ( $\leq 4$  kHz) ocorre em tratamentos com doses inferiores ou superiores a 400 mg/m<sup>2</sup> de CDDP, entretanto, todos os que tomaram mais do 3000 mg/m<sup>2</sup> de CBDCA tiveram perdas com envolvimento nas frequências da fala (Figuras 13 a 18).



**Figura 13** – Audiogramas (orelha direita e esquerda) dos pacientes tratados com dose até 400mg/m<sup>2</sup> de CDDP.



**Figura 14** - Audiogramas dos Pacientes com dose de 401 a 600 mg/m<sup>2</sup> CDDP (orelha direita e esquerda)

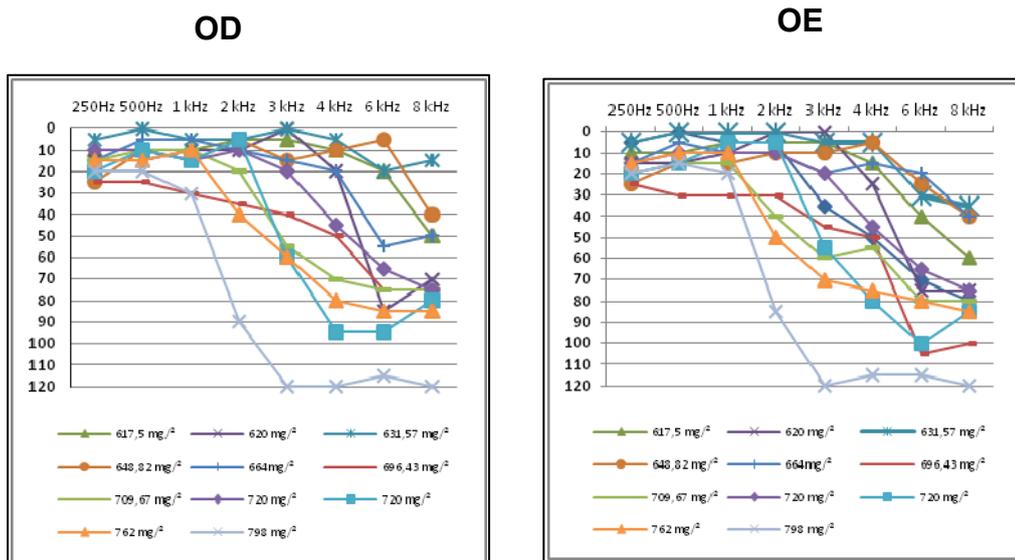


Figura 15 - Audiogramas dos Pacientes com dose de 601 a 800 mg/m<sup>2</sup> CDDP (orelha direita e esquerda).

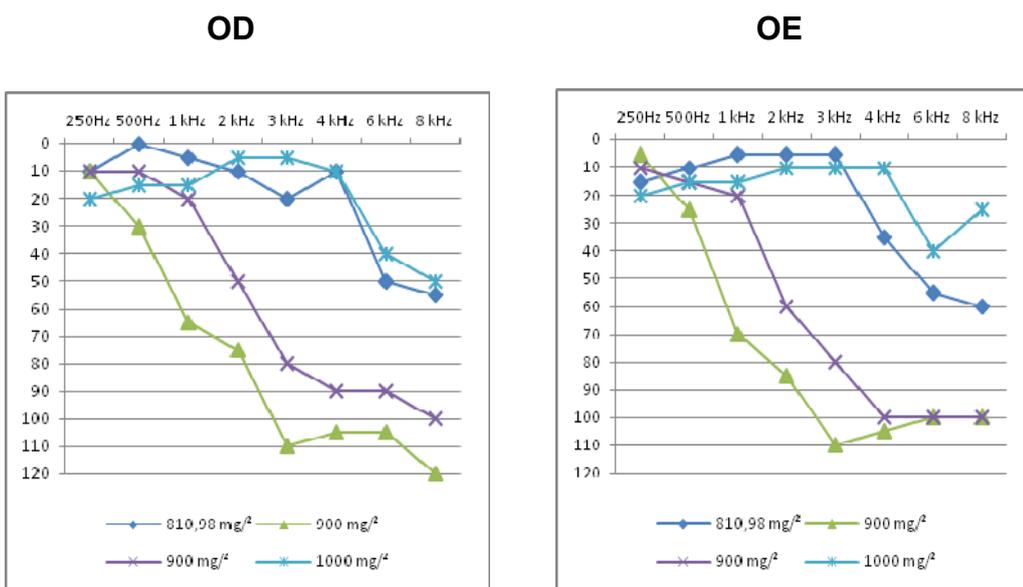
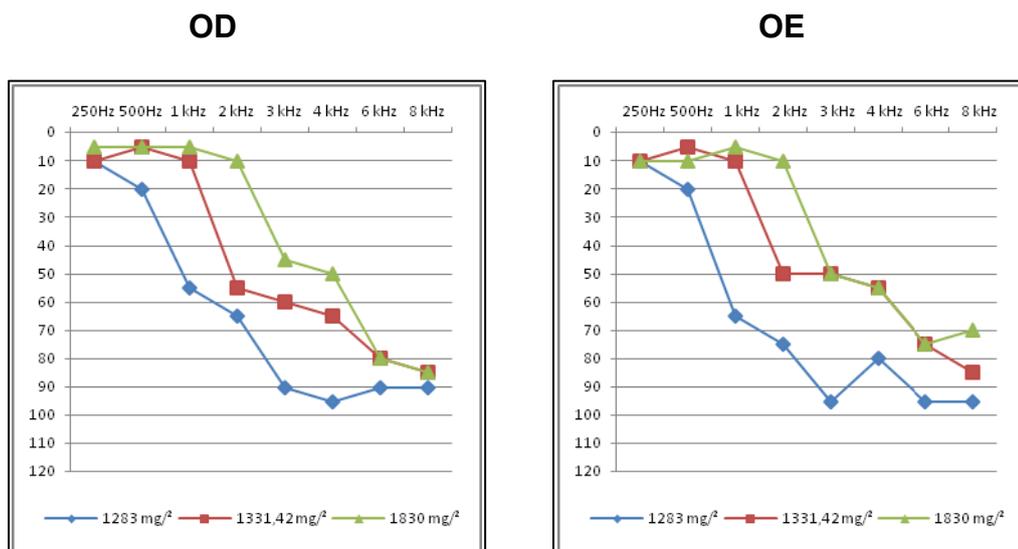
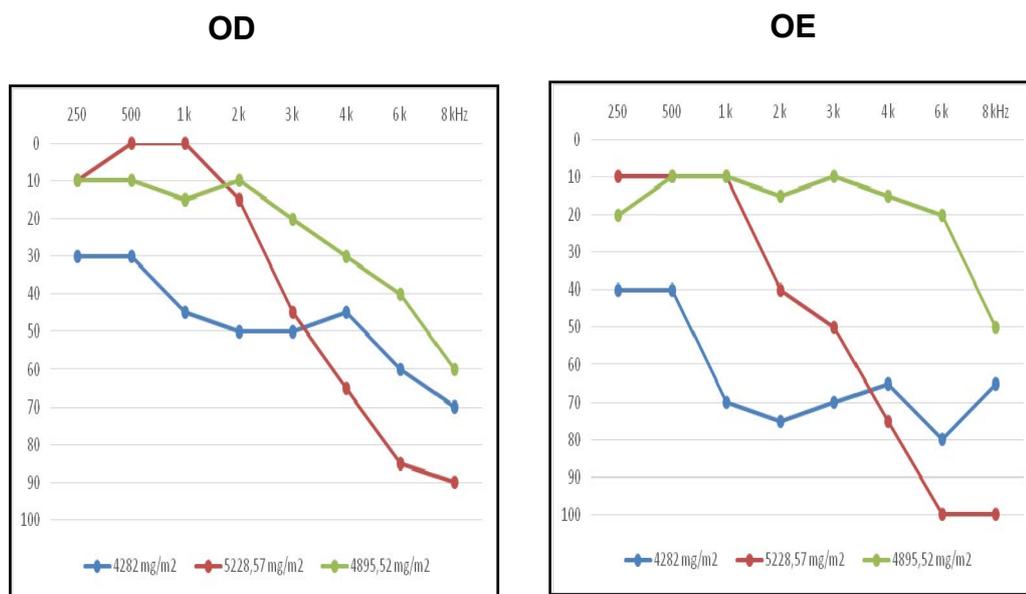


Figura 16 - Audiogramas dos Pacientes com dose de 801 a 1000 mg/m<sup>2</sup> de CDDP (orelha direita e esquerda)



**Figura 17** - Audiogramas dos Pacientes com dose maior que 1000 mg/m<sup>2</sup> de CDDP (orelha direita e esquerda).



**Figura 18** - Audiogramas dos Pacientes com perda auditiva que receberam CBDCA (orelha direita e esquerda).

Observando o resultado dos 31 audiogramas dos pacientes que apresentaram perda auditiva, observamos que 24 (77%) apresentaram acometimento de frequências  $\leq$  4 kHz e 7 (23%) apresentaram

acometimento nas frequências >4kHz (6 e 8 kHz). O acometimento de frequências  $\leq$  4 kHz pode interferir na inteligibilidade da fala, sendo assim é importante analisarmos se existe uma associação entre a presença das variantes genéticas e as frequências acometidas (Tabela 9).

**Tabela 9** - Variantes no gene *GSTP1* encontradas nos pacientes que realizaram tratamento de risco (CBDCA ou CDDP) com perda auditiva em relação a perdas com acometimento de frequências  $\leq$  4 kHz e > 4kHz.

	perda auditiva $\leq$ 4 kHz N (%)	perda auditiva > 4 kHz N (%)	Total N	p
<b><i>GSTP1</i></b>				
<b>c.313A&gt;G (A/G e G/G)</b>	15(94)	1 (6)	16 (100)	<b>p=0,02</b>
<b>c.313A (selvagem)</b>	<b>9 (60)</b>	<b>6 (40)</b>	<b>15 (100)</b>	

**\*Teste do Qui-quadrado**

OR =10,0 IC (95%) [1.03 - 97.1]

RR = 1,56 IC (95%) [1.01 – 2.40]

Na Tabela 9, podemos observar nos pacientes que realizaram tratamento de risco e tiveram perdas auditivas, que 16 pacientes apresentaram a variante c.313A>G (A/G e G/G) e 15 a variante selvagem. Dos pacientes que apresentaram a variante c.313A>G (A/G e G/G) 15 (94%) tiveram perda auditiva em frequências  $\leq$  4 kHz enquanto que 6 (40%) apresentaram a variante selvagem e tiveram perda em frequências > 4 kHz. Podemos inferir que a presença da variante c.313A>G (A/G G/G) no gene *GSTP1* confere um risco 10 vezes maior de desenvolver perdas auditivas em frequências  $\leq$  4 kHz, (p=0,02 OR=10,0) IC (95%)[ 1,03 – 97,1]RR=1.56 IC (95%) [1,01 – 2.40)].

Com intuito de investigar as diversas variáveis (idade ao diagnóstico, gênero, variantes do gene *GSTP1*, CBDCA e CDDP) utilizamos a análise de regressão logística (Tabela 10). Ao estudar o impacto do uso de CDDP, considerando pacientes que não usaram CDDP como categoria zero, encontramos 10 vezes maior chance de adquirir perda auditiva. A idade ao diagnóstico, gênero, variantes do gene *GSTP1* e tratamento com CBDCA não mostraram papel de significância para risco para perda auditiva.

**Tabela 10** - Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão logística ajustado aos dados.

Regressão Logística						
	Estimativa	Erro padrão	P	Odds ratio	O.R.(95%)	
					Inferior	superior
Grupo CDDP	<b>2,367</b>	<b>0,709</b>	<b>0,001</b>	<b>10,667</b>	<b>2,657</b>	<b>42,826</b>

Variáveis: idade ao diagnóstico, gênero, variantes do gene *GSTP1*, CBDCA e CDDP.

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho estudamos a influência das variantes genética na susceptibilidade à perda auditiva em pacientes jovens tratados de câncer na infância, submetidos a tratamento com derivados da platina (CBDCA e CDDP).

Em nossa casuística, os pacientes que não realizaram tratamento de risco para a audição apresentaram exames com limiares dentro dos padrões de normalidade. Enquanto que nos pacientes que fizeram uso de CDDP e CBDCA houve um predomínio de perda auditiva neurosensorial simétrica bilateral nas frequências de 3, 4, 6 e 8kHz (Figura 1), indicando que a perda auditiva foi devido ao tratamento. Em um trabalho anterior com crianças que tiveram câncer na infância e se encontravam fora de tratamento pudemos constatar que perdas auditivas em frequências  $\leq 4$  kHz interferem na inteligibilidade da fala prejudicando a comunicação LIBERMAN et al. (2013).

Com base nestes dados podemos inferir que é importante não somente se atentar a presença ou não da perda auditiva mas sim as frequências que estão sendo acometidas para que esta perda não prejudique o desenvolvimento de linguagem deste paciente.

Levando em consideração somente a perda auditiva em decorrência da exposição a tratamentos de risco, observamos que no grupo de pacientes que receberam CDDP, 28 pacientes (66,6%) apresentaram perda auditiva contra 14 (33,3%) que não apresentaram de acordo com o critério utilizado

em nosso trabalho (perda auditiva quando os limiares são > 25 dB nas frequências de 250 a 8k Hz). Vários estudos mencionaram a variação da incidência de perda auditiva com CDDP, de 13% a 96% (LI et al. 2004; KNIGHT et al. 2007; BROCK et al. 2012; EIAMPRAPAI et al. 2012; YANCEY et al. 2012; NITZ et al. 2013) e relataram que esta variação depende da dose recebida e dos critérios de classificação da ototoxicidades utilizados. PELEVA et al. (2014) relataram que a variação da incidência da perda auditiva encontrada nos estudos foi devida aos diferentes critérios de classificação da ototoxicidade utilizado. Ele encontrou 48% de ototoxicidade usando o critério da *American Speech Language Hearing Association-ASHA* (1994) (aumento de 20dB em apenas uma frequência, 10dB em duas frequências seguidas ou 5 dB em três frequências consecutivas em relação a avaliação prévia) e 30% utilizando a classificação de CHANG e CHINOSORNVATANA (2010) (a partir do grau 2a foi considerado uma perda clinicamente significativa) (Anexo 5) para os pacientes que receberam CDDP.

Na nossa amostra a dose média recebida de CDDP nos pacientes com perda auditiva foi significativamente maior que a dose recebida pelos pacientes sem perda (726,1 (323,0) mg/m<sup>2</sup> vs 453,9 (308,6) mg/m<sup>2</sup>, p=0.002) (Tabela 4). A dose de risco para perda auditiva identificada na nossa casuística foi 492mg/m<sup>2</sup> (Figura 11). Utilizando o critério da literatura YANCEY et al. (2012), observamos na tabela 5 que pacientes que receberam doses ≥ 400mg/m<sup>2</sup> apresentaram risco de desenvolver perda auditiva 7,22 vezes maior OR=7.22 IC(95%)[1.19 – 44.0], p=0,01. Na

regressão logística, o uso de CDDP apresentou 10 vezes maior risco para desenvolver perda auditiva comparada com os pacientes que não usaram CDDP.

Em relação aos pacientes que realizaram tratamento com CBDCA encontramos 3 pacientes (15,7%) com perda auditiva, com dose média significativamente maior e 16 pacientes sem perda auditiva. BERTOLINI et al. (2004) e LAMBERT et al. (2008) não encontraram perdas auditivas nos pacientes tratados com CBDCA, enquanto JEHANNE et al. (2009), QADDOUMI et al. (2012) e PELEVA et al. (2014) relataram incidência de perda auditiva de 4,5%, 7,0% e 20,0% respectivamente.

Na nossa amostra a dose média recebida de CBDCA nos pacientes com perda auditiva foi significativamente maior (4802,0 (479,9) mg/m<sup>2</sup>) que a dose recebida pelos pacientes sem perda (2481,0 (1210,0) mg/m<sup>2</sup>,  $p = 0.001$ ). LAMBERT et al. (2008), BERTOLINI et al. (2004) não encontraram perdas auditivas nos pacientes tratados com CBDCA enquanto JEHANNE et al. (2009), QADDOUMI et al. (2012) e PELEVA et al. (2014), relataram incidência de perda auditiva de 4,5%, 7,0% e 20,0% com doses médias de CBDCA de 2880mg/m<sup>2</sup>, 2581 ± 1970 mg/m<sup>2</sup>, 3850mg/m<sup>2</sup> (variando de 2580 a 4480mg/m<sup>2</sup>) respectivamente. Como não existe um consenso na literatura em relação a dose de risco de CBDCA utilizamos a dose de 3000mg/m<sup>2</sup> para analisar o risco, pois esta é aproximadamente a dose média encontrada na nossa casuística. Como a ocorrência de perda auditiva induzida pela CBDCA foi muito pequena na nossa amostra (3 pacientes 15,7%) não foi possível calcular a dose de risco. Baseado neste dado, observamos que os

pacientes que utilizaram doses de CBDCA < 3000 mg/m<sup>2</sup> apresentaram um risco 14,64 vezes menor de desenvolver perda auditiva OR=14,64 IC (95%)[0,63 – 335,9], p=0,02.

Como observado nos nossos dados, apesar de existir uma associação significativa entre a dose de derivados da platina e perda auditiva, nove pacientes no grupo que receberam CDDP com doses  $\geq$  400mg/m<sup>2</sup> e 2 pacientes que receberam doses < 400mg/m<sup>2</sup> apresentaram perda auditiva. Da mesma maneira observamos 5 pacientes que receberam dose de CBDCA  $\geq$  de 3000mg/m<sup>2</sup> que não apresentaram perda auditiva. Isso sugere que outros fatores além da dose CDDP e CBDCA podem estar contribuindo para a manifestação da perda auditiva. Nesse sentido o estudo do envolvimento genético na susceptibilidade (ou proteção) da ototoxicidade pode contribuir para a compreensão nestes casos. Então buscamos na literatura algumas variantes que pudessem justificar essas variações no estudo. Analisamos as variantes *MT-RNR1* c.1555A>G, que está associada a ototoxicidade dos aminoglicosídeos, *GJB2*- c35del G, que está associado a perdas auditivas neurosensoriais e *GSTP1*-c.313A>G, que está associado a detoxificação de produtos na reação oxidativa.

Na nossa casuística nenhum paciente apresentou a variante *MT-RNR1* c.1555A>G e apenas 1 paciente apresentou a variante *GJB2* - c35delG em 1 dos alelos (2%) sugerindo que estas variantes são raras na nossa população. Em concordância com nossos dados, KNOLL et al. (2006) pesquisaram variantes nos genes *GJB2* e *SLC26A4*, assim como rastrearam três variantes do mtDNA *MTRNR1*-m.1555A>G, *MTTL1*-m.3243 A>G e

*MTTS1*- m.7445 A>G em pacientes com história de câncer na infância, que desenvolveram perda auditiva severa com doses cumulativas inferiores a 400mg/m<sup>2</sup> de CDDP. Observaram que, com exceção de um paciente (9.1%) que tinha a mutação do *GJB2*-35delG, nenhum outro alelo mutante foi encontrado e nenhuma variante mitocondrial foi encontrada. Os autores mencionaram como não provável a relação das variantes estudadas com a ototoxicidade da cisplatina, considerando-se a prevalência da mutação *GJB2*-35delG na população geral ser 2,5%. PETERS et al. (2003) estudaram variantes mitocondriais de 39 pacientes que receberam CDDP, sendo 20 (51,2%) com perda auditiva e 19 (48,8) sem perda auditiva. As variantes estudadas foram A7445G, 7472insC e A1555G e não conseguiram demonstrar que estas variantes genéticas tivessem alguma ação protetora ou de risco para perda auditiva em pacientes com uso de CDDP.

Por outro lado, podemos notar na Tabela 7 que a variante *GSTP1*-c.313A>G (A/G e G/G) foi bastante frequente na nossa casuística (51% no grupo que realizou tratamento de risco e 58 para o grupo sem tratamento de risco) porém a presença desta variante não foi fator de risco para perda auditiva (p=0,900) (Tabela 8). Apesar de não haver fator de risco identificável destas variantes para perda auditiva quando relacionamos a presença da variante *GSTP1*-c.313A>G (A/G,G/G) com a abrangência da perda (perda em frequências ≤ 4kHz e perdas em frequências >4kHz) observamos que os pacientes com a presença das variantes *GSTP1*-c.313A>G (A/G, G/G) apresentaram risco 10 vezes maior de adquirir perdas ≤ 4kHz (p=0,002 [OR=10.0 (IC 95% - 1.03 – 97.1) RR=1.56 (IC 95% - 1.01 –

2.40)]. PETERS et al. (2000) investigaram a associação entre risco de perda auditiva após tratamento com CDDP e polimorfismos em 5 genes da glutathione S Transferase (GST) (GSTM1, GSTM3, GSTT1, GSTP1, GSTZ1) e não encontraram evidências que a variação genética em um dos GSTs analisados esteja ligado a predisposição da ototoxicidade da CDDP. Enquanto OLDENBURG et al. (2007) em estudo retrospectivo com 173 pacientes tratados de câncer no testículo, investigaram a associação entre perda auditiva induzida pela CDDP e polimorfismo em *GSTT1*, *GSTP1* e *GSTM1*. Os pacientes receberam dose cumulativa média de 400mg/m<sup>2</sup>. No gene *GSTT1* e *GSTM1* são conhecidas deleções homozigóticas que levam a enzimas não funcionais. O SNP entre A e G no gene *GSTP1* leva a alteração no códon 105 da sequência da proteína de Ile ou Val no códon 105. Os resultados refletem o efeito protetor do genótipo *GSTP1*<sup>105</sup> Val/<sup>105</sup> *GSTP1*. Portadores da variante, <sup>105</sup> Ile/<sup>105</sup> Ile *GSTP1* tem habilidade auditiva significante inferior, ou seja, aumento da susceptibilidade a ototoxicidade induzida pela CDDP.

REDNAN et al. (2013) investigaram a variante *GSTP1*-c.313A>G (A/G, G/G) em pacientes tratados com CDDP e radioterapia em SNC. Apesar de estudar outros agentes agressores para a cóclea, CDDP associada a radioterapia, encontraram em seu trabalho resultados similares ao nosso, os pacientes com variantes com a variante *GSTP1*-c.313A>G (Hetero e Homo) apresentaram maior risco para perdas auditivas severas em relação aos pacientes com genótipo selvagem A/A.

Como mencionado anteriormente, as perdas auditivas em frequências  $\leq 4\text{kHz}$  quando ocorre antes dos três ou quatro anos de idade podem interferir no desenvolvimento de linguagem prejudicando a inteligibilidade e produção da fala (LIBERMAN et al. 2013). Podemos observar no audiograma (Anexo 4) que o fonema “f” e “p” apresentam picos de frequência diferentes, o espectro acústico do fonema “f” é 15dB em torno de 6kHz enquanto o fonema “p” é 25dB em torno 500Hz. Sendo assim, é importante que a criança possa escutar todos os sons e reconheça as diferenças entre os sons da fala. O impacto de uma deficiência é bastante grande e pode ser minimizado com a realização da avaliação auditiva prévia, durante e após o tratamento. Com os resultados do nosso estudo, que pacientes que apresentaram a variante *GSTP1-c.313A>G* (A/G, G/G) apresentaram risco 10 vezes maior de adquirir perdas  $\leq 4\text{kHz}$  ( $p=0,002$  [OR=10.0 (IC 95% - 1.03 – 97.1) RR=1.56 (IC 95% - 1.01 – 2.40)]), será possível através da avaliação desta variante em conjunto com a monitorização auditiva e o acompanhamento do oncologista, evitar que a perda auditiva atinja frequências  $\leq 4\text{kHz}$  minimizando a perda auditiva e o impacto desta na vida do indivíduo.

## 6 CONCLUSÃO

- A ocorrência de perda auditiva nos pacientes que receberam CDDP foi 66,6% enquanto que nos pacientes que receberam CBDCA foi 15,7%, com associação entre dose de CDDP e CBDCA e perda auditiva sendo a dose de risco para perda auditiva com uso de CDDP de 492,1mg/m<sup>2</sup>.
- Não foram encontradas as variantes *GJB2-35delG* e *MT-RNR1-m.1555A>G* nos pacientes avaliados, e não houve associação da presença da variante *GSTP1-c.313A>G* e a perda auditiva. Entretanto, os pacientes com a variante *GSTP1-c.313A>G* (A/G e G/G) apresentaram maior risco (**OR=10.0 (IC95% -1.03-97.1)**) para adquirirem perdas que interferem na inteligibilidade de fala ( $\leq$  4kHz).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu-Silva RS, Lezirovitz K, Braga MC, et al. Prevalence of the A1555G (12S rRNA) and tRNASer(UCN) mitochondrial mutations in hearing-impaired Brazilian patients. **Braz J Med Biol Res** 2006; 39:219-26.

Anderson S, Bankier AT, Barrel BG, et al. Sequence and organization of the mitochondrial genome. **Nature** 1981; 290:457-65.

[ASHA] American Speech Language Hearing Association. **Audiologic management of individuals receiving cochleotoxic drug therapy [Guidelines]**. Published 1994. Available from: <URL:<http://www.asha.org/policy/GL1994-00003>> [2015 April 20]

Batissoco AC, Abreu-Silva RS, Braga MC, et al. Prevalence of GJB2 (connexin-26) and GJB6(connexin-30) mutations in a cohort of 300 Brazilian hearing-impaired individuals: implications for diagnosis and genetic counseling. **Ear Hear** 2009; 30:1-7.

Bertolini P, Lassalle M, Mercier G, et al. Platinum compound-related ototoxicity in children: long-term follow-up reveals continuous worsening of hearing loss. **J Pediatr Hematol Oncol** 2004; 26:649-55.

Brock PR, Knight KR, Freyer DR, et al. Platinum-induced ototoxicity in children: a consensus review on mechanisms, predisposition, and protection, including a new International Society of Pediatric Oncology Boston ototoxicity scale. **J Clin Oncol** 2012; 30:2408-17.

[BIAP] Bureau International d'Audio Phonologie. **Audiometric (BIAP) classification of hearing impairment: recommendation 02/1**. 1996. <URL:[http://www.biap.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5:recommandation-biap-021-bis&catid=65:ct-2-classification-des-surdites&Itemid=19&lang=en](http://www.biap.org/index.php?option=com_content&view=article&id=5:recommandation-biap-021-bis&catid=65:ct-2-classification-des-surdites&Itemid=19&lang=en)> [2015 jun 11]

Campos AH, Silva AA, Mota LD, et al. The value of a tumor bank in the development of cancer research in Brazil: 13 years of experience at the A.C.Camargo Hospital. **Biopreserv Biobank** 2012; 10:168-73.

Carvalho MFP, Ribeiro FAQ. As deficiências auditivas relacionadas às alterações do DNA mitocondrial. **Rev Bras Otorrinolaringol** 2002; 68:268-75.

Chang KW, Chinosornvatana N. Practical grading system for evaluating cisplatin ototoxicity in children. **J Clin Oncol** 2010; 28:1788-95.

Cohn ES, Kelley PM. Clinical phenotype and mutations in connexin 26 (DFNB1/GJB2), the most common cause of childhood hearing loss. **Am J Med Genet** 1999; 89:130-6.

Cohn ES, Kelley PM, Fowler TW, et al. Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (GJB2/DFNB1). **Pediatrics** 1999; 103:546-50.

Del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, DelCastillo FJ, et al. Prevalence and Evolutionary origins of the del(*GJB6-D13S1830*) mutation in the *DFNB1 locus* in hearing impairment subjects: a multicenter study. **Am J Hum Genet** 2003; 73:1452-8.

Denoyelle F, Weil D, Maw MA, et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 35delG mutation in the connexin 26 gene. **Hum Mol Genet** 1997; 6:2173-77.

Eiamprapai P, Yamamoto N, Hiraumi H, et al. Effect of cisplatin on distortion product otoacoustic emissions in Japanese patients. **Laryngoscope** 2012; 122:1392-6.

Estivill X, Govea N, Barcelo E et al. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. **Am J Hum Genet** 1998; 62 27-35.

Finsterer J, Fellingner J. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol** 2005; 69:621-49.

Friedman LM, Dror AA, Avraham KB. Mouse models to study inner ear development and hereditary hearing loss. **Int J Dev Biol** 2007; 51:609-631.

Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. A biochemical basis for the inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. **Hum Mol Genet** 2000; 9:1787-93.

Xu H, Robinson GW, Huang J, Lim JY, Zhang H, Bass JK, Broniscer A, Chintagumpala M, Bartels U, Gururangan S, Hassall T, Fisher M, Cohn R, Yamashita T, Teitz T, Zuo J, Onar-Thomas A, Gajjar A, Stewart CF, Yang JJ. Common variants in ACYP2 influence susceptibility to cisplatin-induced hearing loss. **Nat Genet.** 2015 Mar;47(3):263-6.

Hyppolito MA, Oliveira JAA. Ototoxicity, otoprotection and self defense of the cochlear outer hair cells. **Medicina (Ribeirão Preto)** 2005; 38:279-89.

Hu X, Xia H, Srivastava SK, et al. Catalytic efficiencies of allelic variants of human glutathione S-transferase P1-1 toward carcinogenic anti-diol epoxides of benzo[c] phenanthrene and benzo[g]chrysene. **Cancer Res** 1998; 58:5340-3.

Jehanne M, Lumbroso-Le Rouic L, Savignoni A, et al. Analysis of ototoxicity in young children receiving carboplatin in the context of conservative management of unilateral or bilateral retinoblastoma. **Pediatr Blood Cancer** 2009; 52:637-43.

Jerger, J. Clinical experience with impedance audiometry. **Arch Otolaryngol**, Oct;92(4):311-24, 1970. J

Katzenstein HM, Chang KW, Krailo M, et al. Amifostine does not prevent platinum-induced hearing loss associated with the treatment of children with hepatoblastoma: a report of the Intergroup Hepatoblastoma Study P9645 as a part of the Children's Oncology Group. **Cancer** 2009; 115:5828-35.

Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. **Nature** 1997; 387:80-3.

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; 33:51-6.

Knight KR, Kraemer DF, Winter C, Neuwelt EA. 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.

Knoll C, Smith RJ, Shores C, Blatt J. Hearing genes and cisplatin deafness: a pilot study. **Laryngoscope** 2006; 116:72-4.

Kurk M. The cochlear amplifier. **Int Arch Otorhinolaryngol** [periódico on line] 1999; 3(2). Disponível em: <URL:[http://www.internationalarchivesent.org/additional/acervo\\_port.asp?Id=83](http://www.internationalarchivesent.org/additional/acervo_port.asp?Id=83)> [2015 jun 12]

Langer T, am Zehnhoff-Dinnesen A, Radtke S, Meitert J, Zolk O. Understanding platinum-induced ototoxicity. **Trends Pharmacol Sci** 2013; 34:458-69.

Lambert MP, Shields C, Meadows AT. A retrospective review of hearing in children with retinoblastoma treated with carboplatin-based chemotherapy. **Pediatr Blood Cancer** 2008; 50:223-6.

Li Y, Womer RB, Silber JH. Predicting cisplatin ototoxicity in children: the influence of age and the cumulative dose. **Eur J Cancer** 2004; 40:2445-51.

Liberman PHP, Schultz C, Gomez MV, et al. Auditory effects after organ preservation protocol for laryngeal/hypopharyngeal carcinomas. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2004; 130:1265-8.

Liberman PH. **Avaliação auditiva em pacientes tratados de câncer na infância**. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Liberman PHP, Goffi-Gomez MVS, Schultz C, Lopes LF. Quais as frequências audiométricas acometidas são responsáveis pela queixa auditiva nas disacusias por ototoxicidade após o tratamento oncológico? **Arq Int Otorrinolaringol** 2012; 16:26-31.

Liberman PHP, Schultz C, Goffi-Gomez MV, Lopes LF. Speech recognition and frequency of hearing loss in patients treated for cancer in childhood. **Pediatr Blood Cancer** 2013; 60:1709-13.

Mukherjea D, Rybak LP. Pharmacogenomics of cisplatin-induced ototoxicity. **Pharmacogenomics** 2011; 12:1039-50.

Nitz A, Kontopantelis E, Bielack S, et al. Prospective evaluation of cisplatin- and carboplatin-mediated ototoxicity in paediatric and adult soft tissue and osteosarcoma patients. **Oncol Lett** 2013; 5:311-5.

Northern JL, Gabbard SA. The acoustic reflex. In: Katz J, editor. **Handbook of clinical audiology**. 4<sup>th</sup> ed. Baltimore: William & Wilkins; 1994. p.300-16.

Oldenburg J, Kraggerud SM, Cvancarova M, Lothe RA, Fossa SD. Cisplatin-induced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione s-transferase genotypes in testicular cancer survivors. **J Clin Oncol** 2007; 25:708-14.

Pecora Liberman PH, Schultz C, Goffi-Gómez MVS, Antoneli CB, Chojniak MMN, Novaes PE. Evaluation of ototoxicity in children treated for retinoblastoma: preliminary results of a systematic audiological evaluation. **Clin Transl Oncol** 2011; 13:348-52.

Pedalini MEB, Cruz OLM, Bensadon RL. Aspectos audiológicos na radioterapia, na quimioterapia em tumores do ângulo ponto cerebelar. In: Carrara-Angelis E, Furia CLB, Mourão LF, Kowalski LP, editores. **Atuação da fonoaudiologia no câncer de cabeça e pescoço**. São Paulo: Editora Lovise; 2000. p.273-82.

Peleva E, Emami N, Alzahrani M, et al. Incidence of platinum-induced ototoxicity in pediatric patients in Quebec. **Pediatr Blood Cancer** 2014; 61:2012-7.

Poirrier AL, Pincemail J, van den Ackerveken P, Lefebvre PP, Malgrange B. Oxidative stress in the cochlea: an update. **Curr Med Chem** 2010; 17:3591-604.

Peters U, Preisler-Adams S, Hebeisen A, et al. Glutathione S-transferase genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. **Anticancer Drugs** 2000; 11:639-43.

Peters U, Preisler-Adams S, Lanvers-Kaminsky C, Jürgens H, Lamprecht-Dinnesen A. Sequence variations of mitochondrial DNA and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. **Anticancer Res** 2003; 23:1249-55.

Qaddoumi I, Bass JK, Wu J, et al. Carboplatin-associated ototoxicity in children with retinoblastoma. **J Clin Oncol** 2012; 30:1034-41.

Rednam S, Scheurer ME, Adesina A, Lau CC, Okcu MF. Glutathione S-transferase P1 single nucleotide polymorphism predicts permanent ototoxicity in children with medulloblastoma. **Pediatr Blood Cancer** 2013; 60:593-8.

Riedemann L, Lanvers C, Deuster D, Peters U, Boos J, Jürgens H, Zehnhoff-Dinnesen A. Megalin genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Pharmacogenomics J*. 2008 Feb;8(1):23-8.

Rybak LP. Ototoxicity and antineoplastic drugs. **Otolaryngol Head Neck Surg** 1999; 7:239-43.

Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. **Tonoku J Exp Med** 2009; 219:177-86.

Sartorato EL, Gottardi E, Oliveira CA, et al. Determination of carrier frequency of the 35delG mutation in Brazilian neonates. **Clin Genet** 2000; 58:339.

Schultz C, Goffi-Gomez MV, Liberman PH, Carvalho AL. Report on hearing loss in oncology. **Braz J Otorhinolaryngol** 2009; 75:634-41.

Silvan S, Silverman CA. **Auditory diagnosis: principles and applications**. San Diego: Academic Press; 1997. Basic audiologic testing; p.44-52.

Schochat E. Percepção da fala em perdas auditivas neurossensoriais. In: Lichtig I, Carvallo RMM, editores. **Audição: abordagens atuais**. São Paulo: Pró-Fono; 1997. p.223-35.

Scott DA, Kraft ML, Carmi R, et al. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. **Hum Mutat** 1998; 11:387-94.

Skinner MW. The hearing of speech during language acquisition. **Otolaryngol Clin North Am** 1978; 11:631-50.

Testa JRG, Liberman PP, Gomez MVSG. Complicações otorrinolaringológicas do tratamento oncológico. In: Kowalski LP, Anelli A, Salvajoli JV, Lopes LP, editores. **Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia**. 2ª ed. São Paulo: Âmbito Editores; 2002. p.395-7.

Thomas JP, Lautermann J, Liedert B, Seiler F, Thomale J. High accumulation of platinum-DNA adducts in strial marginal cells of the cochlea is an early event in cisplatin but not carboplatin ototoxicity. **Mol Pharmacol** 2006; 70:23-9.

van Camp G, Smith RJH. **Hereditary hearing loss homepage**. Available from: <URL:<http://hereditaryhearingloss.org>> [2013 ago 3].

Yancey A, Harris MS, Egbelakin A, Gilbert J, Pisoni DB, Renbarger J. Risk factors for cisplatin-associated ototoxicity in pediatric oncology patients. **Pediatr Blood Cancer** 2012; 59:144-8.

Yantis PA. Pure air-conduction threshold testing. In: Katz J, editor. **Handbook of clinical audiology**. 4<sup>th</sup> ed. Baltimore: William & Wilkins; 1994. p.97-108.

Zhao H, Li R, Wang Q, et al. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. **Am J Hum Genet** 2004; 74:139-52.

Zuur CL, Simis YJ, Lansdaal PE, et al. Ototoxicity in a randomized phase III trial of intra-arterial compared with intravenous cisplatin chemoradiation in patients with locally advanced head and neck cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:3759-6.

Zemlin WR. **Princípios de anatomia e fisiologia em fonoaudiologia**. 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2000. Audição; p.432-94.

Wilcox SA, Saunders K, Osborn AH, et al. High frequency hearing loss correlated with mutations in the *GJB2* Gene. **Hum Genet** 2000; 106:399-405.

***ANEXOS***

---

## Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 04 de Agosto de 2008.

À  
**Patrícia Helena Pecora Liberman**

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº 1020/07**  
**“Relação entre perda auditiva e alterações genéticas em pacientes com câncer na infância”.**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, reiteram a aprovação do estudo em referência em sua última reunião de 11/12/2007 e de acordo com o Ofício nº 1014 CONEP/CNS/MS, informa que esta pesquisa da área de Genética humana, não se enquadra no item VI.3 da Res. CNS 340/04, devendo o CEP cumprir o disposto no item VI.5 da mesma resolução.

Assim sendo, informamos que esta pesquisa já pode ser iniciada, não necessitando da aprovação da CONEP.

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 6 meses.**

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**  
**Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

## **Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão 1)**

### **Título do Projeto: Relação entre perda auditiva e alterações genéticas em pacientes com câncer na infância**

A capacidade de ouvir (audição) é uma das funções mais importantes do ser humano por representar o canal direto de comunicação através da fala. As perdas de audição independente do grau interferem diretamente neste processo.

Este trabalho pretende estudar a ocorrência ou não da perda auditiva em pacientes tratados de câncer na infância, que tenham recebido tratamento quimioterápico com drogas que possam prejudicar a sua audição, ou que realizaram outros tratamentos sem risco para a audição.

Pretende também avaliar a característica da perda auditiva em pacientes oncológicos fora de tratamento e sua relação com alterações genéticas ligadas a deficiência auditiva.

**Estamos solicitando sua participação neste estudo e após ler este documento tem a total liberdade de não aceitar. Caso seja menor de 18 anos pedimos que seu pai ou responsável autorize.**

Sua participação no estudo auxiliará o melhor conhecimento das consequências do tratamento sobre a audição.

Antes da avaliação audiológica, todos os pacientes serão avaliados pelo pediatra que realizará otoscopia afastando alterações de orelha externa e média prévias.

Em seguida será realizada a avaliação audiológica completa, que consiste de exames simples, não invasivos, não dolorosos, tomando em média de 50 minutos por paciente testado. Para a avaliação da audição serão usados testes para medir a audição (audiometria tonal limiar e audiometria vocal), testes para avaliar a movimentação da orelha média (imitanciométrica), testes para avaliar as células ciliadas na orelha interna (emissões otoacústicas) e teste que avalia a via auditiva desde o nervo auditivo até o tronco encefálico (potencial evocado auditivo do tronco encefálico). Assim como será coletada 5ml de sangue para estudo genético que justifique a possível alteração auditiva.

A coleta é rápida, você sentirá apenas uma leve “picada”. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois, em geral essa coleta será realizada pela veia do braço, por profissional treinado e devidamente habilitado para realizá-la. O DNA será extraído do sangue e serão analisadas as mutações nos genes nucleares *GSTP1* *GJB2* e no gene mitocondrial *MT-RNR1*.

Caso você tenha interesse, poderá receber o resultado dos exames no próximo retorno ao hospital.

**Nenhum dos procedimentos realizados confere risco aos indivíduos que participarão do estudo.**

**Não haverá ressarcimento, pois, a avaliação auditiva e a coleta de sangue serão realizadas no mesmo dia da consulta médica.**

Os dados coletados serão posteriormente divulgados exclusivamente para fins científicos, sendo mantido total sigilo na identificação de todos os pacientes.

Havendo qualquer dúvida durante a realização da pesquisa você ou responsável deve entrar em contato com o setor de Audiologia, com a fonoaudióloga Patrícia Helena Pecora Liberman, pelos telefones 21895123 ou 21895124. Se o pesquisador principal não fornecer as informações / esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o coordenador do Comitê de Ética do Hospital A.C.Camargo-SP, pelo telefone 2189-5020.

Você foi informado da natureza do estudo e assinando o termo de consentimento estará confirmando sua participação.

**Entendi o que foi exposto, aceito a participação neste estudo.**

Data

---

Nome do paciente ou responsável/assinatura/ RG:

---

Nome do investigador/Assinatura

---

Assinatura da testemunha

### Anexo 3 - Extração de DNA de sangue periférico

Separação de linfócitos por te ph 8,0  
(*buffycoat*)

Transferir o sangue do *vacuumtainer* para um tubo de 50mL e completar com TE (pH 8,0) até 40mL;

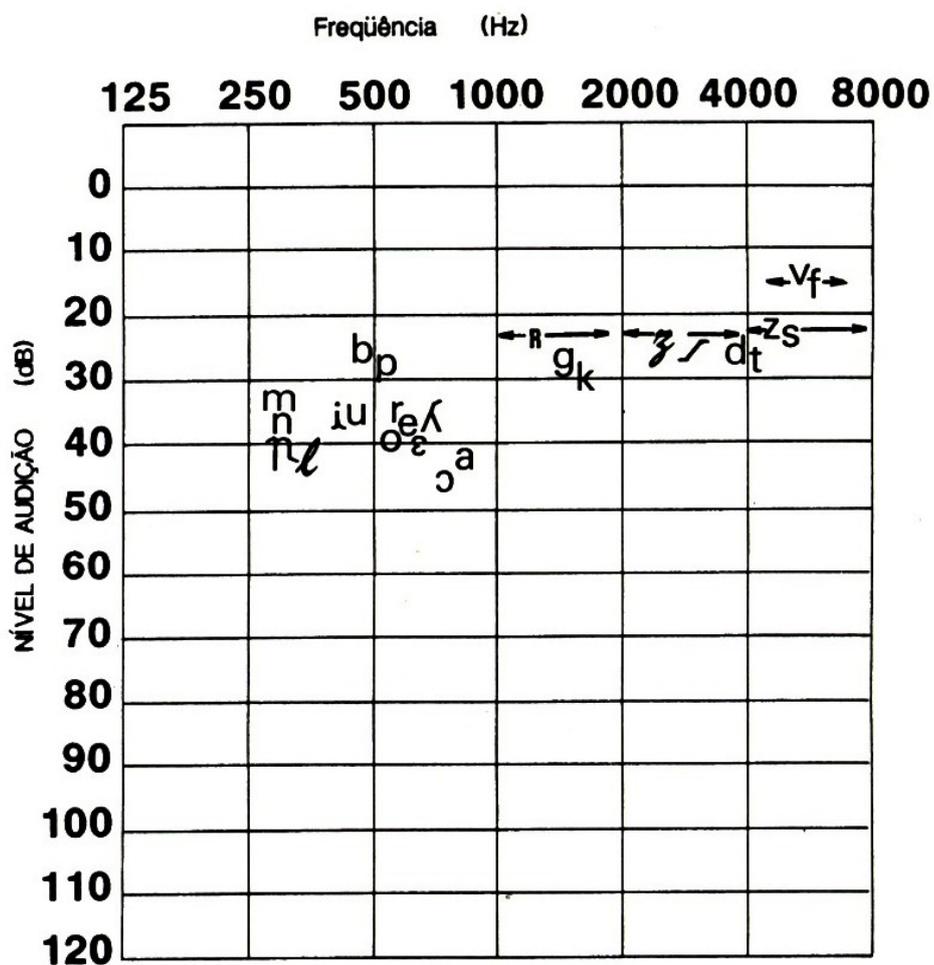
- 1 Vortexar por 2 minutos (ou até ficar homogêneo) e centrifugar a 2000 rpm por 7 minutos;
- 2 Aspirar 35mL e deixar 5mL no tubo, vortexar o restante e adicionar 15mL TE até completar 20mL no tubo de 50mL;
- 3 Vortex por 2 minutos (ou até ficar homogêneo) e centrifugar 2000 rpm por 7 minutos;
- 4 Repetir passos 3 e 4;
- 5 Aspirar 15mL do lisado, vortexar os 5 mL restantes e distribuir em 5 tubos de 1,5mL ( $\pm$  1mL para cada tubo);
- 6 Centrifugar por 2 minutos *fullspeed*(14000rpm) e desprezar o sobrenadante.
- 7 Acondicionar em freezer -70°C.

Extração de dna (puregenegenomicpurification kit gentra)

A partir de um tubo de 1,5 mL contendo *buffycoat*(*pellet*):

- 1 Transferir *buffycoat* para um tubo de 15 mL contendo 6mL de *CellLysisSolution*;
- 2 Vortex em alta velocidade até lisar todo o *pellet*, caso permaneça levar ao banho 40°C;
- 3 Adicionar 2mL de *ProteinPrecipitationSolution* e vortexar;
- 4 Centrifugar 2000g por 5 minutos;
- 5 Transferir sobrenadante para novo tubo de 15mL contendo 6mL de Isopropanol 100%;
- 6 Misturar 50 vezes por inversão;
- 7 Centrifugar 2000g por 3 minutos;
- 8 Desprezar sobrenadante;
- 9 Adicionar 6 mL Etanol 70% e misturar por inversão;
- 10 Centrifugar 2000g por 1 minuto;
- 11 Retirar com cuidado o sobrenadante e secar a temperatura ambiente;
- 12 Adicionar 250uL de *DNA HydrationSolution* e transferir o *pellet* para um tubo de 1,5mL;
- 13 Levar ao banho 65°C até dissolver totalmente o *pellet*.

**Anexo 4** - Valores acústicos médios de frequência e intensidade dos sons da fala do português brasileiro, dispostos no registro gráfico do audiograma.



Fonte: RUSSO e BEHLAU (1993)

## Anexo 5 – Classificação de Chang

---

CHANG GRADE	limiares auditivos (dB NA)
0	$\leq 20$ dB em 1,2, e 4 kHz
1a	$\geq 40$ dB em 6 até 12 kHz
1b	$>20$ e $<40$ dB em 4kHz
2a	$\geq 40$ dB a partir de 4 kHz
2b	$>20$ e $<40$ dB em frequências abaixo de 4 kHz
3	$\geq 40$ dB a partir de 2 kHz
4	$\geq 40$ dB a partir de 1 kHz

---