



MEDICINA

USP

Joel Lavinsky

**O Mapeamento Genético de Alta
Resolução da Perda Auditiva Induzida
pelo Ruído em Camundongos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Professor Livre-Docente junto ao Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia (Disciplina de Otorrinolaringologia)

São Paulo

2021

JOEL LAVINSKY

O Mapeamento Genético de Alta Resolução da Perda Auditiva Induzida pelo Ruído
em Camundongos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Professor Livre-Docente
junto ao Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia
(Disciplina de Otorrinolaringologia)

São Paulo

2021

Ficha Catalográfica

<https://biblioteca.fflch.usp.br/form/ficha-catalografica-livre-docenc>

À querida esposa Lisia, minha companheira
de vida e que sempre está presente nos momentos em que mais preciso.
Aos meus amados filhos Davi e Henrique, a quem dedico todo meu amor.
Aos meus pais Luiz e Elaine, que me trouxeram ao mundo, se dedicaram ao meu
desenvolvimento e sempre me motivaram a chegar mais longe.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço o Prof. Dr. Luiz Lavinsky, meu pai, por ter sido o meu primeiro mentor, desde a infância e adolescência até a minha vida adulta. Na minha vida profissional foi meu grande incentivador e referência como médico, professor e pesquisador. Esteve sempre ao meu lado em todos os momentos e representa o meu modelo de dedicação e honestidade. E à minha mãe, Elaine Lavinsky, que sempre me motivou a me qualificar e a crescer profissionalmente. Agradeço, também, às minhas queridas irmãs, Danielle e Michelle, por sempre participarem das minhas conquistas.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento, professor titular em Otorrinolaringologia da Universidade de São Paulo, que passou a ser uma fonte de inspiração como médico, professor, pesquisador e líder. Certamente, é um exemplo a ser seguido em relação ao incansável interesse em compartilhar conhecimento. Sempre me ajudou quando eu precisei e, o mais importante, é um grande amigo. Considero o Prof. Dr. Ricardo Bento o meu padrinho na otorrinolaringologia.

Agradeço ao Dr. Rick Adam Friedman por me receber como se fosse um filho, em Los Angeles, e me direcionar para ser um médico e cientista. Ele me mostrou que é possível ser um grande cirurgião de base de crânio e, ao mesmo tempo, um cientista de ponta. Recebi todas as oportunidades possíveis para um estrangeiro nos Estados Unidos. Abriu-me as portas da sua casa e do laboratório com autonomia plena para produzir ciência em alto nível. Mantemos, até os dias atuais, uma colaboração internacional através da University of California San Diego.

Um agradecimento especial ao falecido Dr. John K. Niparko, chairman do Departamento de Otorrinolaringologia da University of Southern California, que me deu um grande apoio como *postdoctoral fellow*.

Minha esposa Lisia Nudelmann Lavinsky e meus filhos, Davi e Henrique, foram decisivos em todo esse processo. Tenho a felicidade de ter uma família bem estruturada e com princípios morais e éticos que me propiciam esse crescimento pessoal e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de “doutorado-sanduíche” no exterior. Certamente, esse apoio foi fundamental para a viabilização do meu período no exterior. Agradeço aos National Institutes of Health (NIH) por conceder o R01 DC010856-01 para essas pesquisas.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande de Sul por ter recebido uma educação gratuita e de qualidade desde a graduação até a pós-graduação. Além disso, por ser, atualmente, do quadro de docentes da universidade no nível de graduação e pós-graduação. Da mesma forma, agradeço aos meus alunos de graduação e pós-graduação.

Também, à Universidade Federal de Ciências da Saúde e à Santa Casa de Porto Alegre pela oportunidade de ter sido treinado como otorrinolaringologista e, também, por fazer parte, atualmente, como preceptor de otologia, neurotologia e cirurgia da base do crânio da residência médica em otorrinolaringologia. Agradeço aos professores Moacyr Saffer, Geraldo Sant'Anna e José Faibes Lubianca Neto pela minha formação como otorrinolaringologista.

Agradeço ao Professor Geraldo Pereira Jotz pela abertura das portas do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para desenvolver a minha atividade como cientista e a docência. É um grande exemplo de dedicação pelo crescimento do departamento e da universidade.

Agradeço as contribuições técnicas de Robert Rainey e Litao Tao (USC) e à Yesha W. Lundberg, PhD (Boys Town National Research Hospital) por disponibilizar o camundongo *Nox3^{het}*. Agradeço ao Dr. Jake Lusic, Dra. Radha Kalluri e Dr. Hooman Allayee pelas discussões e orientações. Agradeço a técnica em laboratório Juemei Wang pelo apoio na realização dos experimentos.

E, finalmente, aos meus pacientes que são o objetivo final e a razão de toda a minha formação e qualificação como médico e cientista.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A Perda Auditiva Induzida pelo Ruído	20
1.2 A Susceptibilidade Genética da PAIR	24
1.3 Descoberta de Genes em Doenças Comuns e Complexas	28
1.3.1 Estudo de Associação do Genoma Inteiro (Genome-wide Association Study - GWAS)	28
1.3.2 Estudos de Associação do Genoma Inteiro (GWAS) em Camundongos	35
1.3.3 Linhagens Genéticas de Camundongos	38
1.3.4 Definição de Genes Candidatos	44
1.3.5 Os Sistemas Genéticos	47
1.3.6 Expressão Gênica	50
1.3.7 Interações Genéticas	52
1.3.8 Estudos de Associação do Genoma Inteiro relacionados à Surdez	57
2 OBJETIVOS	62
2.1 Objetivo Geral	62
2.2 Objetivos Específicos	62
3 MÉTODOS	64
3.1 Aspectos Éticos	64
3.2 O Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP)	64
3.3 Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico antes e após a exposição ao ruído	65
3.4 Determinação das emissões otoacústicas por produtos de distorção	65
3.5 Protocolo de exposição ao ruído	66
3.6 Extração do RNA Coclear e Expressão Gênica	66
3.7 Análise de Dados	67
3.8 Caracterização dos Genes Candidatos	68
3.9 Caracterização do Camundongo Mutante <i>Nox3^{het}</i>	69
3.10 Preparação Histológica da Cóclea	70
4 RESULTADOS	73
4.1 Caracterização fenotípica dos limiares auditivos do PEATE antes e após a exposição ao ruído	73
4.2 Caracterização fenotípica da amplitude da onda I do potencial evocado auditivo de tronco encefálico antes e após a exposição ao ruído	77

4.3 Estudo de associação do genoma inteiro com limiares auditivos do PEATE antes da exposição ao ruído para diferentes frequências ao longo do eixo tonotópico da cóclea.	81
4.4 Estudo de associação do genoma inteiro após a exposição ao ruído com limiares auditivos do PEATE para definição de genes candidatos na PAIR.	88
4.5 Estudo de Associação do Genoma Inteiro antes e após a exposição ao ruído utilizando o fenótipo da amplitude supraliminar das emissões otoacústicas por produtos de distorção.....	93
4.6 Estudo de associação do genoma inteiro antes e após a exposição ao ruído utilizando o fenótipo da amplitude da onda I do PEATE para caracterização de genes candidatos a sinaptopatia coclear induzida pelo ruído.	97
4.7 Validação do gene candidato <i>Nox3</i> no desenvolvimento da PAIR.	100
4.8 Análise da interação gene-ambiente no desenvolvimento da PAIR.....	107
5 DISCUSSÃO	116
5.1 Caracterização Fenotípica dos Limiares Auditivos Antes e Após a Exposição ao Ruído	116
5.2 Caracterização Fenotípica da Amplitude P1-N1 Antes e Após a Exposição ao Ruído.....	121
5.3 A arquitetura genética da linha de base de acordo com as frequências ao longo do eixo tonotópico da cóclea	123
5.4 Associação Genômica define os genes candidatos para susceptibilidade à perda auditiva induzida pelo ruído.....	127
5.5 Associação Genômica com o Fenótipo da Amplitude P1-N1 do PEATE antes e após a exposição ao ruído	128
5.6 Associação Genética com Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção com Amplitude Supraliminar antes e após a exposição ao ruído	131
5.7 Validação do gene <i>Nox3</i> com responsável pelo desenvolvimento da perda auditiva induzida pelo ruído	133
5.8 Primeira Evidência Experimental de Interação do Gene e Ambiente na Perda Auditiva Induzida pelo Ruído.....	138
6 CONCLUSÕES	143
7 ANEXOS	145
8 REFERÊNCIAS.....	156

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

CC	Cruzamento Colaborativo
EMMA	Efficient Mixed-Model Association
ENCODE	ENCYCLOPEDIA OF DNA ELEMENTS
EOA	Emissões Otoacústicas
EPI	Equipamento de Proteção Individual
EQTL	Expression Quantitative Trait Locus
EOAPDs	Emissões Otoacústicas por produtos de distorção
FaST-LMM	Factored Spectrally Transformed Linear Mixed Model)
FWER	Family-Wise Error Rate
GWAS	Estudos de Associação do Genoma Inteiro
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMDP	Hybrid Mouse Diversity Panel
HAPMAP	Human Haplotype Map
IAUC	Institutional Care and Use Committee
IRF	Índice de Reconhecimento de Fala
LRF	Limiar do reconhecimento de fala
MTb	Ministério do Trabalho
NAS	Academia Nacional de Ciências
PEATE	Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PTS	Permanent Threshold Shift
QTL	Locus de Fenótipo Quantitativo
RELN	Gene Reelin
RFLPs	Restriction Fragment Length Polymorphisms,
SNPs	Polimorfismos de Base Única
TTS	Temporary Threshold Shift

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados do estudo de associação do genoma inteiro para PAIR com o Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP).	91
Tabela 2: Genes nos picos das cinco associações para perda auditiva induzida por ruído (PAIR) regulados por um locus de fenótipo quantitativo de expressão (eQTL) local na cóclea.	92
Tabela 3: Genes candidatos nos picos de associação regulado por cis eQTL na cóclea. :	96
Tabela 4: Resultados do estudo de associação do genoma inteiro antes e após a exposição ao ruído com amplitude P1-N1 do PEATE.....	98
Tabela 5: Genes candidatos dentro de 3 picos de associação regulados por cis eQTL na cóclea.	100
Tabela 6: Genes nos picos das cinco associações para perda auditiva induzida por ruído (PAIR) regulados por um locus de fenótipo quantitativo de expressão (eQTL) local na cóclea.	101
Tabela 7: Correlação de Pearson entre os limiares do PEATE na linha de base e após exposição ao ruído das 100 linhagens do HMDP, após a exclusão das linhagens com limiares de linha de base > 40 dB.....	108
Tabela 8: Loci identificados no HMDP para fenótipos após exposição ao ruído....	111
Tabela 9: Genes dentro dos picos de associação de PAIR regulados por um eQTL local significativo na cóclea.	112
Tabela 10: Tamanho do efeito na linha de base versus pós-exposição ao ruído no SNP do cromossomo 6.	114

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** As linhagens consanguíneas apresentam padrões distintos de comprometimento auditivo. 73
- Figura 2:** Linhagens consanguíneas de camundongos mostram padrões distintos de sensibilidade ao ruído. 76
- Figura 3:** Delta (μV) da amplitude média da onda I do PEATE em cada frequência nas diferentes linhagens de camundongos (organizados em ordem alfabética). 77
- Figura 4:** Gráficos de dispersão da correlação entre a amplitude média da onda I em cada linhagem e a mudança na amplitude média (delta) após a exposição ao ruído. 80
- Figura 5:** Manhattan Plots com resultados de estudo de associação do genoma inteiro para PEATE em cada frequência. 82
- Figura 6:** Imagens de hibridização in situ exibindo expressão de mRNA coclear de genes candidatos. 85
- Figura 7:** PEATE na frequência de 16 kHz varia por genótipo em rs29362366. (A – C) 87
- Figura 8:** Caracterização dos limiares auditivos após a exposição ao ruído nas diferentes linhagens do Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP). 89
- Figura 9:** Resultados do estudo de associação do genoma inteiro para limiares auditivos após a exposição do ruído com o Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP). 90
- Figura 10:** Gráfico regional da associação com o fenótipo (limiar auditivo após exposição ao ruído na frequência de 8 kHz) no cromossomo 17 centrado no principal polimorfismo do locus do gene *Nox3* (rs33652818). 91
- Figura 11:** Manhattan Plot: Picos de associação ($-\log_{10}$) de valores p ($-\log_{10}p$) para 32 kHz - 70 dB (A) antes da exposição ao ruído e 8 kHz - 70 dB (B), 11,3 kHz - 70 dB (C), 16 kHz - 60 dB (D) e 32 kHz - 70 dB (E) após a exposição ao ruído. 94
- Figura 12:** Pico de associação centrado no SNP principal na frequência de 32 kHz - 70 dB (A) antes da exposição ao ruído e 8 kHz - 70 dB (B, C), 11,3 kHz - 70 dB (D), 16 kHz - 60 dB (E) e 23 kHz - 70 dB (F) após a exposição ao ruído. 94
- Figura 13:** Manhattan Plot mostrando a associação ($-\log_{10}$) dos valores de p ($-\log P$) para as frequências de 16 kHz (a) e 24 kHz (b) antes da exposição ao ruído em 8 kHz (c) e 32 kHz (d) após a exposição ao ruído em 102 HMDP linhagens de camundongos. 97
- Figura 14:** Intervalo da associação significativa centrada no SNP principal para a exposição antes da exposição ao ruído em 24 kHz (a) e 16 kHz (b) e após a exposição ao ruído em 8 kHz (c) e 32 kHz (d) em 102 linhagens de camundongos consanguíneos. 99
- Figura 15:** Camundongos *Nox3*het apresentam maior mudança permanente de limiar (PTS) na frequência de 8 kHz. *Nox3*het/*Nox3*het e *Nox3*het/+ apresentam uma PTS significativamente maior em comparação com os controles do tipo selvagem. 102
- Figura 16:** Efeito genotípico do polimorfismo-pico (rs33652818) no locus do *Nox3*. Comparação entre os alelos GG e AA através de várias frequências. ... 102
- Figura 17:** Análise topográfica da via auditiva em diferentes frequências (após a exposição ao ruído). 103

Figura 18: Análise detalhada do estímulo na frequência de 8 kHz.	104
Figura 19: Citococleograma dos camundongos do tipo selvagem e Nox3 (19A). .	105
Figura 20: Cocleograma sináptico em 8 kHz.	106
Figura 21: Correlações entre o limiar do PEATE na linha de base e o limiar após a exposição ao ruído para 8, 12, 16, 24 e 32 kHz (A, B, C, D, E respectivamente), após a exclusão de linhagens com perda auditiva na linha de base	108
Figura 22: Resultados do estudo de associação para limiares após exposição ao ruído na frequência de 32 kHz. Gráfico de Manhattan Plot mostrando a associação (-log ₁₀) p-valores (-logP) na frequência de 32 kHz em 100 linhagens de camundongos consanguíneos do HMDP.	110
Figura 23: Resultados de estudo de associação do genoma inteiro para limiares após exposição ao ruído na frequência de 24 kHz. Gráfico de Manhattan Plot mostrando a associação (-log ₁₀) p-valores (-logP) na frequência de 24 kHz em 100 linhagens de camundongos.	110
Figura 24: Gráfico regional da associação no cromossomo 6 nas frequências de 24 e 32 kHz centrado no SNP mais significativo (rs37517079).	111
Figura 25: Gráfico de eQTL coclear. A linha diagonal representa cis eQTLs. Linhas verticais densas representam pontos ativos trans eQTL. eixo x = posição eSNP, eixo y = posição do probe.	112

Lavinsky J. O Mapeamento Genético de Alta Resolução da Perda Auditiva Induzida pelo Ruído em Camundongos [tese de livre- docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

RESUMO

Introdução: A perda auditiva induzida por ruído (PAIR) é a causa mais comum de doença relacionada ao trabalho no mundo e a segunda causa de perda auditiva. **Objetivos:** Realizar o mapeamento genético da susceptibilidade à PAIR em camundongos com estudo de associação do genoma inteiro e a subsequente validação utilizando diferentes fenótipos auditivos através de métricas eletrofisiológicas. **Métodos:** Camundongos do *Hybrid Mouse Diversity Panel* (HMDP) com 5 semanas de idade (100 linhagens, 5-8 camundongos por linhagem) foram expostos a um ruído de banda na oitava de 10 kHz por 2 horas a 108 dB. A mudança permanente no limiar foi avaliada após 2 semanas da exposição ao ruído, através de estímulos com frequência-específica *tone-burst* (4, 8, 12, 16, 24 e 32 kHz) com potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE) e emissões otoacústicas por produtos de distorção (EOAPD). Utilizamos o *Efficient Mixed Model Analysis* (EMMA) para realizar a associação e a análise de expressão gênica de eQTL coclear de 64 linhagens do HMDP para priorizar os genes candidatos. **Resultados e Conclusões:** Houve uma ampla variação fenotípica dos limiares auditivos/amplitude da onda P1-N1 do PEATE e da amplitude supraliminar das emissões otoacústicas por produtos de distorção antes e após a exposição ao ruído de 100 linhagens de camundongos do HMDP. Mapeamos 12 picos de polimorfismos de nucleotídeo simples (SNP) com associação estatisticamente significativa ($p < 4,1E-6$) na linha de base e em frequências específicas ao longo do eixo tonotópico da cóclea. Identificamos genes candidatos após a exposição ao ruído com o fenótipo dos limiares auditivos (6 picos de associação significativa, $p < 4,1E-6$), amplitude da onda P1-N1 (4 picos de associação significativa, $p < 4,1E-6$) do PEATE e amplitude supraliminar das emissões otoacústicas por produtos de distorção (6 picos de associação significativa, $p < 4,1E-6$). Desses picos de associação, a validação eletrofisiológica e histológica confirmou que o gene *Nox3* tem papel fundamental no desenvolvimento da PAIR através da utilização do camundongo knockout *Nox3^{het}*. E, finalmente, o pico de SNP estatisticamente significativo (rs37517079) foi associado à suscetibilidade ao ruído no fenótipo da frequência de 32 kHz do PEATE, mas não associado aos limiares auditivos antes da exposição, sendo a primeira demonstração experimental da interação gene-ambiente no desenvolvimento da PAIR. Todos esses achados confirmam que a associação do genoma camundongos com o HMDP é uma abordagem apropriada para mapear genes de susceptibilidade à PAIR com alta resolução e poder estatístico.

Descritores: Perda auditiva induzida pelo ruído; Genes; Genoma; Mapeamento Genético.

Lavinsky J. High Resolution Genetic Mapping of Noise-Induced Hearing Loss in Mice [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

ABSTRACT

Introduction: Noise-induced hearing loss (NIHL) is the most common cause of work-related illness in the world and the second cause of hearing loss. Objectives: To carry out genetic mapping of NIHL susceptibility in mice with a genome-wide association study (GWAS) and subsequent validation using different hearing phenotypes based on electrophysiological metrics. Methods: 5-week-old Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP) mice (100 strains, 5-8 mice per strain) were exposed to 10 kHz octave band noise for 2 hours at 108 dB. The permanent threshold shift was evaluated 2 weeks after noise exposure, through frequency-specific tone-burst stimuli (4, 8, 12, 16, 24 and 32 kHz) with auditory brainstem responses (ABR) and distortion product otoacoustic emissions (DPOAE). We used Efficient Mixed Model Analysis (EMMA) to perform the association and gene expression analysis of cochlear eQTL from 64 HMDP strains to prioritize candidate genes. **Results and Conclusions:** There was a wide phenotypic strain variation in ABR hearing thresholds/P1-N1 wave 1 amplitude and the distortion product otoacoustic emissions suprathreshold amplitude before and after noise exposure in 100 HMDP mice strains. We mapped 12 statistically significant single nucleotide polymorphisms (SNP) peaks ($p < 4.1E-6$) at baseline and at specific frequencies along the tonotopic axis of the cochlea. We identified candidate genes after noise exposure with ABR hearing thresholds (6 statistically significant peaks, $p < 4.1E-6$), ABR P1-N1 amplitude (4 statistically significant peaks, $p < 4.1E-6$) and suprathreshold amplitude of distortion product otoacoustic emissions (6 statistically significant peaks, $p < 4.1E-6$). From these association peaks, the electrophysiological and histological validation confirmed that the *Nox3* gene plays an important role in the development of NIHL based on the knockout mouse *Nox3^{het}*. And finally, the statistically significant SNP peak (rs37517079) was associated with noise susceptibility at the ABR 32 kHz tone-burst phenotype, but not associated with hearing thresholds before exposure to noise, being the first experimental demonstration of gene-environment interaction in the development of NIHL. All these findings confirm that the genome-wide association study with the HMDP is an appropriate approach to mapping NIHL susceptibility genes with high resolution and statistical power.

Descriptors: Noise-induced hearing loss; Gene; Genome; Genetic Mapping.

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Essa tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Professor Livre-Docente, junto ao Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia na Disciplina de Otorrinolaringologia, representa a conclusão do processo de mapeamento genético completo da perda auditiva induzida pelo ruído (PAIR). O mapeamento genético da PAIR tem por objetivo identificar os fatores ao nível molecular e genético, que conferem susceptibilidade para o desenvolvimento dessa doença.

A PAIR é a líder mundial no risco à saúde ocupacional, em países industrializados, e a segunda forma mais comum de deficiência auditiva neurosensorial, após a presbiacusia (1). Nos Estados Unidos, aproximadamente 10% da população total é exposta, diariamente, a níveis perigosos de ruído no ambiente de trabalho (2). O risco poderia ser reduzido através de um melhor entendimento dos processos biológicos que modulam a susceptibilidade ao ruído danoso. Acredita-se que a PAIR é uma doença complexa que resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais. Está bem estabelecido que pessoas expostas ao ruído de forma semelhante apresentam variação no grau de perda auditiva, indicando um componente genético (3). Estudos com gêmeos estimam que a herdabilidade da PAIR seja de aproximadamente 36% (4).

A descoberta das interações entre o gene e o ambiente nas doenças humanas assim como na susceptibilidade à PAIR apresenta muitas dificuldades inerentes, especialmente, no controle da exposição. Embora diversos estudos de associação de genes candidatos para PAIR em humanos tenham sido conduzidos, esses estudos apresentam baixo poder estatístico, não são replicados e consideram somente uma fração do risco genético. Além disso, nenhum estudo de herdabilidade foi realizado, já que é praticamente impossível coletar dados de famílias em que todos os indivíduos tenham sido expostos a condições idênticas de ruído

Nas últimas décadas, estudos em humanos sobre perda auditiva neurosensorial deixaram bastante claro que muitas formas de perda auditiva possuem uma forte contribuição genética. Existem aproximadamente 67 genes, que resultam em perda auditiva não sindrômica, e afetam uma ampla gama de componentes dentro do Órgão de Corti (5). A perda auditiva relacionada à idade

mostra uma agregação familiar clara: o estudo do painel de gêmeos do envelhecimento da Academia Nacional de Ciências - Conselho Nacional de Pesquisa (NAS – NRC) estimou a herdabilidade de presbiacusia em aproximadamente 61% (6).

A base genética da PAIR tem sido claramente demonstrada em animais, já que diferentes linhagens de camundongos consanguíneos apresentam diferentes susceptibilidades ao ruído (7). Algumas linhagens de camundongos (C57BL/6J), que apresentam perda auditiva relacionada à idade, também se mostraram mais susceptíveis ao ruído que outras linhagens (8). Além disso, diversos camundongos mutantes, como SOD1^{-/-} (9), GPX1^{-/-} (10), PMCA2^{-/-} (11) e CDH23^{+/-} (12), se mostraram ser mais sensíveis ao ruído do que o tipo selvagem. O camundongo tem sido um modelo animal essencial para estudos em perda auditiva. Os avanços na genética dos camundongos, incluindo o sequenciamento do genoma e o mapa altamente denso de polimorfismos de base única (SNPs), têm gerado um sistema adequado para o estudo de um fenótipo complexo como a PAIR (8). A identificação de novos genes é crucial para a descoberta de novas vias e redes de genes. Isso aumentará nosso conhecimento sobre a biologia auditiva básica e será possível identificar novos potenciais alvos terapêuticos para combater a PAIR.

Apesar do notável progresso em nossa compreensão da perda auditiva clínica, os estudos em humanos encontram vários obstáculos, como poder estatístico limitado, dificuldades na reprodutibilidade, dificuldades no controle de fatores ambientais, como exposição ao ruído e medicamentos ototóxicos. Os camundongos fornecem uma plataforma complementar útil para o estudo da perda auditiva. Dada à existência de surdez em camundongos, semelhança entre os ouvidos internos de camundongos e humanos, homologia genética entre camundongos e humanos e as ferramentas moleculares oferecidas por um organismo modelo, os camundongos têm se mostrado importante no estudo da hereditariedade e da fisiopatologia molecular da perda auditiva.

A elucidação dos efeitos genéticos específicos do ambiente é crítica para a compreensão de características complexas como a PAIR. Em humanos, as interações gene-ambiente estão sendo consideradas (13), mas poucos dos estudos foram replicados até o momento. Um grande obstáculo para os estudos em humanos é a incapacidade de controlar e quantificar as exposições ambientais de forma consistente, o que leva à falta de populações bem caracterizadas e monitoradas para

estudo. Este é, especialmente, o caso da PAIR, e apenas alguns estudos com baixo poder estatístico foram publicados (3). É por essa razão que muitos pesquisadores estão se voltando para modelos animais, como camundongos. Os modelos de camundongos têm várias vantagens sobre os estudos em humanos: o ambiente pode ser controlado com mais cuidado, as medições podem ser replicadas em animais geneticamente idênticos, o efeito ambiental sobre as características pode ser reduzido e a proporção da variabilidade explicada pela variação genética é aumentada.

Os estudos de associação do genoma inteiro têm revolucionado o campo da genética e têm gerado a descoberta de centenas de genes envolvidos em fenótipos complexos (14). Em função das limitações dos estudos humanos de associação do genoma inteiro e das análises de *locus* de fenótipo quantitativo (QTL) em camundongos, optou-se por utilizar a estratégia de associação do genoma inteiro por meio da incorporação do *Hybrid Mouse Diversity Panel* (HMDP). O HMDP é uma coleção de linhagens de camundongos consanguíneos clássicos e recombinantes, cujos genomas têm sido sequenciados e/ou genotipados em alta resolução (15). O cálculo de poder tem demonstrado que esse painel é superior à análise de ligação tradicional (*linkage*) e é capaz de detectar *loci* responsáveis por 5% da variância global. Diversos estudos, de forma bem-sucedida, têm mapeado *loci* candidatos em fenótipos complexos através desse painel (16–19). O HMDP foi usado com sucesso para examinar a genética de uma ampla gama de fenótipos por nós e outros, incluindo lipídios plasmáticos (20), densidade óssea (16), fenótipos de células sanguíneas (19), respostas de medo condicionado (17), interações gene-por-dieta na obesidade (21), respostas inflamatórias (22), perda auditiva relacionada à idade (23) diabetes (24) e insuficiência cardíaca (25). Em muitos desses estudos, incluindo o presente trabalho, os genes nos *loci* identificados foram validados como causais usando modelos de camundongos projetados e vários deles corresponderam a *loci* identificados em estudos de associação humanos.

Como uma ferramenta importante na avaliação auditiva, o potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE) é um estudo eletrofisiológico amplamente utilizado, que usa tons puros de frequências variadas para estimular a via auditiva, e detecta a atividade resultante em formas de onda características que servem como uma medida quantitativa da função auditiva. Uma métrica particularmente útil do PEATE é o limiar auditivo, que é determinado submetendo um indivíduo a

intensidades crescentes de estímulos até que a forma de onda seja detectada. Vários estudos, em larga escala, caracterizaram os limiares do PEATE em diferentes linhagens de camundongos, fornecendo um recurso valioso para comparações da função auditiva entre linhagens e o mapeamento genético de características auditivas. Um estudo realizado por Zheng e colegas (26) relatou os limiares do PEATE de 80 linhagens clássicas de camundongos consanguíneos, 35 das quais graus variados de perda auditiva.

Há evidências crescentes de que a capacidade de ouvir e compreender, à medida que envelhecemos, em uma variedade de ambientes, é ditada pela conectividade neural das células ciliadas internas da cóclea e seus contatos com as fibras neurais auditivas. Dados recentes em camundongos e humanos sugerem que existe uma “perda auditiva oculta” resultante da sinaptopatia entre as células ciliadas internas e as fibras auditivas neurais tipo I (27). A interrupção dessas sinapses não só leva à desnervação, mas também a uma lenta degeneração dos neurônios do gânglio espiral (28). Em humanos, esse fenômeno tem sido associado à dificuldade de compreensão da fala em ambientes sonoros complexos. (29).

Embora existam poucas maneiras práticas de identificar esses tipos de perdas no ambiente clínico, há evidências em camundongos de que a sinaptopatia coclear pode ser capturada pela amplitude da primeira onda (onda I) do PEATE, após um estímulo supralimiar (30). Em vários experimentos, a exposição ao ruído levou a um declínio permanente na amplitude da onda I do PEATE, apesar da recuperação das emissões otoacústicas e dos limiares auditivos. Foi determinado que a amplitude da onda I se correlaciona fortemente com a integridade das sinapses auditivas (31)

Recentemente, evidências para essa “perda auditiva oculta” foram demonstradas em espécimes de osso temporal humano (32). Parece que a exposição ao ruído ao longo do tempo resulta em perda de vesículas sinápticas. Além disso, foi demonstrado que a perda auditiva relacionada à idade resulta da perda de células sensoriais e neurônios (33). Foi demonstrado, em camundongos, que presbiacusia resulta de uma perda sináptica semelhante entre células ciliadas internas e fibras auditivas neuronais e esta sinaptopatia coclear também precede a perda de células ciliadas e mudanças permanentes de limiar na orelha do camundongo em idade avançada (34).

Nessa introdução, foram explorados os conceitos básicos sobre a perda auditiva induzida pelo ruído, especialmente, sobre os conhecimentos atuais sobre susceptibilidade genética à PAIR gerados através da pesquisa básica e clínica. Além disso, uma sucinta apresentação dos conceitos fundamentais dos estudos de associação do genoma inteiro (genome-wide association studies, GWAS) e do Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP) será disponibilizada.

1.1 A Perda Auditiva Induzida pelo Ruído

PAIR é uma diminuição progressiva da acuidade auditiva em função da exposição continuada a elevados níveis de pressão sonora (35). Enquanto, no trauma acústico, a perda auditiva é causada por um som abrupto de grande intensidade, na PAIR, a exposição é prolongada e de menor intensidade. A PAIR frequentemente está relacionada à atividade ocupacional, mas, também, pode ocorrer em atividades recreativas (discotecas, shows de música). A PAIR representa a doença profissional irreversível mais prevalente em todo mundo (36).

Existe suspeita de que a associação entre perda auditiva e ruído tenha iniciado há pelo menos 2 mil anos. Bernardino Ramazzini (1633-1714) descreveu a surdez dos bronzistas, os quais apresentavam comprometimento auditivo proporcional à exposição ocupacional ao ruído. Posteriormente, Habermann e Witmark (1906-1907) identificaram o impacto do ruído diretamente no órgão de Corti (37).

Suspeita-se que a PAIR seja resultado do comprometimento metabólico do epitélio sensorial da cóclea, especialmente, das células ciliadas externas e da estrutura neural associada, com início na região da cóclea responsável pelas frequências de 3 a 6 kHz.

A lesão auditiva decorrente do ruído por mudança temporária do limiar (*temporary threshold shift*, TTS) ou permanente (*permanent threshold shift*, PTS). A TTS ocorre após exposições sonoras intensas e de curta duração (concertos de rock); porém, nesses casos, a perda auditiva costuma ser reversível após poucos dias. Episódios recorrentes de TTS podem resultar em PTS a longo prazo, ou seja, PAIR.

Na PTS, as alterações são irreversíveis e incluem perda de células ciliadas externas, degeneração das fibras nervosas cocleares e formação de tecido cicatricial (zonas mortas) no órgão de Corti. Hirose & Liberman (7) demonstraram que pode

ocorrer degeneração neural irreversível induzida pelo ruído, mesmo na ausência de alterações nos limiares auditivos e com preservação de células ciliadas externas.

Existe um risco significativo de desenvolver PAIR, após uma história de exposição crônica a um ruído acima de 85 dB por pelo menos 8 horas ao dia. Quanto maior a intensidade do ruído, menor o período suficiente para desenvolver PAIR. A Norma Regulamentadora n.º 15 (NR-15), da Portaria do Ministério do Trabalho (MTb) n.º 3.214/1978, estabelece os limites de exposição a ruído contínuo.

Existem alguns fatores, que podem predispor à ocorrência de PAIR. Ainda não há resultados conclusivos acerca da predisposição genética a PAIR, mas em modelos animais essa associação já foi demonstrada (38).

Já no caso do trauma acústico, o ruído pode gerar dano físico imediato à orelha interna, proporcional à intensidade sonora. Impulsos sonoros de alta intensidade podem comprometer fisicamente a membrana timpânica, a cadeia ossicular, as membranas da orelha interna e o órgão de Corti. A ruptura da membrana timpânica pode absorver parte da energia que seria transferida completamente para a orelha interna.

O principal sintoma da PAIR é a perda auditiva, a qual pode estar acompanhada do zumbido. Esses sintomas podem variar em função de período de exposição, nível de pressão sonora e susceptibilidade individual.

A perda auditiva é do tipo neurossensorial (por lesão no órgão de Corti), de evolução lenta e caráter progressivo. A hipoacusia costuma ser bilateral e simétrica, sendo dificilmente de caráter profundo. Os escores de discriminação auditiva estão dentro dos níveis normais ou pouco alterados. Assim como na perda auditiva, o zumbido tem intensidade variável, frequentemente, é bilateral e pode estar presente em pelo menos metade dos pacientes com PAIR (39).

Em uma fase inicial de exposição ao ruído, antes mesmo da hipoacusia, podem ocorrer sintomas temporários de zumbido, cefaleia e tontura. Posteriormente, após meses a anos de exposição, há uma intensificação do zumbido e uma leve redução da discriminação auditiva, especialmente, no ruído. Além da hipoacusia e do zumbido, podem ocorrer queixas de algiacusia e plenitude aurais associados. A progressão da perda auditiva é interrompida na medida em que o indivíduo se afasta da exposição ao ruído.

Além do comprometimento do sistema auditivo, podem ocorrer repercussões extra-auditivas, como: comportamentais (isolamento social, irritabilidade, dificuldade de concentração), neurológicas (sono, tremores, cefaleia e náusea), digestivas (dor abdominal e gastrites) e alterações vestibulares. O exame clínico pode demonstrar alterações cardiovasculares (aumento da pressão arterial e taquicardia) e metabólicas (aumento do cortisol, glicemia e adrenalina) (40).

No processo de investigação diagnóstica da PAIR, a anamnese clínica convencional deve ser complementada pela anamnese ocupacional. Além da anamnese, o exame físico otorrinolaringológico e exames complementares fazem parte da investigação clínica da PAIR.

A anamnese convencional, como qualquer investigação de hipoacusia neurosensorial, deve incluir os seguintes questionamentos: período de evolução dos sintomas, histórico de intercorrências neonatais, infecções (sarampo, caxumba, meningite), uso de drogas ototóxicas, otites, trauma, doenças metabólicas (diabetes, hipotireoidismo, dislipidemias), história familiar de perda auditiva e hábitos de vida (tabagismo, alcoolismo). Além disso, os pacientes devem ser questionados sobre o uso de arma de fogo e instrumentos musicais, além de exposição ao ruído em atividades recreativas (danceterias, shows).

Na anamnese ocupacional, deve-se questionar sobre todas as atividades profissionais realizadas, tipos de máquinas usadas, exposição a produtos químicos, histórico de acidentes e utilização de proteção auditiva individual (40).

O exame físico otorrinolaringológico completo deverá ser realizado na investigação da PAIR com especial atenção para a otoscopia e/ou otomicroscopia (o exame clínico otoscópico é normal na PAIR) e a acumetria com pesquisa de Rinne e Weber.

O exame complementar principal para o diagnóstico da PAIR é a audiometria tonal aéreo-óssea. Além da audiometria tonal, é importante investigar o limiar do reconhecimento de fala (LRF), o índice de reconhecimento de fala (IRF) e a pesquisa de recrutamento auditivo. Em determinadas situações, como na suspeita de simulação, podem ser solicitados os potenciais evocados auditivos de tronco cerebral (PEATE) e as emissões otoacústicas (EOA). A audiometria ocupacional (somente via aérea) pode ser utilizada no acompanhamento e no controle de perda auditiva, porém

não fornece diagnóstico da PAIR, pois a falta da via óssea não permite a identificação de lesão neurossensorial. Independentemente do tipo de exame audiométrico, é importante o repouso auditivo de pelo menos 14 horas, antes da realização do exame, para afastamento de possibilidade de se tratar de TTS.

De forma característica, o primeiro sinal audiométrico da PAIR é o aparecimento da gota acústica com comprometimento dos limiares nas frequências de 3.000, 4.000 ou 6.000 Hz, sendo restaurado em 8.000 Hz. A exata localização da gota acústica depende de diversos fatores, incluindo a frequência do ruído e o comprimento do conduto auditivo. Nos estágios iniciais da PAIR, a média dos limiares em 500, 1.000 e 2.000 Hz são melhores que a média em 3.000, 4.000 e 6.000 Hz, e os limiares em 8.000 Hz são melhores que o ponto mais profundo da gota acústica.

De forma isolada, a PAIR, dificilmente, produz uma perda auditiva superior a 75 dB, nas altas frequências, e 40 dB nas baixas frequências. Entretanto, quando combinada a outros tipos de perda auditiva (presbiacusia), pode ocorrer um agravamento desses limiares. A velocidade de perda auditiva em função da PAIR é maior nos primeiros 10-15 anos de exposição, reduzindo essa velocidade, à medida em que há um agravamento da perda auditiva.

Diversas patologias da orelha interna são responsáveis por uma hipoacusia neurossensorial, bilateral, simétrica e que compromete as altas frequências. Por isso, essas doenças podem apresentar fenótipos semelhantes à PAIR. Muito frequentemente, essas doenças podem estar combinadas, como nos pacientes com presbiacusia associada à PAIR.

No diagnóstico diferencial da PAIR, estão as seguintes doenças otológicas: infecciosas (sarampo, meningite, sífilis, toxoplasmose, rubéola), ototoxicidade (medicamentos ou exposição a produtos químicos), traumas sonoros (ruídos explosivos, arma de fogo), barotrauma (aéreo ou aquático), trauma craniano, metabólicas (diabetes, hipotireoidismo, dislipidemia), autoimunidade e presbiacusia.

Já que a PAIR é uma doença com fenótipo irreversível, o único caminho é a reabilitação com aparelhos de amplificação sonora individual, quando indicado. Não existe tratamento clínico ou cirúrgico para a PAIR, por isso, a chave é a prevenção.

No ambiente do trabalho, é importante a formação de uma equipe com diversos profissionais (médicos, fonoaudiólogas, técnicos de segurança) para detecção dos

níveis de ruído nos diferentes ambientes e promover um programa de educação e monitoramento para proteção auditiva.

A fim de evitar a instalação da doença, programas de prevenção são fundamentais. Por isso, órgãos governamentais instituíram o Programa de Conservação Auditiva (PCA) (35). Esse programa envolve o reconhecimento e a avaliação dos riscos para a audição, gerenciamento audiométrico, medidas de proteção coletiva, medidas de proteção individual (EPI), educação e motivação, gerenciamento de dados e avaliação do programa.

Por enquanto, a PAIR é uma doença irreversível. A conscientização de governos, empresários, profissionais da saúde e da população parece ser o caminho para a prevenção. Nas últimas décadas, em função da construção dessa consciência, vem ocorrendo uma progressiva redução da prevalência da PAIR, especialmente, no ambiente de trabalho.

1.2 A Susceptibilidade Genética da PAIR

A principal vantagem para estudos de PAIR em modelos animais é a capacidade de fornecer e monitorar, de forma precisa, a exposição ao ruído. Dada à homogeneidade genética, os camundongos apresentam menor variabilidade nas medidas de desfecho, quando comparados a outros modelos experimentais. Entretanto, é frequentemente difícil comparar os estudos com animais de diferentes laboratórios devido a diferentes protocolos de exposição ao ruído e configurações diversas.

A outra vantagem dos estudos animais, como PAIR, é a de que os pesquisadores têm acesso aos tecidos cocleares, em diferentes momentos, após a exposição ao ruído para estudos histológicos de morfologia e patologia, assim como análises moleculares de alterações na expressão gênica. Já em humanos, os pesquisadores somente têm acesso às estruturas cocleares de ossos temporais extraídos durante autópsias.

Os camundongos geraram a primeira evidência da influência genética da PAIR. Isso ocorreu em função da recente identificação de genes que aumentam a susceptibilidade ao trauma sonoro (41). A base genética da PAIR tem sido claramente demonstrada em modelos animais. As linhagens de camundongos (C57BL/6J), que

apresentam perda auditiva relacionada ao envelhecimento, foram também associadas a uma maior susceptibilidade ao ruído em comparação com outras linhagens (8,42,43). Além disso, diversos camundongos *knockout*, como *SOD1^{-/-}*, *GPX1^{-/-}*, *PMCA2^{-/-}* (12) e *CDH23^{+/-}*, demonstraram ser mais sensíveis ao ruído que o tipo selvagem. Esses estudos em camundongos *knockout* indicam que existem certos déficits que quebram diferentes ciclos e estruturas dentro da cóclea e geram um aumento da susceptibilidade da orelha interna ao ruído.

A principal limitação dos estudos experimentais em camundongos está na concomitância de degeneração coclear fisiológica e PAIR. Estudos auditivos em camundongos comuns e consanguíneos demonstraram que, na idade de 23 meses, o camundongo da linhagem CBA apresenta a melhor audição e a pior resposta nos limiares auditivos no potencial evocado auditivo de tronco cerebral. Por outro lado, os camundongos das linhagens DBA/2J e C57BL/6J apresentam perda auditiva precoce e acelerada com a idade (8).

Diversos grupos têm comparado o camundongo CBA com o C57BL/6J e têm demonstrado que a linhagem C57BL/6J apresenta perda auditiva precoce e acelerada. Além disso, esses camundongos são mais susceptíveis ao ruído e exibem maiores alterações dos limiares após a exposição ao ruído na maioria das frequências testadas (44–46). O camundongo CBA também apresenta rápida recuperação da função auditiva nos primeiros 3 dias, após a exposição ao ruído, enquanto o C57BL/6J apresenta uma recuperação limitada com o passar do tempo (8,43,47).

Em estudo publicado, em 2009, foram realizados diversos experimentos com diversas linhagens para estudo da PAIR. Os camundongos da linhagem consanguínea Castaneous (CAST/Ei) são resistentes ao ruído, enquanto a linhagem C57BL/6J é susceptível (48).

Foi demonstrado que o efeito da exposição intensa ao ruído na expressão de moléculas parecem ser importantes para o desenvolvimento da PAIR em linhagens de camundongos consanguíneos (49). Camundongos B6.CAST, 129X1/SvJ e 129S1/SvImJ foram submetidos ao protocolo de exposição ao ruído, gerando uma perda de 40 dB nos limiares auditivos de camundongos B6, porém houve resistência ao ruído nas demais linhagens de camundongos. Após 6 horas da exposição ao ruído, a análise da expressão gênica no labirinto membranoso demonstrou um aumento da

regulação de fatores de transcrição tanto no camundongo suscetível quanto no camundongo resistente.

Foram realizados estudos comparados sobre a linhagem de camundongo CBA/CaJ como modelo de perda auditiva relacionada à idade e à PAIR. Considerando a resistência ao ruído e a limitada perda auditiva relacionada à idade, foram realizados estudos com outras linhagens para encontrar padrões semelhantes à linhagem CBA/CaJ (50). A linhagem FVB/NJ foi previamente descrita com um fenótipo auditivo semelhante ao CBA/CaJ. Foi demonstrado que a linhagem FVB/NJ desenvolve o fenótipo de perda auditiva relacionada à idade mais precoce que o CBA/CaJ. Além disso, camundongos jovens de FVB/NJ são mais vulneráveis à PAIR até as 10-12 semanas de vida. Isso sugere que a linhagem FVB/NJ pode ser utilizada como modelo genético para formas neurais de perda auditiva progressiva e para estudos de sensibilidade ao ruído na idade jovem.

A descoberta de fatores genéticos, que predisõem à PAIR em humanos, tem encontrado muitas dificuldades. Até hoje, não existem estudos de hereditariedade realizados, já que é impossível coletar dados em famílias em que todos os indivíduos são expostos a condições idênticas de exposição ao ruído. Existem algumas técnicas alternativas em que as variantes causais podem ser estudadas através de genes candidatos, sendo cuidadosamente selecionados com base na informação relacionada à sua função biológica. Isso abriu oportunidades para uma análise da possibilidade de esses genes aumentarem a susceptibilidade à PAIR, em uma base populacional através de estudos de associação.

Os Estudos de Associação do Genoma Inteiro – GWAS (Genome-Wide Association Studies) têm sido utilizados de forma bem-sucedida, nos últimos 10 anos, para identificar múltiplos genes que interagem e contribuem para o fenótipo da doença. Isso ocorre em função das limitações em identificar um número suficiente de indivíduos susceptíveis e controles com resistência ao ruído submetidos a um mesmo ambiente. Em estudos de associação do genoma inteiro de larga escala, o DNA de milhares de indivíduos diagnosticados com uma doença específica e o DNA de indivíduos não afetados (controles) são rastreados e pareados, utilizando chips de DNA que contém entre 3.000 e 5.000 dos polimorfismos mais informativos no genoma humano. Isso possibilita ao pesquisador identificar polimorfismos associados a doenças específicas. Essas novas ferramentas facilitam a identificação de genes para

doenças complexas, já que pequenas alterações em diversos genes podem contribuir para o fenótipo final (51).

A confiabilidade desses achados pode ser verificada, por meio da replicação dessa descoberta, em uma segunda população, não relacionada (52). Os controles envolvem uma análise semelhante, através de diferentes grupos étnicos (Europa Oriental, África e Ásia), já que alguns polimorfismos apresentam maiores frequências em alguns grupos étnicos específicos e são menos informativos em estudos de associação. Em função da grande quantidade de amostras de DNA e polimorfismos, os GWAS têm sido muito caros. Entretanto, o desenvolvimento de banco de dados, com a já conhecida frequência de alelos de polimorfismos (www.hapmap.org), e a disponibilidade de métodos de genotipagem massiva (como os chips de DNA), tornam os GWAS mais factíveis.

Nos últimos 10 anos, tem sido observado um grande aumento no número de GWAS com o objetivo de identificar genes relacionados a susceptibilidade à PAIR. Centenas de polimorfismos foram rastreados em genes envolvidos em diferentes mecanismo e estruturas da orelha interna. Nesse sentido, foram classificados em genes de estresse oxidativo, rotas de reentrada de potássio, genes monogênicos de surdez e genes das proteínas *heat shock*. Até hoje, os resultados mais promissores na PAIR foram obtidos com os genes *KCNE1* e *KCNQ4* na reentrada de potássio na orelha interna (53,54); *CAT*, *PCDH15* e *MYH14* (55) e *Hsp70* (55,56) Esses genes foram replicados, em diferentes populações, e apresentaram tamanho de amostra suficiente para um poder de detecção de um alelo causal.

Estudos mais recentes suportam o papel dos polimorfismos dos genes do estresse oxidativo da orelha interna no desenvolvimento da PAIR. Demonstrou-se que o polimorfismo do gene *SOD2*, na sequência mitocondrial alvo, estava associado com a PAIR em trabalhadores chineses. Além disso, esse efeito foi intensificado em níveis maiores de exposição ao ruído (57). Um estudo duplo-cego com 53 trabalhadores tratados com n-acetilcisteína apoia a hipótese de que indivíduos portadores dos genótipos nulos nos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* são mais susceptíveis à PAIR (58). Por outro lado, a ototoxicidade por aminoglicosídeos, que parece ter o mesmo mecanismo de estresse oxidativo, mostrou ser independente dos polimorfismos dos genes *GM1* e *GSTT1* (59).

Estudos semelhantes têm avaliado genes, que atuam no ciclo do potássio na orelha interna. Uma análise foi realizada numa população polonesa, encontrando associações significativas em sete de um total de 10 genes (*KCNE1*, *KCNQ4*, *GJB1*, *GJB2*, *GJB4*, *KCNJ10*, *KCNQ1*) (60). Os resultados mais interessantes foram obtidos nos genes *KCNE1* e *KCNQ4*. Esses achados foram replicados pelos autores nos mesmos polimorfismos que foram previamente publicados na amostra sueca (rs2070358 e Q455H, respectivamente).

A direção dessa tendência genética para o *KCNE1* foi a mesma em ambas as populações, mas oposta para o *KCNQ4*. Isso pode ser explicado, teoricamente, por diferenças nas frequências dos alelos ou nos padrões de desequilíbrio de ligação em ambas as populações. Houve uma discreta diferença nos procedimentos de seleção entre os estudos, influência de diversos fatores ambientais ou associações falso-positivas com a PAIR.

Outros trabalhos avaliaram genes, que expressam as *heat-shock proteins* (HSPs), demonstraram associação dessas proteínas com PAIR e esses resultados foram replicados em três populações independentes (chinesa, sueca e polonesa) (61).

1.3 Descoberta de Genes em Doenças Comuns e Complexas

1.3.1 Estudo de Associação do Genoma Inteiro (Genome-wide Association Study - GWAS)

Os GWAS foram, inicialmente, propostos por Botstein et al (60). O princípio é o de genotipar diversas variantes genéticas comuns, ao longo do genoma, as quais podem agir como representantes de variantes não genotipadas pela herança em comum de variantes vizinhas em um segmento do cromossomo. Botstein sugeriu que fosse utilizado um painel com polimorfismos de fragmentos com comprimento restrito (*restriction fragment length polymorphisms*, RFLPs) para examinar como a transmissão familiar de variantes alélicas rastreiam a transmissão do fenótipo.

Quando o polimorfismo apresenta ligação significativa com uma determinada doença, marcadores adicionais podem ser genotipados nessa região. Tal procedimento é conhecido como mapeamento fino com o sequenciamento para identificar o gene e a variante responsável. A análise da transmissão familiar por

ligação tem sido utilizada de forma bem-sucedida para identificar variantes raras subjacentes a mais de 2.000 doenças monogênicas até hoje.

As doenças monogênicas, como a hipercolesterolemia familiar, são relativamente menos comuns na população e são tipicamente causadas por variantes raras, geralmente, levando a alterações na sequência de aminoácidos, e, conseqüentemente, a doença. As doenças complexas, por outro lado, resultam de contribuições de múltiplos fatores genéticos e ambientais, sendo tipicamente doenças mais comuns. Conforme abordado por Risch & Merikangas (62), os estudos de ligação falham em identificar variantes comuns em fenótipos multifatoriais devido a limitações inerentes ao método.

O sucesso dos estudos de associação do genoma inteiro iniciou a partir da identificação de dezenas de variantes genéticas comuns associadas a doenças e fenótipos comuns. Essas descobertas estimularam novos pensamentos sobre a arquitetura genética de fenótipos comuns, através da evidência de que variações comuns explicam, pelo menos em parte, a variação no risco de desenvolver doenças frequentes, sendo mais conhecido com hipótese da doença comum/variante comum (63).

Os GWAS utilizam marcadores abundantes e, facilmente identificáveis, os polimorfismos, que são substituições de um par de base único com uma frequência do alelo menor superior a 0,01. Fundamentalmente, esses estudos de associação são simples e testam a hipótese de que a frequência do alelo difere entre os indivíduos com diferentes fenótipos.

Embora esses estudos tenham sido propostos, há mais de 20 anos, somente após a divulgação do sequenciamento completo do genoma humano isso foi possível (64), através da publicação de milhões de polimorfismos em bancos de dados públicos (65), desenvolvimento de tecnologia de genotipagem de alta-resolução e publicação final do *Human Haplotype Map* (HapMap) (66).

Antes da era dos GWAS, poucos polimorfismos avaliados através de genes candidatos eram replicáveis (67,68). Isso era explicado em parte por pobre desenho de estudo, erro de genotipagem, estratificação da população, valor p com limiares permissivos com resultados falso-positivos e tamanho de amostra inadequado, derivando em resultados falso-negativos. Atualmente, grupos como o do *US National*

Cancer Institute e do *National Human Genome Research Institute* sugerem padrões para a realização de estudos de associação genética (69).

Como em todos os estudos epidemiológicos, o primeiro passo é definir cuidadosamente o fenótipo em estudo e utilizar decidir sobre o uso de uma variável qualitativa ou quantitativa. Os fenótipos quantitativos geralmente aumentam o poder, através de uma informação mais ampla, mas, também, podem diminuir o poder, se as medições não forem precisas. Alguns fenótipos, como as doenças, são por definição qualitativos, mas podem ser medidos de forma quantitativa. Da mesma forma, fenótipos quantitativos podem ser analisados de forma qualitativa, através da aplicação de ponto de corte, como ao comparar indivíduos nos extremos da curva de distribuição para reduzir a heterogeneidade.

Quando forem utilizados fenótipos qualitativos, em estudos de casos e controles (como no diabetes tipo 2), deve-se sempre ter cuidado quanto à classificação dos indivíduos e à representatividade da população. Como em todos os estudos, que avaliam etiologia, é importante definir o fenótipo da forma mais precisa possível em relação ao mecanismo para aumentar o poder estatístico através da redução da heterogeneidade. O equilíbrio apropriado entre um critério cuidadoso de inclusão e um amplo tamanho amostral deve ser considerado, de acordo com o fenótipo em estudo.

É muito provável que a maioria dos fenótipos humanos, que apresentam variabilidade, tem componente genético. Entretanto, está bem estabelecido que o grau de hereditariedade difere amplamente entre os fenótipos e a hereditariedade e reflete no total de efeito da variação genética, assim como fatores ambientais e comportamentais segregados em famílias. Por isso, pode ser útil avaliar a parcela de variabilidade de um dado fenótipo explicado pela hereditariedade, antes de iniciar a execução de um caro GWAS. Dessa forma, se a hereditariedade de um fenótipo é baixa, problemas com a definição do fenótipo, erros de medida ou outros erros sistemáticos podem gerar vieses nos estudos de associação genética. Nesses casos, pode-se tentar enriquecer os efeitos genéticos através da avaliação precisa de subfenótipos bem definidos (como medidas de resistência à insulina, ao invés do diagnóstico de diabetes tipo 2).

Para examinar se existe evidência de hereditariedade, sugere-se realizar uma ampla revisão crítica da literatura, assim como análises de hereditariedade na amostra

utilizada, especialmente, em famílias. Geralmente, os estudos que avaliam hereditariedade examinam a agregação familiar, concordância entre monozigóticos, quando comparados a gêmeos dizigóticos e risco de recorrência entre irmãos (70).

As formas mais comuns de amostras utilizadas são os estudos de caso-controle, estudos de coorte, estudos baseados em famílias e estudos de populações isoladas. Geralmente, a escolha do tipo de amostra deve ser baseada na prevalência e na segregação familiar do fenótipo de interesse.

A análise de caso-controle é o tipo de amostra mais amplamente utilizado, já que os casos e controles são facilmente comparáveis e com baixo custo de coleta. Entretanto, esse desenho de estudo é mais sensível a diferentes formas de vieses, especialmente, viés de seleção e confusão pela ancestralidade com base na estratificação populacional. A fim de evitar problemas com a estratificação populacional, os controles devem sempre ser selecionados da mesma população dos casos. A estratificação populacional pode ser ajustada para análise dos dados, mas alguns passos devem ser tomados para minimizar e antever os potenciais problemas nesse desenho de estudo. A combinação para sexo e outras variáveis dicotômicas com forte impacto no fenótipo pode ser também realizada para aumento de poder, pois isso reduz as contribuições não genéticas na variação do fenótipo. Um poder adicional pode advir de uma atenção extra para os casos com história familiar de determinada condição, conhecido com amostra enriquecida, mas isso ainda não está provado.

A proporção de controle e casos é uma questão dependente da disponibilidade de recursos. Pode existir opção entre o aumento da proporção de controles em relação aos casos, ao invés de manter a proporção de 1:1 e aumentar o número de pares de casos e controles. No entanto, o estudo é mais poderoso com um maior número de pares de casos e controles. Entretanto, para fenótipos como morte cardíaca súbita, em que os casos não estão necessariamente disponíveis para aumentar o número de pares de casos e controles, o aumento do número de controles para 2 a 3 vezes o número de casos pode contribuir para o aumento de poder estatístico. Esse aumento da proporção para 3:1, com mínimo aumento adicional de poder, pode ser pouco interessante em função dos custos de genotipagem. Se esses controles estiverem disponíveis, porém sem o custo adicional da genotipagem, não existe desvantagem no aumento do número de controles.

Os estudos de corte são mais difíceis e caros de coletar, já que envolvem a fenotipagem de uma grande população de indivíduos e, frequentemente, com longos períodos de seguimento para detectar os eventos. Esses estudos têm a vantagem de serem mais representativos da população e, por isso, com menos propensão aos vieses. Entretanto, a condição em estudo deve ser relativamente comum na população para um estudo com poder satisfatório, sendo de difícil aplicação nas doenças raras. Enquanto existe menor risco de viés de seleção entre casos e controles, pode haver redução da precisão ao mensurar os desfechos. Existe a vantagem de que os indivíduos podem ser examinados e acompanhados para diversos fenótipos diferentes, como foi realizado no estudo de Framingham (71).

Se o fenótipo é qualitativo, raro e tem baixa taxa de segregação nas famílias, um estudo de análise familiar pode ser muito útil. Entretanto, a agregação familiar pode ser devido ao compartilhamento dos mesmos fatores ambientais com raras variantes genéticas. Os estudos em famílias se baseiam na frequência de transmissão dos alelos dos pais heterozigotos aos indivíduos afetados em relação ao que seria esperado de forma aleatória. Existem métodos que analisam somente os componentes dentro das famílias e têm a vantagem de não necessitar da informação fenotípica dos pais e da estratificação populacional. Além disso, diversos métodos têm sido desenvolvidos para aumento de poder ao incorporar componentes dentro das famílias e entre famílias. Estudos em famílias são vantajosos na avaliação das doenças pediátricas, sendo a maior desvantagem o fato de averiguar os genótipos familiares. Além disso, todos os estudos de transmissão familiar são mais sensíveis a associações falso-positivas em função de erros de genotipagem do que estudos de indivíduos não relacionados (61).

As populações isoladas podem apresentar fortes efeitos fundadores em que a variação genética é reduzida e o desequilíbrio de ligação é aumentado. Essas amostras têm sido provadas como ferramentas de muito valor em identificar genes para fenótipos mendelianos através da análise de ligação em função da baixa heterogeneidade genética e ambiental. O valor em GWAS é menos importante, já que os tamanhos de amostra são menores, existe dúvida quanto à comparação com outras populações e o excesso de relação entre os indivíduos gera dificuldades analíticas.

A estratificação populacional também é conhecida por confusão por ancestralidade, a qual ocorre quando as amostras são compostas por subgrupos com

diferenças nas frequências alélicas, em função tanto das diferenças na ancestralidade como do excesso de relação entre os indivíduos com conseqüente diferenças fenotípicas. Isso pode confundir um estudo, resultando em achados falso-positivos e falso-negativos (72).

O poder para detectar uma associação com apoio estatístico suficiente para distinguir um resultado de um achado aleatório depende de tamanho da amostra, tamanho de efeito e cobertura da variação genética na análise genotípica. Em variantes comuns, o tamanho de efeito esperado é o risco relativo genotípico menor que 2, o que é consistente com o tamanho de efeito utilizado na maioria dos estudos de associação do genoma inteiro, sendo geralmente entre 1,1 e 1,5. As frequências alélicas menores na maioria dos GWAS variam entre 0,01 e 0,5, mas o poder para detectar efeitos é baixo na extremidade menor do espectro de frequências. A cobertura genômica reflete a proporção de todas as variantes genéticas em que as variantes genotipadas isoladamente ou de forma agregada (como haplótipos) funcionam como representante a um certo nível de desequilíbrio de ligação medido através de um coeficiente (r^2). O r^2 seria a proporção da variação de um polimorfismo explicado por outro polimorfismo.

A associação entre o fenótipo e o genótipo é avaliada através da comparação de padrões dos alelos entre os indivíduos com diferentes fenótipos. Todos os padrões de herança (aditivo, dominante ou recessivo) podem ser avaliados em testes de alelos individuais com 1 grau de liberdade, o que aumenta o poder estatístico para detectar efeitos que seguem um modelo, em especial, e também o número de hipóteses testadas. Dessa forma, a maioria dos estudos de fenótipos qualitativos com padrão de herança alélico desconhecido tem utilizado testes genotípicos genéricos ou testes aditivos de tendência alélica.

O teste genotípico geral compara a distribuição entre as frequências dos três genótipos (homozigoto dominante, homozigoto recessivo e heterozigoto) entre casos e controles e, frequentemente, utilizam testes de qui-quadrado de Pearson com 2 graus de liberdade ou teste exato de Fischer. O teste de tendência alélica assume um modelo de genética aditiva e testa se a angulação de uma linha de regressão com os três genótipos como variáveis independentes difere de zero e pode ser ajustada para covariância. O teste de tendência mais frequentemente utilizado é o teste de Cochran-

Armitage, enquanto o teste de qui-quadrado para frequência alélica menor não é recomendado (73).

Em fenótipos quantitativos, a inferência estatística é realizada utilizando tanto com uma regressão linear quanto com o ANOVA (baseado num modelo geral). Ambos os testes necessitam que o fenótipo apresente distribuição normal, o que pode ser alcançado por transformação (como \log_{10}), se o fenótipo é positivamente inclinado e ajustado para covariáveis relevantes.

Existe um grande problema em discussão a respeito dos testes múltiplos realizados nos GWAS. O *Wellcome Trust Case Control Consortium* estabeleceu um limiar de 5×10^{-7} baseado em cálculos de poder estatístico. Mostrou que, em um estudo com 2.000 casos e 3.000 controles, alcançou 80% de poder para detectar uma associação com esse limiar de significância para polimorfismos com uma frequência alélica menor superior a 0,05 e um risco relativo de 1,5. Além disso, houve uma queda para um poder de 43% para um risco relativo de 1,3 (50). O tamanho de efeito de um polimorfismo é calculado como o *odds ratio* ou risco relativo pelo genótipo em fenótipos qualitativos e como um coeficiente beta em um modelo de regressão, o que pode ser interpretado como o efeito de cada alelo adicional nos fenótipos quantitativos.

Em função das dificuldades em especificar o limiar de significância em GWAS e a ampla diversidade de potenciais erros metodológicos, a prova final da associação deve advir da replicação de polimorfismos significativamente associados em amostras independentes (69). Mesmo para polimorfismos perto de genes, que constituem fortes candidatos biológicos, ainda, é importante replicar a associação em amostras independentes a fim de aumentar a confiabilidade dos achados. A validação técnica implica em analisar novamente o polimorfismo associado em plataformas de genotipagem diferentes e fornecer evidência de que uma associação observada não ocorreu por erros sistemáticos de genotipagem.

Os estudos de associação do genoma inteiro não podem fornecer uma identificação inequívoca de genes causadores, mesmo se o polimorfismo associado está próximo ou em um gene. No entanto, diversos estudos de associação do genoma inteiro têm encontrado forte associação de determinadas regiões do genoma com diversos genes candidatos, enquanto outros encontraram regiões sem genes

conhecidos. Isso possivelmente ocorre em função de elementos regulatórios remotos, amplas regiões de desequilíbrio de ligação ou anotação incompleta do gene.

O primeiro passo na direção de identificar uma variante causal é examinar se o polimorfismo, que demonstrou a associação mais forte em um *locus* ou qualquer polimorfismo altamente correlacionado, pode ser um polimorfismo funcional. A informação sobre a função do polimorfismo relacionado a genes próximos está disponível em bancos de dados públicos como o dbSNP. Em segundo lugar, o mapeamento detalhado de polimorfismos adicionais sabidamente correlacionados no *HapMap*, acima de um determinado limiar, com o polimorfismo mais significativo em *locus*, pode ser realizado através do estreitamento do *locus* para resequenciamento e para análise dos polimorfismos funcionais associados.

A meta-análise é um estudo que agrupa múltiplos estudos para aumento de poder. Em GWAS, essa técnica tem identificado variantes comuns adicionais com menor efeito em diversos fenótipos, o que pode gerar novos pensamentos sobre a fisiopatologia. A maioria dos estudos inclui somente indivíduos do mesmo “continente ancestral”, e as meta-análises podem agrupar essas amostras com aumento significativo de poder (74).

1.3.2 Estudos de Associação do Genoma Inteiro (GWAS) em Camundongos

O objetivo principal do estudo genético em camundongos é o entendimento do mecanismo da doença humana. Existem diversos intercâmbios entre estudos em humanos e camundongos. O mais importante é destacar que os estudos em camundongos são limitados a modelos de doenças que são somente aproximações das doenças humanas.

Até recentemente, o cruzamento genético era a forma mais comum de desenho de estudo para identificar sequências variantes que contribuem com a variação fenotípica em camundongos. Num cruzamento, duas linhagens consanguíneas são acasaladas e sua prole é acasalada entre si (*intercross*) ou com uma linhagem progenitora (retrocruzamento). A prole da segunda geração é fenotipada e genotipada. Finalmente, um estudo de ligação é realizado para identificar uma região associada a um determinado fenótipo (75).

Essa técnica tem identificado milhares de QTLs para diversos fenótipos e doenças. Entretanto, cada *locus* de fenótipo quantitativo é uma região ampla, geralmente, dezenas de megabases e contém centenas de genes. O processo de identificar uma variante causal e o gene envolvido é caro e difícil. De milhares de QTLs identificados, somente uma pequena fração de genes tem sido identificada.

Esses resultados se comparam pobremente ao recente sucesso dos GWAS em humanos, que têm descoberto centenas de genes envolvidos em dezenas de doenças comuns (76). Entretanto, os estudos com camundongos demonstraram que os estudos de cruzamento necessitam de poucas centenas de animais para identificar *loci*, que, quando agregados, explicam 50% ou mais da variância fenotípica para um determinado fenótipo (77). Esse achado é impactante, se comparado aos estudos em humanos, os quais necessitam de milhares de indivíduos para identificar *loci* que estão envolvidos em um dado fenótipo.

Além disso, os *loci* identificados explicam somente uma pequena fração da variância fenotípica (78). Essas observações estimularam o desenvolvimento de novas formas de explorar a variação genética em camundongos para identificar as bases genéticas das doenças e dos fenótipos mapeados em humanos. Outrossim, os estudos com camundongos têm diversas vantagens em relação aos estudos em humanos, especialmente, acesso a tecidos relacionados às doenças, maior habilidade de controlar fatores ambientais e uma melhor caracterização de genes candidatos (79).

Diversas novas estratégias de cruzamento genético têm sido desenvolvidas em camundongos e complementadas pelas mesmas tecnologias utilizadas em humanos. Essas estratégias estão utilizando as técnicas de *microarray* (80,81) e as técnicas de sequenciamento, que estão possibilitando um mapeamento completo da variação genética em diversas linhagens de laboratório. Recentemente, o *Sanger Institute* sequenciou 17 genomas de camundongos e descobriu 71 milhões de polimorfismos (82), gerando um mapa completo da variação genética em camundongos.

Enquanto isso, o *Jackson Laboratory* em conjunto com a Universidade da Carolina do Norte, tem desenvolvido um *microarray* para genotipagem de camundongos conhecido por *Mouse Diversity Array*, o que mede 600.000 genótipos e pode ser aplicado em centenas de diferentes linhagens de camundongos de

laboratório (83). O resultado desses esforços é uma grande revolução no cenário da variação genética e novos pensamentos sobre a origem (84).

Em um esforço em separado, diversos programas de reprodução de camundongos em larga escala têm gerado linhagens consanguíneas com propriedades genéticas vantajosas para a realização de estudos genéticos. Além disso, existe um esforço para expandir a população de linhagens recombinantes e o desenvolvimento de novas linhagens, como desenvolvido pelo *Collaborative Cross Project* (85). Além disso, esforços recentes para caracterizar linhagens de camundongos comercialmente disponíveis têm provido uma alta resolução para o mapeamento de fenótipos complexos.

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas estratégias para estudos de associação do genoma inteiro em camundongos, através da maior disponibilidade de linhagens e ferramentas para sequenciamento em larga escala, genotipagem e fenotipagem. Essas estratégias diferem de acordo com a base genética do camundongo, que é incluído no estudo, a informação genética coletada e a forma como os fenótipos são mensurados. Essas técnicas identificaram *loci* envolvidos em diversas fenótipos complexos, como níveis de lipídios e triglicerídeos (15,86), densidade mineral óssea (16), condicionamento ao medo (17), proporção de albumina e creatinina na urina (86), pressão arterial (86), exercício e metabolismo (87) e susceptibilidade a doenças infecciosas (87).

A mais importante propriedade de um estudo de mapeamento genético é o cálculo antecipado do poder estatístico. O poder estatístico mede a probabilidade de detectar um efeito genético de um determinado tamanho, dado o número e o tipo de animais incluídos no estudo. De forma simples, o poder estatístico pode ser pensado como a probabilidade do estudo de descobrir um *locus* com certo efeito para um dado fenótipo. Por exemplo, um estudo com 90% de poder para detectar um *locus* de fenótipo quantitativo que explica 10% da variação encontrará um *locus* de fenótipo quantitativo dessa magnitude ou maior com uma probabilidade de 0,9, assumindo que esse QTL existe na população em estudo.

A medida da resolução do mapeamento mede o tamanho do intervalo identificado no estudo. A resolução afeta o número de genes que serão identificados como candidatos e associados ao fenótipo afetado pela variante. Uma baixa resolução significa que mais genes e variantes têm que ser testados para confirmar ou excluir o

seu papel na contribuição da variação fenotípica. Uma alta resolução significa que menos genes e variantes necessitam ser testados.

1.3.3 Linhagens Genéticas de Camundongos

A técnica de associação de linhagens consanguíneas gera um mapeamento com maior resolução quando comparado ao cruzamento genético comum. Isso ocorre em função da maior separação por diversas gerações entre os descendentes e os fundadores de cada linhagem consanguínea de camundongos. Essa relação mais distante gera diversos eventos recombinantes entre os genomas das linhagens fundadoras e, conseqüentemente, aumenta a resolução do mapeamento para aproximadamente 2 Mb (megabases), conforme publicado nos estudos iniciais.

Essa técnica tem diversas outras vantagens em comparação com os cruzamentos genéticos. Em primeiro lugar, as linhagens clássicas para o estudo de associação do genoma inteiro não necessitam de nenhum processo de reprodução, já que as linhagens utilizadas para a fenotipagem podem ser diretamente compradas de empresas como o *Jackson Laboratory*, reduzindo o tempo e o custo do estudo se comparadas ao cruzamento genético. Em segundo lugar, o uso das diversas linhagens clássicas em um estudo de associação do genoma inteiro aumenta a variação genética, pois inclui mais do que somente as duas linhagens parentais de um cruzamento. Em terceiro lugar, são estudos facilmente reprodutíveis, já que exatamente as mesmas linhagens podem ser utilizadas num estudo confirmatório, pois a estrutura genética de cada animal é idêntica ao estudo original. Finalmente, as linhagens consanguíneas são homocigotas em cada *locus*, aumentando o poder da associação, especialmente para os *loci* recessivos.

O primeiro estudo de associação com linhagens consanguíneas ganhou interesse ao aplicar técnicas em maior escala. Esse interesse gerou o desenvolvimento do *Mouse Phenome Project* (88), um projeto do *Jackson Laboratory* que tem por objetivo criar um amplo catálogo de fenótipo para cada linhagem consanguínea. Atualmente, a maioria das linhagens estão genotipadas ou sequenciadas e seus genótipos estão disponíveis em bases de dados públicas (82). Dessa forma, os pesquisadores não necessitam obter os genótipos experimentalmente.

Na época do primeiro estudo com linhagem consanguínea, parecia que essa estratégia tinha poder adequado para identificar a variação genética relacionada a um determinado fenótipo. Entretanto, agora se entende que diversas associações identificadas foram causadas pela estrutura populacional. Os diferentes graus de relação entre as linhagens geraram associações falso-positivas (89).

Um desafio em GWAS em camundongos é o complexo relacionamento entre as linhagens incluídas no estudo. Algumas dessas diferenças vêm de origens ancestrais distintas, como as diferenças entre linhagens derivadas de camundongos selvagens e linhagens clássicas, as quais são descendentes de um camundongo domesticado (84). Além disso, entre as linhagens, existe variabilidade no grau em que cada região específica do genoma é compartilhada em função do complexo processo de reprodução.

Os testes de associação estatística assumem que os fenótipos dos indivíduos na associação são independentes. Entretanto, em função do complexo relacionamento genético, esse conceito é violado nos estudos de associação do genoma inteiro em camundongos. Linhagens intimamente relacionadas vão apresentar fenótipo mais semelhante, quando comparadas às linhagens mais distantes. Esse fenômeno é conhecido por estrutura populacional, o qual gera associações espúrias. Recentemente, métodos de análise estatística têm sido desenvolvidos para corrigir esse problema, especialmente, o *Efficient Mixed-Model Association* (EMMA) (90).

Enquanto os estudos de associação clássica têm vantagens como resolução, custo, cobertura e reprodutibilidade, a principal fraqueza era a falta de poder para associação do genoma inteiro e falha em conduzir a estrutura populacional. Uma extensão do desenho de estudo com linhagens consanguíneas clássicas é o HMDP (15). O HMDP aumenta o poder estatístico dos estudos de associação clássica ao incluir um grupo de 70 linhagens recombinantes de camundongos no painel de mapeamento. Nesse desenho, aproximadamente 100 linhagens são fenotipadas (30 linhagens consanguíneas clássicas e 70 linhagens recombinantes) e a associação é realizada após a correção para estrutura populacional utilizando o EMMA. A resolução do mapeamento de um estudo de associação que utiliza somente linhagens recombinantes é menor que um estudo que utiliza linhagens consanguíneas clássicas.

Entretanto, a utilização de uma população combinada incluída no HMDP gera um elevado poder estatístico (das linhagens recombinantes) e uma elevada resolução (das linhagens consanguíneas clássicas). O conjunto de linhagens incluído no HMDP foi determinado através de simulação de cálculos de poder (90). O HMDP tem uma resolução aproximada de 2 Mb de tamanho de intervalo.

Em função do fato de que todas as linhagens são consanguíneas, mantém-se a mesma vantagem que advém dos estudos com somente linhagens clássicas consanguíneas como custo, cobertura e reprodutibilidade. Uma limitação do HMDP é o número de linhagens consanguíneas, especialmente recombinantes. É bem provável que o número máximo de linhagens nesse tipo de estudo varia entre 200 e 300, mesmo se todas as linhagens atualmente disponíveis forem utilizadas, sendo o limite superior de poder estatístico do HMDP.

O painel HMDP com 8-10 animais por linhagem tem aproximadamente 80% de poder em detectar *loci* que correspondem por aproximadamente 5% da variância de um fenótipo. A técnica do HMDP tem estudado uma grande variedade de fenótipos como níveis de lipídeos (15), densidade mineral óssea (16) e condicionamento ao medo (17). Esses estudos destacam a vantagem do aumento da resolução, permitindo a identificação de genes em determinados *loci*, como a previamente conhecida apolipoproteína A2 (*Apoa2*) no colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade) (15) e a nova associação com o *additional sex combs-like 2* (*Asxl2*) com densidade mineral óssea (16).

O *Collaborative Cross* é um esforço em larga escala para criar um conjunto de linhagens consanguíneas recombinantes que serão construídas exclusivamente para os estudos de mapeamento de fenótipos complexos e para aplicação nas técnicas de análise dos sistemas biológicos para genética dos camundongos (85,87,91). Diferente do HMDP, que consiste nas linhagens atualmente disponíveis, o *Collaborative Cross* tem gerado novas linhagens consanguíneas utilizando um plano específico de reprodução. A linhagem consanguínea recombinante tem sido derivada de oito linhagens fundadoras com o objetivo de produzir animais que têm, em média, uma mesma combinação de ancestralidade de cada fundador. Cinco dos fundadores são de linhagens consanguíneas clássicas e três são de linhagens selvagens. As linhagens consanguíneas clássicas não possuem variantes em muitos genes. Então, o uso de linhagens selvagens geraria um aumento substancial na quantidade da

diversidade genética no *Collaborative Cross* e a vantagem ao cobrir uma maior variação quando comparado a outras estratégias. Provavelmente existem mais variantes nos genes que perturbam fenótipos de interesse. O *Collaborative Cross* tem uma segunda vantagem, que seria o fato de apresentar menos estrutura populacional em comparação com as outras estratégias. Mesmo que existam técnicas, como o EMMA, que corrigem para estrutura populacional, a presença da estrutura populacional continua representando um efeito negativo no poder estatístico.

Tem ocorrido uma intensa atividade relacionada ao *Collaborative Cross*, já que as primeiras linhagens estão próximas de estarem disponíveis (92,93). Embora as linhagens disponíveis pelo *Collaborative Cross* ainda não estejam disponíveis, alguns estudos vêm utilizando formas incompletas de linhagens consanguíneas do *Collaborative Cross*. Um estudo publicado recentemente mapeou de forma bem-sucedida diversos fenótipos hematológicos (94).

O número limitado de linhagens consanguíneas que estão atualmente disponíveis ou que podem ser geradas por esforços como o *Collaborative Cross* colocam um limite no poder estatístico que pode ser alcançado em um estudo genético com camundongos que utiliza linhagens consanguíneas. Uma estratégia é o uso de camundongos não consanguíneos.

Esses estudos incluem estoques heterogêneos de camundongos (95). Esses estoques podem ser utilizados em estudos de associação do genoma inteiro em camundongos. Os estoques heterogêneos utilizam animais descendentes de oito linhagens consanguíneas fundadoras e o *Diversity Outbred Mice* (96), que compreende animais descendentes de oito linhagens fundadoras do *Collaborative Cross*. Ambos os estoques heterogêneos e o *Diversity Outbred Mice* são similares em relação aos animais F2 gerados em um cruzamento, mas eles têm a ancestralidade de oito linhagens fundadoras, ao invés de somente duas. Além disso, a população é reproduzida por mais gerações.

A principal vantagem dos estoques heterogêneos é que podem ser utilizados para gerar um número ilimitado de animais, possibilitando uma maior amplitude de estudos e podendo encontrar efeitos genéticos mais sutis. Além disso, em função do histórico de reprodução, os animais têm sido submetidos a um maior número de eventos de recombinação, com uma resolução de mapeamento de aproximadamente 3 Mb para um QTL típico.

Entretanto, diferente de linhagens consanguíneas, cada estoque heterogêneo é único e não tem o mesmo fenótipo e a mesma reprodutibilidade oferecidos pelas linhagens consanguíneas. Além disso, não tem disponibilidade dos genótipos. A estrutura populacional nos estoques heterogêneos complica a análise e reduz o poder. Um amplo estudo com mais de 2.000 camundongos não consanguíneos utilizaram uma extensiva estratégia de fenotipagem (95).

Esse estudo disponibilizou uma descrição da estratégia do uso dos estoques heterogêneos para um GWAS em camundongos. Um total de 101 fenótipos foram mensurados, incluindo fenótipos comportamentais, fenótipos relacionados a doenças comuns, bioquímica e fenótipos relacionados a hematologia e imunologia. Esse estudo foi bem-sucedido em relacionar *loci* na maioria dos fenótipos (95).

Uma fonte alternativa de estoques heterogêneos está disponível através de empresas especializadas. Esses animais têm uma estrutura genética que difere dos estoques heterogêneos cuidadosamente construídos pela técnica descrita anteriormente. Muitas dessas empresas têm amplas colônias que são mantidas por diversas gerações, embora sejam descendentes de um pequeno número de linhagens consanguíneas clássicas.

Uma caracterização recente dessas populações tem mostrado que alguns desses estoques tem propriedades adequadas para um mapeamento de alta resolução ao longo de várias gerações, desde o fundador do estoque. De fato, alguns estoques podem alcançar uma resolução com tamanho de intervalo de menor de 100 Kb.

A presença de grandes diferenças nas frequências de alelos entre as populações significa que nenhuma população não consanguínea de um estoque comercial é ideal. Contudo, também significa que se houver falha no mapeamento de uma população, o mapeamento de uma segunda população pode ser bem-sucedido em função das diferenças no desequilíbrio de ligação.

As populações diferem entre si, gerando um histórico populacional único em cada estoque, porém a vasta maioria da variação presente no animal é derivada de diferenças genéticas presentes nas linhagens consanguíneas fundadoras. Esse conhecimento mostra ser possível obter informação genotípica acurada para cada

animal através da coleta de algumas centenas de marcadores e da aplicação do sistema de imputação (97,98).

Camundongos comerciais não consanguíneos foram recentemente utilizados para mapear variantes associadas a colesterol HDL, pressão arterial sistólica, níveis de triglicerídeos, glicose e proporção albumina-creatinina urinária (86). Além disso, simulações baseadas em um painel de camundongos utilizados no mapeamento mostram que a maioria dos picos com associações está dentro dos limites de 500 kb da variante causal.

A diferença-chave dos novos GWAS em camundongos é que algumas estratégias utilizam linhagens consanguíneas, como o HMDP ou o *Collaborative Cross*, enquanto outros utilizam animais não consanguíneos, como estoques heterogêneos e animais comercialmente disponíveis.

As linhagens consanguíneas têm a vantagem da homozigose genômica e a completa reprodutibilidade das medidas do fenótipo. De fato, se o fenótipo apresenta baixa hereditariedade ou se a análise da medida apresenta muito ruído, múltiplos animais geneticamente idênticos podem ser mensurados para obter uma estimativa acurada do fenótipo em cada linhagem. Essas medidas podem ser combinadas com quaisquer outras medições no mesmo grupo de linhagens, resultando num conjunto mais amplo de fenótipos.

Entretanto, o número de linhagens consanguíneas disponíveis é limitado. Se as variantes a serem identificadas apresentarem tamanhos de efeito suficientemente pequenos, mesmo utilizando todas as linhagens consanguíneas apresentará um poder limitado. Dessa forma, o único método prático é a utilização de um amplo número de animais não consanguíneos.

A consideração final consiste em definir se é preferível utilizar uma população especialmente construída para estudos de mapeamento, como o *Collaborative Cross* e estoques heterogêneos, ou se é melhor utilizar recursos disponíveis atualmente que não foram construídos especificadamente para mapeamento, como o HMDP.

Em geral, cada população de camundongos apresenta vantagens particulares, como menor quantidade de estrutura populacional e maior controle sobre o nível de diversidade genética. Entretanto, a resolução é vinculada ao número de eventos de

recombinação, a qual pode ser limitada para populações de camundongos específicas que foram construídas recentemente para determinado estudo.

1.3.4 Definição de Genes Candidatos

Existem três formas comuns de provar o envolvimento de um gene ou de uma variante genética num fenótipo complexo. A primeira forma é a hemizigose recíproca, a qual foi desenvolvida em leveduras (um par de linhagens F1) gerada com um alelo mutante de um gene de interesse em um cromossomo e a deleção desse gene no cromossomo homólogo, para que seja possível analisar o efeito genotípico do alelo. Os alelos mutantes diferem entre as duas linhagens F1, e a diferença fenotípica entre elas implica o gene a um determinado fenótipo.

A segunda técnica é a complementação quantitativa, que foi desenvolvida a partir da *Drosophila melanogaster* (99). Quando utilizado em camundongos, esse método utiliza um par de linhagens para portar diferentes alelos de um *locus* oriundo de um GWAS em camundongos.

Esse par de linhagens é, então, reproduzido com uma linhagem *knockout* para um determinado gene e com a linhagem originária desse *knockout*. Dessa forma, quatro linhagens F1 são geradas e seus fenótipos são analisados para testar uma interação entre o alelo nulo e o *locus* de fenótipo quantitativo. Uma interação significativa indica que a interação entre os alelos do gene é responsável por aquele *locus* de fenótipo quantitativo.

A terceira técnica é encontrar um enriquecimento de variantes raras e com baixas frequências em genes candidatos nos casos em relação aos controles, como determinado através do resequenciamento de genes candidatos. Essa estratégia foi desenvolvida para estudos em humanos e tem identificado de forma bem-sucedida variantes genéticas humanas que são associadas ao diabetes do tipo 1 (100) e à doença de Crohn (101).

Até hoje, esses três métodos não têm sido amplamente utilizados no estudo da genética dos camundongos. A hemizigose recíproca necessita de uma complexa manipulação genômica que é quase impossível de utilizar em camundongos. A complementação quantitativa é tecnicamente possível e tem sido implementada (102,103), mas necessita de linhagens selvagens com a mesma origem genética, o

que pode ser difícil de obter em camundongos. A maior parte dos *knockouts* são ainda criados numa linhagem 129 e retrocruzada numa linhagem diferente (geralmente C57BL/6). Dessa forma, nenhuma linhagem selvagem pura com a mesma origem genética está disponível. Finalmente, o resequenciamento de genes candidatos requer a busca de milhares de indivíduos não relacionados, e isso não é uma opção nos estudos genéticos com camundongos.

Uma alteração em um gene alvo refere-se à inativação experimental de um gene para investigar a sua função em determinados organismos. Em um animal *knockout*, geralmente, camundongos, o gene em estudo é inativado na fase germinativa através da quebra do gene. Os efeitos podem ser estudados em diferentes estágios embrionários e após o nascimento.

Esse conhecimento pode ser utilizado para entender os efeitos das mutações nos genes humanos homólogos, como identificado em doenças genéticas humanas. Uma variante do *knockout* é conhecida como variante *knock-in*. Nesse caso, a sequência alvo contém um gene normal, que é introduzido por adição ou em substituição do gene a ser estudado.

No preparo de células tronco embrionárias numa mutação *knockout* o gene alvo é “quebrado” (*knockout*) em leveduras ou células tronco embrionárias através de recombinação homóloga com um alelo não funcional produzido artificialmente. O isolamento de células tronco embrionárias com o gene “quebrado” necessita de seleção positiva e negativa. Um gene de bactéria que confere resistência à neomicina (neoR) é introduzido no DNA do alelo artificial, sendo parcialmente clonado do gene normal alvo (104,105).

Num camundongo transgênico, uma cópia do gene alvo é substituída por um gene alterado durante a fase germinativa. Na primeira etapa das células tronco embrionárias, as células de um blastocisto do camundongo são isoladas após 3,5 dias de gestação (de um total de 19,5 dias de gestação) e transferida para uma cultura de células irradiadas que são inaptas em se dividir. As células tronco embrionárias heterozigotas para a mutação *knockout* são adicionadas.

Essas células tronco embrionárias são derivadas de um camundongo que é homozigoto para uma cor (preto) diferente daquele camundongo que vai gerar o blastocisto (branco). As células tronco recombinantes são injetadas no blastocisto do

receptor. Os embriões precoces são transplantados para um camundongo pseudogestante. Esses descendentes possuem células normais e células com um gene alterado. O camundongo transgênico pode ser reconhecido pela cor branca com pontos pretos. Esses camundongos são, então, cruzados com um camundongo homozigoto para a cor branca da geração anterior. Os descendentes pretos desse acasalamento são heterozigotos para o gene mutante. Através de reprodução subsequente, alguns dos seus descendentes (*knockouts*) são homozigotos para o gene mutante e são identificados através da cor (104).

Os geneticistas têm aplicado testes menos rigorosos para estabelecer a causalidade de genes candidatos em QTLs. Um teste simples é se o *knockout* de um gene candidato apresenta um fenótipo anormal (106). Deve ser observado que isso não prova que o QTL atua no gene ou através de determinado gene. Um alelo *knockout* é raramente o mesmo que a variante do alelo em um QTL. Dessa forma, a identificação de que um *knockout* tem algum efeito no fenótipo não prova o efeito desse gene candidato. Quase todas as variantes atuam em QTLs de forma muito sutil, especialmente, através do aumento ou da redução do transcrito. Além disso, fenótipos contrastantes podem ser atribuídos a diferentes alelos num mesmo gene (107).

Dessa forma, seria errado esperar a completa remoção de um transcrito como modelo de um efeito de um QTL. Alguns fenótipos, como altura ou peso, são influenciados por diversos genes, já que mais que 1/3 de todos os *knockouts* poderiam exibir um fenótipo. De fato, confiar em *knockouts* para associar um gene a um determinado QTL pode gerar tanto resultados falso-negativos como falso-positivos. Os resultados falso-positivos podem ocorrer se o gene deletado não é o gene responsável pela variante que causou o sinal da associação observada em um QTL, mas apresenta um efeito no fenótipo. Os resultados falso-negativos podem ocorrer se o gene deletado aporta a variante causal, mas não compartilha do mesmo fenótipo.

Uma forma alternativa de identificar genes relevantes é um processo trabalhoso de geração de linhagens congênicas (108) que são especialmente desenvolvidas para o mapeamento fino de uma determinada região. Entretanto, essas técnicas têm gerado poucas associações e somente são bem-sucedidas, quando o efeito do gene no fenótipo é muito robusto. Existe perspectiva do desenvolvimento de técnicas alternativas para identificar QTLs com resolução de ordem de magnitude superior do

que nos estudos de ligação. Dessa forma, seria facilitada a identificação de genes ou variantes causais.

Entretanto, mesmo com essas novas estratégias, a resolução dos estudos genéticos com camundongos é inferior aos estudos genéticos em humanos. Frequentemente, os investigadores analisam uma associação entre a expressão diferencial de um gene e o fenótipo de interesse como forma de vincular esse gene a um fenótipo. Entretanto, diversos outros métodos podem ser desempenhados, como através de um modelo estatístico comparativo, em que a variação genética que contribui para a variação do transcrito pode contribuir para uma variação no fenótipo através de modelos alternativos não causais (109). Essa técnica pode ser expandida de forma que toda a rede de transcritos esteja associada ao fenótipo.

Na maioria dos casos, os investigadores utilizam um método composto para encontrar genes. Esse método é conhecido por “caixa de ferramentas em bioinformática”, em que os dados de uma sequência, expressão e literatura publicada são sintetizados para aumentar a probabilidade de que um gene causal seja encontrado (110). Esse método ainda precisa ser rigorosamente testado. Um estudo avaliou a eficácia da incorporação de dados de expressão para genes isolados em determinados QTLs, através de 37 estudos, e demonstrou que esse é um método com sucesso limitado (111).

1.3.5 Os Sistemas Genéticos

Os GWAS têm identificado milhares de *loci* que contribuem com doenças comuns em humanos. Entretanto, os genes em cada *locus* podem ser individualmente testados em culturas de células ou em modelos animais e o mecanismo em um determinado fenótipo pode ser definido através de técnicas de biologia molecular (112). Entretanto, essa análise dos mecanismos subjacentes pode ser desafiadora. A maioria dos *loci* que tem sido identificada para doenças comuns mostra um efeito modesto, que pode ser difícil de ser reproduzido de forma experimental. Está claro que, nos estudos que utilizaram organismos experimentais, a variação fenotípica natural geralmente resulta de diversos alelos interagindo em um contexto que é sensivelmente dependente de condições ambientais (113–115).

Uma forma complementar e alternativa seria, através do estudo de um *locus* de cada vez, para realizar uma análise global de moléculas biológicas em populações

que possuam variações entre os indivíduos em determinados fenótipos clínicos. Avanços tecnológicos recentes têm demonstrado que é possível quantificar centenas e milhares de moléculas, desde sequências de variações no DNA até marcadores epigenéticos de determinados níveis de transcrição, proteínas e metabólitos.

Por exemplo, parece ser relativamente simples quantificar níveis de transcrição em tecidos, assumindo que determinados tecidos estão disponíveis, através de técnicas de hibridização ou tecnologias de sequenciamento. Os níveis de transcrição podem ser testados para determinadas correlações com o fenótipo clínico ou mapeados em *loci* de cromossomos, para identificar variantes funcionais que podem contribuir para um determinado fenótipo clínico. Os níveis de transcrição podem ser considerados fenótipos intermediários, uma vez que a variação no DNA pode contribuir para um fenótipo clínico através da perturbação na expressão de genes, proteínas e metabólitos.

Além disso, esses fenótipos moleculares são dinâmicos e podem ser reativos a determinados fenótipos. A vantagem dessa análise da genética de sistemas é que permite uma análise das interações moleculares num contexto relevante para o fenótipo clínico, mais conhecido por perturbação genética. Ao contrário do que ocorre numa perturbação genética individual (como nos modelos transgênicos), as perturbações genéticas múltiplas são um fenômeno, que ocorre naturalmente nas populações.

Esse é o ponto fundamental da perspectiva de genética de sistemas, cujas inferências sobre fenômenos biológicos são raramente separadas do sistema genético em que estão inseridos. Dessa forma, para a generalização dos resultados, através de diversas origens genéticas, os experimentos devem ser realizados em múltiplas linhagens com componentes genéticos diferentes.

Além de doenças comuns, a genética de sistemas gera uma arquitetura geral de fenótipos complexos organizadas num processo de informação biológica. Entretanto, a genética de sistemas enfrentou diversas questões acerca dessa arquitetura molecular genética de fenótipos complexos. Uma das questões foi como ocorre a variação funcional nas populações, como ocorre o fluxo da informação desde o DNA até o fenótipo e como é a natureza das interações do gene com os fatores ambientais.

A genética de sistemas é limitada pela extensão da natureza da variação genética. Entretanto, pode ser combinada com experimentos complementares e banco de dados, como em camundongos transgênicos, através de uma pequena interferência de RNA (*siRNA*) e de modelos preditores. Isso gera um profundo detalhamento do mapeamento da interação do genótipo com o fenótipo (116,117).

A genética de sistemas compartilha uma perspectiva global e holística com os sistemas biológicos. Essa estratégia típica nos sistemas biológicos se baseia em perturbar o sistema, monitorar as respostas, integrar os dados e formular modelos matemáticos que descrevem o sistema. A genética de sistemas é um tipo específico de biologia de sistemas, em que a variação genética dentro de uma população é utilizada para perturbar o sistema. Em última análise, o objetivo da genética de sistemas é o entendimento dos mecanismos moleculares amplos, como a arquitetura, e dos fenótipos intermediários fisiológicos de fenótipos complexos, como as doenças.

Em um estudo hipotético de genética de sistemas, diversos indivíduos são avaliados para um dado fenótipo clínico, níveis de transcrição, proteínas e metabólitos em tecido relevante. As variações dos fenótipos moleculares podem se relacionar umas com as outras e com os fenótipos clínicos de diversas formas.

Uma simples correlação gera evidência de uma possível relação entre dois fenótipos (118,119). Pode-se postular três possíveis explicações: fenótipos moleculares influenciam um fenótipo clínico (ou seja, o fenótipo molecular é o causador do fenótipo clínico), o fenótipo clínico influencia o fenótipo molecular (ou seja, o fenótipo molecular é reativo ao fenótipo clínico), ou ambos são afetados por um fator confundidor (ou seja, o fenótipo clínico e o fenótipo molecular são independentes).

O mapeamento genético pode gerar evidência de um relacionamento através de um comapeamento. Dessa forma, um fenótipo molecular e um fenótipo clínico estão mapeados numa mesma região do genoma. Então, provavelmente um é causador do outro.

Além disso, existem alguns modelos estatísticos que podem ser utilizados para integrar os dados. Por exemplo, diversas técnicas de rede, como de coexpressão, podem identificar grupos de fenótipos moleculares que compartilham dos mesmos

fenótipos. Esses grupos, conhecidos por módulos, podem ser testados para relações com fenótipos clínicos.

No delineamento de um estudo de genética de sistemas existem diversas considerações. É importante examinar um número suficiente de indivíduos para que exista um poder adequado para o mapeamento genético e para outras análises. A resolução do mapeamento é também uma questão importante, já que o objetivo final é relacionar elementos genéticos específicos às alterações dos fenótipos clínicos e moleculares.

Se o *locus* é amplo e contém muitos genes, como nos casos de QTL em camundongos e ratos, então, é difícil identificar variação genética causal subjacente. Além disso, a estrutura populacional pode ter efeitos consideráveis na arquitetura de fenótipos complexos. Por exemplo, uma coleção de linhagens consanguíneas da *Drosophila melanogaster* gerou um conjunto diferente de QTLs para determinado fenótipo quantitativo comparado ao estudo em uma população não consanguínea que era derivada das mesmas linhagens. Entretanto, existia uma significativa sobreposição de redes subjacente a esses fenótipos (115). Os estudos de genética de sistemas estão se tornando, cada vez mais, ferramentas poderosas ao analisar fenótipos adicionais, escalas biológicas múltiplas, condições ambientais e alterações ao longo do tempo.

Não é possível coletar dados nessa magnitude em poucos indivíduos. Dessa forma, são utilizadas grandes populações renováveis, como leveduras, moscas, minhocas, camundongos e ratos. Existem diversos novos estudos experimentais, como análises de segregação em massa, que envolvem a análise de indivíduos com fenótipos extremos oriundos de grandes populações de indivíduos fenotipados (120).

1.3.6 Expressão Gênica

A análise dos níveis de transcrição é um método simples, sendo, rotineiramente, utilizado através de técnicas de *microarray* ou micro arranjo ou através de métodos de sequenciamento massivo de RNA (*RNA-seq*). Os níveis de transcrição, de forma semelhante a outros fenótipos quantitativos (como altura), podem mapear *loci* que explicam variações no genoma. Esse estudo pode ser realizado através de análise de ligação em populações segregadas ou em estudos de associação do genoma inteiro. Embora o mapeamento de níveis de expressão já seja realizado,

desde a década de 80, o primeiro mapeamento dos níveis de expressão no genoma inteiro foi realizado, no ano de 2002, através de uma análise de ligação de uma cruz entre duas linhagens de levedura (121).

Os resultados demonstraram uma ampla variedade de transcritos reguladores. Estudos subsequentes com bactérias, leveduras, plantas, minhocas, peixes, moscas e diversos tipos celulares e tecidos de camundongos, ratos e humanos aumentaram o entendimento da regulação genética da expressão gênica. Além disso, têm mostrado que variações genéticas que afetam a expressão gênica são amplamente distribuídas nas populações naturais (15,121–124).

As regiões do genoma, que estão associadas aos níveis de transcrição, são conhecidas por *locus* de fenótipo quantitativo de expressão (*expression quantitative trait locus* ou eQTL). Quando um eQTL está próximo de uma região de um gene que codifica um transcrito (frequentemente ≤ 1 Mb), é conhecido por eQTL local. Essa proximidade indica que essa variação provavelmente atua na expressão do gene numa forma *cis* (ou seja, somente na cópia do cromossomo que está residindo). O eQTL local é, portanto, também conhecido por *cis*-eQTL. Pode também ocorrer que um eQTL local atue em *trans*, ou seja, quando um *locus* que afeta os níveis de expressão de um transcrito é mapeado distalmente ao gene que codifica esse determinado transcrito (como um gene num outro cromossomo). Isso é conhecido por eQTL distal ou *trans*-eQTL. Ao contrário dos *loci* que atuam em *cis*, os *loci* que atuam em *trans* afetam, frequentemente, os dois alelos do gene alvo de forma equivalente. Em alguns casos, *loci* podem estar afetando a expressão de centenas de genes e esses eQTL são conhecidos por bandas *trans* ou pontos quentes (125).

Os estudos que utilizam células e tecidos de camundongos, ratos e humanos têm demonstrado a expressão de um alto percentual de genes ($\geq 30\%$) influenciado de forma importante por eQTLs (124,126,127). A maioria dos polimorfismos destacados em mapas de GWAS fora de regiões codificadoras de proteínas e mais de 75% dos polimorfismos mapeados como elementos reguladores têm sido identificados através do projeto da *Encyclopedia of DNA Elements* (ENCODE) (128).

Esses resultados sugerem que variantes genéticas que alteram a expressão gênica, ao invés de alterar a sequência de proteínas, formam as bases primárias de variação natural em fenótipos complexos. Isso contrasta com os distúrbios

mendelianos, em que predominam as variações nas regiões codificadoras de proteínas.

Os estudos de eQTL em transcritos não codificadores têm emergido, como microRNAs (129) e amplas regiões não codificadoras de RNA entre os genes (130). Parece que o grau de variação genética subjacente aos níveis desses transcritos é menor que o observado em proteínas codificadoras de RNA.

1.3.7 Interações Genéticas

A maioria dos estudos sobre fenótipos quantitativos em modelos animais sugere que interações epistáticas (ou seja, não aditivas) entre os *loci* são largamente distribuídas (131), e vários exemplos de interações “gene-em-gene” em fenótipos complexos têm sido identificados. A grande amplitude de variações fenotípicas patológicas que ocorrem nos indivíduos com distúrbios mendelianos representa uma forma de epistasia.

Essa variação é frequentemente observada em estudos que utilizam camundongos transgênicos para genes alvos em que a mutação completa é letal dependendo da origem da linhagem (132). Em populações naturais, as diversidades das variações comuns são forçadas por seleção, de tal forma que a maioria das combinações dos alelos devem ser compatíveis com funcionamento adequado, mas são ainda suficientes para adaptação em ambientes em transformação (133).

No nível molecular, a epistasia pode tomar diversas formas. Um mecanismo comum se preocupa com a dependência de um estado estável dos níveis de moléculas sobre as suas taxas de produção e degradação. Por exemplo, em recente GWAS humano entre indivíduos que consomem álcool, a incidência de câncer de esôfago envolveu uma interação genética forte entre os *loci* que contribuem com a produção de acetaldeído (que é carcinogênico) do álcool com aquelas que contribuem para a degradação do acetaldeído (134).

Outro exemplo envolve a formação de complexos moleculares, em que os níveis finais do complexo são limitados por um componente abundante. Por exemplo, um estudo de genética de sistemas analisa os níveis de transcritos e níveis de proteínas no fígado do camundongo através de um painel de linhagens de camundongos. Esse estudo observou que as correlações entre os transcritos e as proteínas são mais fracas em proteínas com múltiplas subunidades do que em

homopolímeros (135). De forma específica, a correlação entre os níveis de proteínas ribossômicas com aquelas transcritas foi essencialmente nula. Esse resultado esperado resulta do fato de que qualquer excesso de proteínas, que não foi construído pelos ribossomos, é rapidamente degradado.

Uma vantagem da genética de sistemas para a análise das interações entre os genes é a de que centenas ou milhares de fenótipos moleculares (como níveis de transcrição) podem ser analisados em uma população única. Entretanto, nesses estudos de mapeamento global, a identificação das interações em múltiplos *loci* é difícil em função do baixo limiar de significância que resulta de comparações múltiplas (136).

Essa questão tem sido resolvida, através da restrição da análise para QTLs que apresentam efeitos principais significativos, o que pode deixar de lado a maioria das interações epistáticas. Embora existam novos métodos de computação para identificar interações entre os genes (137), continua difícil determinar a importância da interação entre os genes em conjunto de dados de grandes dimensões. Além do problema das comparações múltiplas, as interações entre os genes são difíceis de detectar em populações não consanguíneas, especialmente, em alelos que possuem efeitos pequenos ou em baixas frequências (138).

Um estudo recente utilizando uma cruz entre duas linhagens de levedura gerou uma estimativa da importância das interações epistáticas em 46 fenótipos complexos herdados (139). Os autores realizaram um desfecho massivo para análise do tamanho da colônia, a qual foi realizada através de uma ampla diversidade de condições (como diferentes pH, tipos de nutrientes e temperaturas) para o desenvolvimento de determinados fenótipos.

Os QTLs identificados explicaram praticamente toda a contribuição aditiva para a variação dos fenótipos herdados. Os autores quantificaram a epistasia através da diferença entre a hereditariedade em sentido amplo (que é estimada através da reprodutibilidade dos fenótipos medidos) e a hereditariedade de senso estrito (que é estimada através da similaridade fenotípica para diferentes graus de relação). Eles observaram que os fenótipos demonstraram que a epistasia variou de quase zero até 50%.

Os resultados têm implicações no problema da hereditariedade ausente, já que as interações epistáticas afetariam a estimativa da hereditariedade (136). O nível das interações, nesse estudo, poderia ser limitado em comparação aos estudos com

mamíferos, já que as leveduras são haploides e as interações fisiológicas poderiam ser mais complexas em organismos multicelulares.

A maior parte dos fenótipos complexos apresentam um significativo componente ambiental, sendo que as interações dos genes com o ambiente parecem ser difusas (21,131). De fato, quase todas as doenças comuns resultam da combinação de fatores genéticos e ambientais. A frequência e a natureza das interações entre os genes e o ambiente podem ser convenientemente estudadas através da análise global da expressão gênica.

Os estudos em leveduras (140), humanos (141), células endoteliais (127) e macrófagos de camundongos (126) observaram uma alta frequência de interações entre os genes e o ambiente. As alterações ambientais são muito mais propensas em modular o efeito de um eQTL distal em comparação a um eQTL local. Por exemplo, um estudo analisou a expressão de um gene em macrófagos peritoneais em 10 linhagens de camundongos em cultura isolada ou em cultura, que continha um mediador inflamatório de uma bactéria lipossacarídea (126).

De um total de 2.802 eQTL significativos detectados, 2.607 (93%) mostraram evidência significativa de interações dos genes com o ambiente. Nesse estudo, um exemplo impressionante de interação entre o gene e o ambiente foi o achado de “pontos quentes”, que regulavam centenas de genes nos macrófagos somente quando eram estimulados por polissacarídeos (126).

O fato de que as interações dos genes entre si e com o ambiente parecem ser extremamente comuns tem implicações no GWAS humano, pois essas interações podem levar a um aumento da estimativa da taxa de hereditariedade (136). Já que os estudos em humanos apresentam baixo poder para identificar essas interações, modelos experimentais serão essenciais para um entendimento mais amplo.

As análises dos sistemas biológicos por modelos matemáticos entre os fenótipos moleculares têm sido desenvolvidas para entender como eles interagem entre si e influenciam os fenótipos complexos (142,143). As análises em rede têm sido muito informativas. Redes são representações gráficas de interações entre os fenótipos moleculares. As moléculas são representadas por pontos e a relações entre elas como linhas. Essas análises podem ser divididas em três categorias: aquelas baseadas no conhecimento atual, como rotas metabólicas, oriundas de dados experimentais, com base nas interações físicas, como entre proteínas de leveduras, e dados inferidos através de análises massivas.

Embora essas rotas possam analisar de forma experimental o conhecimento, geralmente, não são abrangentes. Para descobrir novos relacionamentos e interações regulatórias, existem novos métodos de construção de redes através de diversos algoritmos. Esses algoritmos podem ser baseados em modelos de regressão, teoria da informação, correlação linear e não linear, maximização da entropia, modelos gráficos gaussianos, redes bayesianas ou uma combinação de todas essas (144). {Citation}

A avaliação desses conhecimentos, que são disponibilizados, através desses métodos, ainda continua a ser desafiante, pois não existe uma técnica experimental para criar uma verdadeira estrutura de rede e ser comparada através de previsões computacionais. O projeto *Dialogue on Reverse Engineering Assessment and Methods* (DREAM) tem procurado avaliar redes biológicas através de dados experimentais e simulados de forma objetiva por meio de métodos de engenharia reversa. Eles avaliaram a performance de mais de 30 métodos de implementação de inferência de redes, utilizando expressão gênica por *microarray* de células de *Escherichia coli*, *Staphylococcus* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Os resultados mostraram que nenhuma rede foi superior às restantes nos diversos conjuntos de dados. Padrões diferenciais de conectividade de redes foram estimados através de diferentes técnicas com níveis diferentes de sucesso. Por exemplo, as cascatas lineares de regulação foram mais precisamente estimadas por métodos de regressão e pela rede bayesiana. A rede regulatória de inferência de eucariontes foi menos bem-sucedida que a rede regulatória de bactérias, o que sugere a necessidade de dados adicionais para uma estimativa de precisão em sistemas complexos. A conclusão foi a de que uma rede criada com base na inferência de diferentes técnicas demonstrou a performance mais robusta nos diversos conjuntos de dados.

A integração da informação genética com modelos de rede tem sido utilizada para refinar as inferências, destacar rotas que contribuem para fenótipos clínicos e identificar genes que são os prováveis responsáveis pelos processos biológicos (145,146). Nesses sistemas, os eQTLs são considerados como os âncoras causais e são adicionados ao processo de construção da rede. Por exemplo, nas redes bayesianas, os genes que mostram evidência de uma regulação em *cis* podem ser modelados como os “pais” dos genes que não são regulados em *cis*. Assim, a direção da regulação pode ser estabelecida para determinados pares de genes através dos

dados oriundos das informações da genética de sistemas. Uma forma integrada tem sido utilizada para identificar interações moleculares, que são alteradas nos cérebros de pacientes com doença de Alzheimer. Nesse estudo, os autores construíram uma rede de coexpressão utilizando dados da expressão gênica de três diferentes regiões do cérebro em mais 500 indivíduos afetados e em controles.

A comparação dessas redes demonstrou que a conectividade dos genes em diversos módulos foi reconfigurada em indivíduos afetados. Esses resultados dos cis-eQTLs, que foram identificados através de análises de expressão gênica no cérebro, foram utilizados com âncoras causais para construir as redes bayesianas e estimar os direcionadores da conectividade diferencial que resultaram na doença. O gene *TYRO protein tyrosine kinase-binding* (TYROBP) foi identificado como o direcionador do módulo do gene enriquecido para expressão no sistema imune e na micróglia. Esse módulo foi reconfigurado no estado de doença e foi correlacionado de forma significativa com a progressão da doença. Uma sobreexpressão do TYROBP nas células da micróglia levou a alterações na expressão que validaram diversas estimativas de redes. Outro estudo de genética de sistemas também estudou as redes integradas de coexpressão de ratos e humanos e identificou o mecanismo de ação do fator de transcrição em um *locus* que está associado ao diabetes tipo 1.

As interações causais entre as fenótipos clínicos e moleculares podem ser estimadas através das análises da genética de sistemas e através da utilização de diversos algoritmos (109,147,148). Por exemplo, em uma população em que foi estudado os níveis globais de transcritos e fenótipos clínicos, pode ser questionado se o relacionamento entre os níveis de transcrito e os fenótipos clínicos é causal, reativo ou independente.

Como uma variação genética natural na população é aleatoriamente distribuída entre os indivíduos, esses algoritmos de causalidade levam em consideração os efeitos de perturbações genéticas multifatoriais em diversos desfechos fenotípicos. Essas estimativas causais são retratadas como linhas diretas em modelos gráficos que representam o relacionamento entre os fenótipos moleculares. Entretanto, esses métodos têm algumas deficiências, como o uso de modelos lineares para inferir relações que não são necessariamente lineares (98,149). Além disso, a rede construída, oriunda de análises de genética de sistema, não pode prever as alças de retroalimentação, a não ser que os dados relativos ao tempo de percursos estejam

disponível. Embora existam deficiências, as análises integrativas têm sido utilizadas para inferir relações causais entre os fenótipos (109,150,151).

1.3.8 Estudos de Associação do Genoma Inteiro relacionados à Surdez

O primeiro GWAS foi realizado em humanos e publicado no ano de 2009 (152). Esse estudo avaliou a associação para surdez relacionada ao envelhecimento (presbiacusia). O estudo foi realizado utilizando 846 casos e 846 controles selecionados a partir de 3.434 indivíduos selecionados em oito centros em seis países europeus. O DNA dos casos e controles foi avaliado e separado através do método de *Affmetrix 500K GeneChip* em cada centro separadamente.

Os 252 polimorfismos melhores classificados identificados numa amostra europeia (1.332 amostras) de não finlandeses e os 177 polimorfismos melhores classificados em um grupo finlandês (360 amostras) foram confirmados utilizando genotipagem específica. Subsequentemente, os 23 polimorfismos mais importantes foram genotipados de forma individual num grupo europeu independente (138 amostras). Isso resultou na identificação de um polimorfismo replicado e altamente significativo no gene *GRM7* (glutamate receptor, metabotropic, 7), sendo o gene que codifica o *metabotropic glutamate receptor type 7 (mGluR7)*. Além disso, na amostra do grupo finlandês, dois polimorfismos *GRM7* foram significativos, mas em diferentes regiões do gene.

Considerando que os finlandeses são diferentes do restante dos europeus, isso pode ser devido à heterogeneidade alélica. Estudos histoquímicos em humanos e camundongos mostraram que o *mGluR7* é expresso nas células ciliadas e nas células do gânglio espiral na orelha interna. Esses dados em conjunto indicam que os alelos comuns do *GRM7* contribuem para o risco individual de desenvolver presbiacusia, possivelmente através de um mecanismo de alteração da susceptibilidade à excitotoxicidade ao glutamato.

Um estudo subsequente (153) avaliou a otosclerose através de método semelhante. A otosclerose é tipo comum de perda auditiva progressiva, caracterizada por um remodelamento anormal do osso na cápsula ótica. A etiologia da doença é desconhecida e tanto fatores genéticos como ambientais têm sido envolvidos. Para a identificação de fatores genéticos envolvidos na otosclerose, foi utilizado um estudo

de caso-controle para a descoberta de uma associação do genoma inteiro através de 555.000 polimorfismos, utilizando-se amostras agrupadas de DNA.

Através da genotipagem dos principais 250 polimorfismos de forma sequencial, foi possível identificar dois polimorfismos altamente significativos que foram replicados em duas populações adicionais independentes. Foram genotipados 79 polimorfismos marcados para um mapeamento fino das duas regiões genômicas definidas pelos polimorfismos associados.

A associação com o sinal mais significativo ($p=6.23 \times 10^{-10}$) estava no cromossomo 7q22.1 e envolvia o gene *reelin* (*RELN*), sendo um gene conhecido por seu papel na migração neuronal. Foi encontrada evidência de uma heterogeneidade alélica nessa região. De forma consistente com o resultado do GWAS, a expressão do gene *RELN* foi confirmada na orelha interna e na platina. Isso conclui que existe evidência de que o gene *RELN* está relacionado à patogênese da otosclerose.

Foi realizado um GWAS (154) acerca da presbiacusia em uma população finlandesa pequena. Essa população é conhecida como Saami e vive na Finlândia de forma isolada há dezenas de gerações. A escolha dessa população foi motivada pela alta extensão do desequilíbrio de ligação, sendo poderosa para estudos de associação. As amostras de DNA e a avaliação audiométrica foram coletadas de 352 indivíduos finlandeses da etnia Saami (50-75 anos).

Foi aplicada uma análise do componente principal para o fenótipo audiométrico multivariável. Os primeiros três componentes principais capturaram 80% da variação nos limiares auditivos. Todos os indivíduos foram genotipados pelo *Affymetrix 100K chip*. Para levar em conta os níveis de relação entre os indivíduos assim como a estratificação populacional, os testes de associação foram realizados utilizando modelos de regressão. Foram identificados os sinais de associação melhores colocados para os três fenótipos em estudo. O principal polimorfismo (rs457717, $p=3.55 \times 10^{-7}$) foi associado com o componente principal 3 e foi localizado num intron da proteína *IQ motif-containing GTPase-activating-like* (*IQGAP2*). De forma surpreendente, o polimorfismo rs161927 ($p=0.000149$), que foi o sétimo polimorfismo melhor posicionado, esteve imediatamente abaixo do gene *GRM7*, como foi apontado no estudo prévio realizado pelo mesmo grupo (152).

Em 2011, foi realizado um GWAS dentro do *International Consortium G-EAR* (155). Uma meta-análise de GWAS foi realizada através de seis populações europeias isoladas de ancestralidades europeias, envolvendo um número total de 3.417 indivíduos. Um total de oito *loci* significativos foram detectados ($p < 10^{-7}$), com diversos genes expressos na orelha interna, como *DCLK1*, *PTPRD*, *GRM8* e *CMIP*. Diversos candidatos biológicos adicionais indicados por um SNP com associação sugestiva ($p < 10^{-6}$) foram identificados.

Além disso, foram identificados diversos *loci* em regiões sem genes, genes de função desconhecida e genes sem uma função estabelecida na orelha interna. Foram disponibilizados dados para construir rotas altamente significativas *in silico* para fisiologia auditiva, relacionando 49 genes, sendo 34 desses expressos na orelha interna. Esses resultados geram conclusões acerca das bases moleculares da fisiologia auditiva e podem sugerir novos alvos para prevenção e tratamento da perda auditiva.

No ano seguinte (2012), o mesmo grupo (152) complementou o estudo acerca da presbiacusia (156). O estudo anterior focou somente na audição através da avaliação auditiva por meio da medida dos limiares tonais. Alguns *loci* foram identificados com base no fenótipo do ouvido com melhor limiar auditivo. Foi identificado somente o gene *GRM7*. Avaliou-se a associação de variantes do *GRM7* em uma população americana com origem europeia de Rochester, NY ($n=687$), sendo utilizados novos fenótipos para presbiacusia. Análises multivariadas foram utilizadas para explorar a relação entre o haplótipo *GRM7* e os polimorfismos através de diversas medidas de percepção auditiva. Foi demonstrado que os alelos do *GRM7* estão associados de forma primária a medidas periféricas de perda auditiva, especialmente discriminação auditiva em adultos.

Os GWAS relacionados à orelha interna estão, cada vez maiores, nos últimos anos. De forma complementar ao estudo publicado pelo *International Consortium G-EAR* (155), foram analisados os polimorfismos desse GWAS para identificar uma associação genuína com a função auditiva através de técnicas alternativas (157). Em primeiro lugar, foi gerada uma lista dos 19 genes publicados nos GWAS prévios. Posteriormente, foi realizada imuno-histoquímica para avaliar a expressão desses 19 genes na orelha interna dos camundongos. Um total de 12 desses genes demonstraram padrões de expressão coclear distintas. Um total de quatro genes

demonstraram uma expressão restrita às células ciliadas sensoriais (*Csmd1*, *Arsg*, *Slc16a6* e *Gabrg3*), um gene na célula da estria vascular (*Dclk1*) e os genes restantes em diversos tipos celulares da cóclea (*Ptprd*, *Grm8*, *GlyBP*, *Evi5*, *Rimbp2*, *Ank2*, *Cdh13*).

Finalmente, foram testados os 12 genes para a replicação da associação numa amostra independente de caucasianos e asiáticos. Nove desses genes demonstraram uma associação significativa, sendo quatro desses replicados no mesmo polimorfismo com mesma direção de efeito e cinco genes demonstraram uma associação significativa na testagem direta.

A fim de analisar o relacionamento genótipo-fenótipo, foram avaliados os perfis audiométricos para os três genótipos das variantes gênicas mais fortemente associados. Um total de sete desses nove genes replicados (*CDH13*, *GRM8*, *ANK2*, *SLC16A2*, *ARSG*, *RIMBP2* e *DCLK1*) demonstraram um padrão audiométrico com diferenças entre os genótipos. Isso aumenta a sustentação do seu papel na função auditiva. Além disso, esses dados demonstram a utilidade da técnica passo a passo em gerar conhecimento acerca das bases moleculares da audição e pode sugerir novos alvos para o tratamento e a prevenção da surdez.

Portanto, a base genética da perda auditiva induzida por ruído (PAIR) tem sido claramente demonstrada em animais, já que diferentes linhagens de camundongos consanguíneos apresentam diferentes susceptibilidades ao ruído. Além disso, está bem estabelecido que pessoas expostas ao ruído de forma semelhante apresentam variação no grau de perda auditiva, indicando um componente genético. Entretanto, a descoberta das interações entre o gene e o ambiente em humanos, como na susceptibilidade à PAIR, apresenta muitas dificuldades inerentes, especialmente, no controle da exposição.

Por isso, foi proposto um mapeamento genético da perda auditiva induzida pelo ruído. O estudo com modelos animais permite que a exposição ao ruído seja cuidadosamente controlada, facilitando o estudo de fenótipos complexos, como a PAIR. Essa análise de associação permite um mapeamento genético da susceptibilidade à PAIR e, subsequentemente, uma análise e confirmação de genes candidatos.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Mapear os genes que conferem a susceptibilidade à perda auditiva induzida pelo ruído (PAIR) em camundongos consanguíneos com alta resolução.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os diferentes fenótipos auditivos através de métricas eletrofisiológicas (potenciais evocados auditivos de tronco encefálico e emissões otoacústicas por produtos de distorção) nas diferentes linhagens de camundongos consanguíneos antes e após a exposição ao ruído.

- Apresentar os genes candidatos dos estudos de associação do genoma inteiro obtidos através de diferentes métricas eletrofisiológicas.

- Validação dos genes candidatos através de experimentos com modelos animais.

- Caracterização da interação gene-ambiente no desenvolvimento da perda auditiva induzida pelo ruído.

3. MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O *Institutional Care and Use Committee* (IACUC) da University of Southern Califórnia, Los Angeles aprovou o protocolo para uso animal dos camundongos das linhagens do Hybrid Mouse Diversity Panel (IACUC 12033) e, posteriormente, na University of California San Diego (IACUC 17178) (Anexo A). As linhagens e genótipos estão acessíveis através do Jackson Laboratory (www.jax.org). As linhagens de camundongos foram anestesiadas com uma injeção intraperitoneal de uma mistura de quetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (16 mg/kg de peso corporal).

3.2 O Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP)

O HMDP é uma coleção de linhagens consanguíneas comuns composta por 30 linhagens consanguíneas clássicas (CI) proporcionando resolução genética e diversidade alélica, e 70 linhagens consanguíneas recombinantes (RI) que aumentam a resolução e o poder estatístico (15). Camundongos fêmeas com cinco semanas de idade ($n = 635$) de 102 linhagens do Hybrid Mouse Diversity Panel ($n = 6-7$ / linhagem) foram adquiridas do Jackson Laboratories. Uma detalhada caracterização do HMDP é fornecida em (15).

Os camundongos foram avaliados em até 5 semanas de idade e acomodados em gaiolas esterilizadas com comida e água e ruído ambiental médio de 40 dB. Os fenótipos das linhagens do HMDP foram analisados utilizando genótipos de 500.000 polimorfismos de nucleotídeos (SNPs) obtidos a partir do Mouse Diversity Array (frequências de alelos menores $> 5\%$; frequências de genótipos ausentes $< 10\%$) (124).

As linhagens de camundongos consanguíneos comuns e recombinantes foram previamente genotipados pelo *Broad Institute* (www.mousehapmap.org). De um total de 140.000 polimorfismos disponíveis, 108.064 eram informativos (frequência do alelo $\geq 5\%$ e menos de 20% de dados inexistentes) e foram utilizados nessa análise de associação.

3.3 Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico antes e após a exposição ao ruído

Eletrodos de aço inoxidável foram colocados de forma subcutânea no vértice da cabeça, na mastoide direita e um eletrodo terra na base do rabo. A temperatura corporal foi mantida e monitorada. Aplicou-se pomada de lágrima artificial nos olhos. Cada camundongo foi recuperado numa superfície aquecida em temperatura corporal. Os sinais auditivos do potencial evocado auditivo de tronco cerebral (PEATE) foram apresentados como *tone pips* com um tempo de subida e descida de 0,5 msec e uma duração total de 5 msec nas frequências de 4, 8, 12, 16, 24 e 32 kHz. Os *tone pips* foram apresentados abaixo do limiar e aumentados com incrementos de 5 dB até o alvo de 100 dB.

Os sinais foram apresentados numa taxa de 30/segundo. As respostas foram filtradas com banda de passagem de 0,3 até 3 kHz ($\times 10.000$). Em cada intensidade de estímulo, foi calculada a média de 512 registros de onda. O limiar auditivo foi determinado através da inspeção das ondas do potencial evocado auditivo de tronco cerebral e foi definido como a intensidade mínima em que a onda 1 pode ser ainda identificada.

Os dados foram armazenados para uma posterior avaliação dos valores de amplitude da onda 1 através da análise pico-a-pico (P1-N1). O valor de pico (positivo) a pico (menos positivo ou mais negativo) da onda I foi determinado, e a amplitude foi calculada subtraindo o valor de pico a pico. A amplitude da onda I do potencial evocado auditivo de tronco encefálico antes e após a exposição ao ruído foi obtida pelo mesmo método 2 semanas após a exposição ao ruído.

3.4 Determinação das emissões otoacústicas por produtos de distorção

As emissões otoacústicas por produtos de distorção (EOAPDs) foram analisadas como função input/output (I-O) e $2f_1 - f_2$ (medida primária). Os tons primários foram estabelecidos em uma proporção de $f_2/f_1 = 1,2$, sendo o f_2 entre 8 e 32 kHz (o nível f_2 com 10 dB a menos do que o nível f_1) e o L_2 variando entre 20 até 70 dB. O ruído de base foi medido através da média de 6 pontos do espectro (acima ou abaixo de $2f_1 - f_2$). Após a definição das médias, os EOAPDs foram extraídos. O limiar foi definido como nível L_2 necessário para produzir uma EOAPD de 0 dB NPS (nível de pressão sonora) com uma relação sinal-ruído (SNR) ≥ 3 dB.

A amplitude supraliminar das emissões otoacústicas por produtos de distorção foi determinada em 60 e 70 dB como tons primários para cada frequência, separadamente. Esses valores fornecem uma avaliação indireta da integridade das células ciliadas externas.

3.5 Protocolo de exposição ao ruído

Os camundongos com 6 semanas de vida foram expostos, por 2 horas, a um ruído de banda na oitava de 10 kHz e na intensidade de 108 dB NPS. Esse método foi adaptado de (49). A exposição ao ruído de banda na oitava de 10 kHz foi previamente descrita (48). Durante 2 horas, os camundongos foram colocados numa jaula de exposição com formato circular e dividida em quatro compartimentos. A jaula permitia a movimentação livre dos camundongos dentro de cada compartimento. A jaula foi colocada numa câmara MAC-1 à prova de som criada pela *Industrial Acoustics* (IAC, Bronx, NY, EUA). A câmara sonora foi forrada com espuma acústica à prova de som para diminuir os reflexos sonoros. As gravações de ruído foram geradas num alto-falante Fostex FT17H Tweeter inserido no topo da câmara de som. A calibração do ruído danoso foi realizada através do medidor do nível sonoro B&K com uma variação de 1,5 dB na área da jaula.

A placa de aquisição dos dados da *National Instruments* (National Instruments Corporation, Austin, TX, EUA) foi regulada através de um *software* padrão (utilizado para gerar um estímulo e processar as respostas). Os estímulos foram gerados através de um sistema acústico padrão composto de dois alto-falantes em miniatura, e a pressão sonora foi medida através de um microfone condensador. Os testes foram realizados somente no ouvido direito. Todos os testes auditivos foram realizados numa câmara MAC-1 independente, a qual era à prova de som para eliminar tanto o ruído elétrico quanto o ambiental.

3.6 Extração do RNA Coclear e Expressão Gênica

De cada linhagem do HMDP, ambas as cócleas foram removidas de todos os camundongos que tenham completado 8 semanas de vida. A orelha interna foi micro dissecada, sendo o tecido mole adjacente e o labirinto vestibular removidos. A cóclea dissecada foi congelada em nitrogênio líquido e triturada. O RNA foi extraído e purificado através da colocação das amostras cocleares no tampão *RNA lysis* (Ambion). A amostra foi incubada durante a noite (4 °C), centrifugada (12.000 g por 5

minutos) para sedimentar os materiais insolúveis e o RNA isolado (seguindo as recomendações do fabricante). Esse procedimento gerou aproximadamente 300 ng de RNA por camundongo.

Os *BeadChips* da *Illumina* foram utilizados para as medidas de expressão gênica. As amplificações e hibridizações foram realizadas de acordo com o protocolo *Illumina* (*Southern California Genome Consortium microarray core laboratory* na UCLA). O RNA foi transcrito de forma reversa para cDNA através da utilização do kit de síntese (AMIL1791).

Finalmente, foi convertido para cRNA e marcado com biotina. De forma complementar, 800 ng do produto do cRNA marcado com biotina foi hibridizado para preparar as matrizes do genoma inteiro, sendo incubado durante a noite (16 a 20 horas) na temperatura de 55 °C. As matrizes foram lavadas e marcadas com a coloração Cy3. O excesso de coloração foi removido através de lavagens. Finalmente, as matrizes foram analisadas num *scanner* de laser confocal *Illumina BeadScan*.

3.7 Análise de Dados

Realizamos a análise de associação usando FaST-LMM (factored spectrally transformed linear mixed model), um método que considera a estrutura da população (<https://www.microsoft.com/en-us/download/details.aspx?id=52559>) Versão 2.0.7. Este método define SNPs de acordo com seus valores p de regressão linear e, em seguida, constrói matrizes usando os SNPs de todos os outros cromossomos para melhorar o poder estatístico ao testar todos os SNPs em um específico cromossomo (158). Este procedimento inclui o SNP sendo testado para associação na equação de regressão apenas uma vez.

O limiar de significância de todo o genoma no HMDP foi determinado pelo *Family-wise error rate* (FWER) como a probabilidade de observar um ou mais falsos positivos em todos os SNPs por fenótipo. Apresentamos 100 conjuntos diferentes de testes de permutação e *bootstrapping* paramétrico de tamanho 1000 e observado que o limite de significância de todo o genoma em um FWER de 0,05 correspondeu a $p = 4,1 \times 10^{-6}$, semelhante ao usado em estudos anteriores com o HMDP (15). Este é aproximadamente uma ordem de magnitude maior do que o limiar obtido pela Correção de Bonferroni ($4,6 \times 10^{-7}$), que seria um estimativa excessivamente

conservadora de significância porque os SNPs próximos entre linhagens de camundongos consanguíneos são altamente correlacionados uns com os outros.

O *Efficient Mixed-Model Association* (EMMA) é um teste estatístico para o mapeamento de associações, sendo corrigido para parentesco genético e estrutura populacional. Esse teste avalia a média de cada linhagem e também as medidas individuais de cada camundongo para aumento do poder estatístico. Demonstrou-se previamente que o valor $p < 0,05$ equivale, num estudo de associação do genoma inteiro do HMDP através do EMMA, a um valor de $p = 4,1 \times 10^{-6}$ ($-\log_{10}P = 5,39$) (90). A implementação do pacote R do EMMA está disponível online em <http://mouse.cs.ucla.edu/emma>.

O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para testar a diferença das médias entre a amplitude da onda I da linha de base e pós-exposição. A correlação entre amplitude da linha de base e a mudança na amplitude após a exposição ao ruído foi demonstrada com coeficientes de Pearson.

O coeficiente de Pearson foi também utilizado para avaliar as correlações entre os limiares auditivos antes e após a exposição ao ruído. O valor $p < 0,05$ foi considerado para indicar uma diferença estatisticamente significativa. A força da correlação foi caracterizada como: fraca ($< 0,50$), moderada ($0,50-0,70$) e forte ($> 0,70$).

3.8 Caracterização dos Genes Candidatos

Os genes da sequência de referência (*RefSeq*) foram obtidos através do *UCSC genome browser* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=mm10>) utilizando a montagem do genoma GRCm38/mm10 para caracterizar os genes localizados em cada associação.

O EMMA foi utilizado para calcular as associações (valores p) das sondas correspondes a cada um dos genes da *RefSeq*. O intervalo de confiança (95%) para a distribuição das distâncias entre o polimorfismo mais significativo e o polimorfismo verdadeiramente causal, em associações simuladas que explicam 5% da variância do HMDP, é 2.6 Mb (15). Somente polimorfismos mapeados em cada região associada foram utilizados nessa análise. Foram selecionados polimorfismos que foram variantes em pelo menos uma das linhagens consanguíneas clássicas do HMDP. Os

polimorfismos não sinônimos, dentro de cada região, foram disponibilizados através do *Mouse Phenome Database* (www.phenome.jax.org).

3.9 Caracterização do Camundongo Mutante *Nox3^{het}*

A geração e caracterização inicial do alelo *Nox3^{het}* foi previamente descrita (159). O alelo *Nox3^{het}* foi gerado espontaneamente (inserção retroviral endógena no intron 12) numa linhagem GL/Le. Porém, desde então, tem sido mantido congênito numa linhagem C57BL/6JEiJ. Para contornar a possibilidade de alelos adicionais na linhagem doadora, essa região foi retrocruzada por mais de 10 gerações. Já que o alelo mutante não está presente nessa linhagem, o intervalo congênito contendo o *Nox3* é provavelmente menor que 5 centimorgans (<http://jaxmice.jax.org/strain/002557.html>). O *Nox3^{het}* (conhecido como camundongo de “cabeça inclinada” ou *het*) é autossômico recessivo e portador de mutações espontâneas. Isso gera a ausência de otocônia, porém sem aparente anormalidade em outros órgãos. A deficiência de otocônia resulta num comportamento de inclinação da cabeça e ausência completa de potenciais evocados vestibulares (VsEPs), porém com limiares auditivos normais no PEATE (160).

As medidas pré-exposição ao ruído foram realizadas através de PEATE, EOAPD e VsEP em camundongos machos e fêmeas (5 semanas de vida) de genótipos *Nox3^{het}* variados (*Nox3^{het}/Nox3^{het}* e *Nox3^{het}/+*) e no tipo selvagem (linhagem C57BL/6JEiJ), conforme descrito anteriormente. Os limiares auditivos pré-exposição foram obtidos 1 semana antes da exposição ao ruído e os animais foram avaliados para o dano auditivo após 2 semanas da exposição. A mudança permanente de limiar (PTS) foi definida como a diferença entre os limiares pré- e pós-exposição em cada frequência testada. O teste de *one-way* ANOVA foi utilizado para avaliar a significância e o teste *post hoc* de Tukey para comparações múltiplas.

A reação da cadeia de polimerase (PCR) foi realizada para o *Nox3* utilizando os seguintes *primers*: *Nox3-int12F*, GTTCTGGAGCACCTTGT; *Nox3-int12R* CCCATAGGGAGCCAAGAAAT; e ERV-R, TGTC AAGCTGACTCCACCAG (159). Os produtos da PCR foram separados num gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 mg/ml de brometo de etídio.

3.10 Preparação Histológica da Cóclea

Os camundongos foram sacrificados com menos de 24 horas após o PEATE (pós-exposição). As cócleas foram dissecadas dos tecidos adjacentes, sendo realizada aberturas nas espiras através da perfuração do ápice e da ruptura das janelas oval e redonda. A dissecação foi realizada em PBS (*phosphate-buffered saline*) gelado. Após a dissecação, as cócleas foram fixadas durante a noite a uma temperatura de 4 °C com paraformaldeído a 4%. No dia seguinte, foram lavadas com PBS. Uma dissecação adicional foi realizada para expor o órgão de Corti.

A fim de promover a perfusão e o bloqueio apropriado, o tecido foi imerso por 1 hora em PBS contendo 0,2% de *Triton X-100* (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) e 16% de soro normal de cabra (SouthernBiotech, Birmingham, AL, EUA). As amostras foram incubadas, durante a noite, em temperatura ambiente, com os anticorpos primários (anti-miosina 6 de coelho, 1:500, Proteus Biosciences e anti-CtB2 de camundongo, 1:500, BD Biosciences) para uma coloração dupla. Os anticorpos secundários foram então utilizados e o tecido foi incubado durante a noite e no escuro (Alexa 594, jumento anti-coelho, 1:500, Life Technologies e Alexa Fluor-488 anti-camundongo, 1:500, Life Technologies). Posteriormente, as amostras foram lavadas três vezes em PBS e montadas em slides de vidro utilizando o *Fluoromount G* (SouthernBiotech).

A microscopia foi realizada com microscópio confocal com laser (Olympus IX81) e com luz epifluorescente (Olympus Fluoview FV1000). A morte de células ciliadas externas (% por 100µm) foi quantificada e analisada através de um citococleograma que analisa a distância relativa do ápice da cóclea num mapa tonotópico (do camundongo da linhagem CBA) (161). Os percentuais indicam a localização das células ciliadas internas e externas na cóclea (0% corresponde à extremidade apical e 100% à extremidade basal) em intervalos de 10%.

A densidade de vesículas sinápticas cocleares foi analisada em cada área correspondente à frequência do PEATE (4, 8, 12, 16, 24 e 32 kHz), seguindo um mesmo mapa tonotópico. As células ciladas internas foram analisadas em um comprimento de 50 µm para cada frequência. Os pontos de imunofluorescência gerados pela coloração do CtBP2 foram contados utilizando aquisição

multidimensional (*z-stacks*) e divididos pelo número de células ciliadas internas (medido pela quantidade de núcleos) na amostra.

Regiões nas frequências correspondentes de 16 e 32 kHz foram localizadas através de sua distância do ápice da cóclea, com base nos mapas de frequência tonotópica coclear de (162). As imagens foram fotografadas em um Microscópio confocal da Zeiss 880 LSM Airyscan com 20 × 1.4NA (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Após a aquisição, imagens foram processadas e pós-processadas no Airyscan e depois analisadas usando o software Imaris (BITPLANE) para quantificar o número de sinapses funcionais. Resumidamente, os pontos correspondentes as vesículas sinápticas e aos receptores de glutamato foram reconstruídos usando a opção de reconhecimento de pontos. Foi limitado o volume de citoplasma através da coloração Myo7a e um limiar de 12 voxels foi utilizado para definir o tamanho mínimo dos objetos, sendo aplicado a todas as imagens processadas. A opção de colocação dos pontos representava o número de sinapses emparelhadas.

4. RESULTADOS

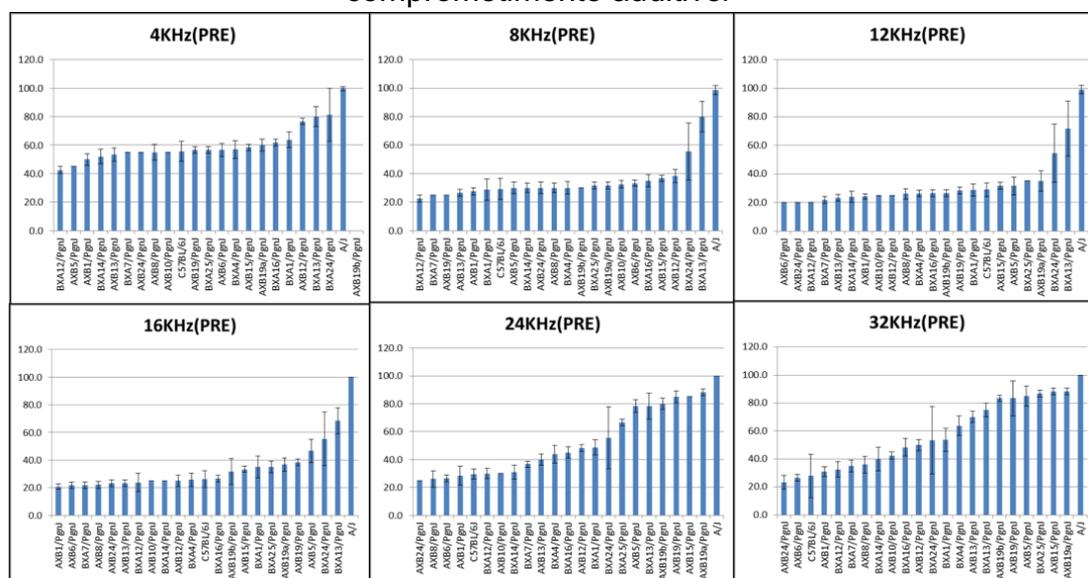
4 RESULTADOS

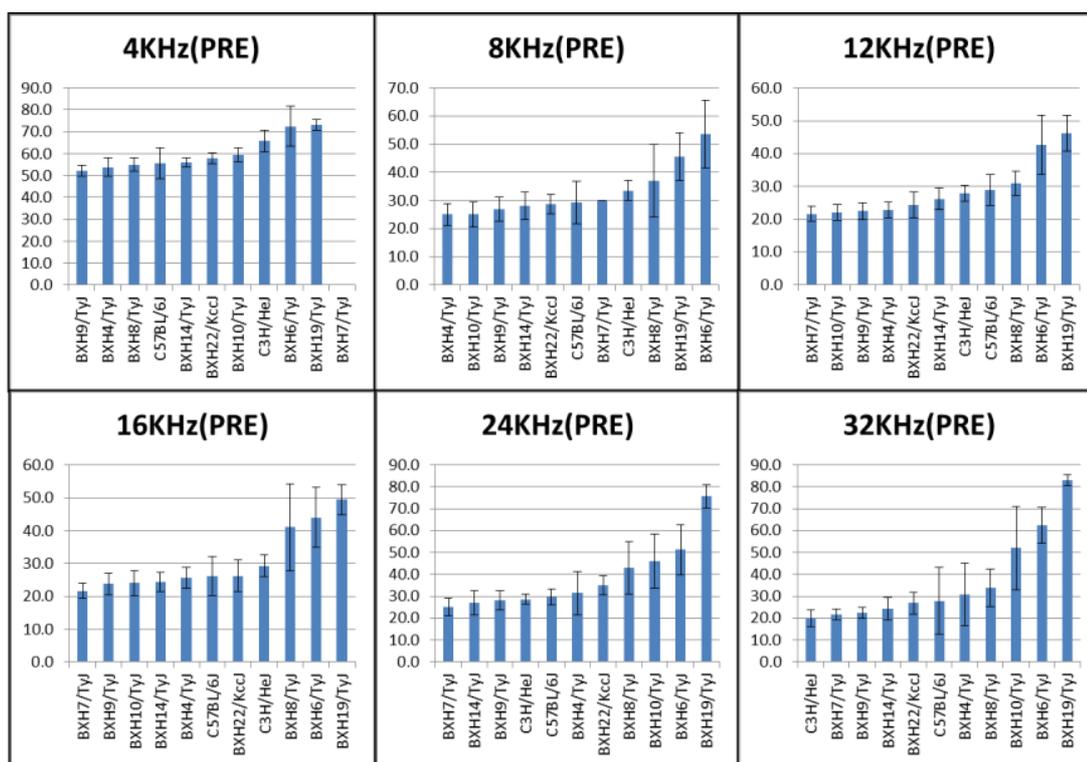
4.1 Caracterização fenotípica dos limiares auditivos do PEATE antes e após a exposição ao ruído.

Para avaliar as 100 linhagens consanguíneas quanto aos limiares basais, os limiares do PEATE para cada linhagem foram determinados antes da exposição ao ruído. As linhagens foram categorizadas em cada frequência como audição normal, surdez leve, moderada ou severa usando a linhagem consanguínea CBA/J como uma referência interna para audição normal. Vários padrões distintos de perda auditiva foram identificados: perda auditiva de alta frequência, perda auditiva de alta e baixa frequência, perda auditiva plana e perda auditiva do tipo entalhe (Figura 1).

A grande maioria das linhagens (49 linhagens) estavam no grupo de perda auditiva de alta frequência em que a perda auditiva foi mais pronunciada na faixa de 24–32 kHz. Este grupo foi subdividido em comprometimento de alta frequência leve, moderado e grave. As linhagens com audição normal foram o segundo maior grupo, compreendendo a 36 linhagens. Quatro linhagens exibiram comprometimento combinado de alta e baixa frequência com comprometimento em 4 kHz e 32 kHz. As linhagens de perda plana (7) tiveram um comprometimento de magnitude semelhante em todas as frequências. As linhagens do tipo entalhe (4) apresentaram comprometimento em frequências intermediárias de 16 kHz e / ou 24 kHz. Nenhuma linhagem foi identificada com deficiência auditiva em baixas frequências isoladamente.

Figura 1: - As linhagens consanguíneas apresentam padrões distintos de comprometimento auditivo.





Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

A audição da linha de base para cada linhagem é mostrada em formato de audiograma, com o limiar médio do PEATE (em dB NPS) posicionado em função da frequência do estímulo auditivo (em kHz).

Os seguintes padrões de função auditiva basal foram observados: (A) limiares auditivos normais [AXB1 / PgnJ, AXB10 / PgnJ, AXB24 / PgnJ, AXB6 / PgnJ, AXB8 / PgnJ, BALB / CJ, BTBR_T_tf / J, BXA12 / PgnJ, BXA14 / PgnJ, BXD13 / TyJ, BXD28 / TyJ, BXD31 / TyJ, BXD74 / RwwJ, BXH14 / TyJ, BXH22 / KccJ, BXH4 / TyJ, BXH7 / TyJ, BXH9 / TyJ, C3H / HeJ, C57BA / 6J, C57BA / J, C57BA, CXB1 / ByJ, CXB11 / HiAJ, CXB12 / HiAJ, CXB2 / TyJ, FVB / nJ, KK / HIJ, MRL / MpL, NON / ShiLtJ, NZB / BinJ, NZW / LacJ, PL / J, Rllls / J, SJL / J, SM / J, SWR / J], (B) perda auditiva de alta frequência leve [AKXL17a / TyJ, AXB12 / PgnJ, BALB / CbyJ, BXA1 / PgnJ, BXA16 / PgnJ, BXA4 / PgnJ, BXA7 / PgnJ, BXD1 / TyJ, BXD14 / TyJ, BXD15 / TyJ, BXD18 / TyJ, BXD5 / TyJ, BXD6 / TyJ, BXD70 / RwwJ, BXD75 / RwwJ, BXH10 / TyJ, BXH6 / TyJ, BXH8 / TyJ, C58 CXB13 / HiAJ, LG / J, SEA / GnJ], (C) perda auditiva de gravidade moderada [129X1 / SvJ, AXB13 / PgnJ, BXD11 / TyJ, BXD2 / TyJ, BXD29 / TyJ, BXD34 / TyJ, BXD50 / RwwJ, BXD55 / RwwJ, BXD73 / RwwJ, BXD8 / TyJ, BXD84 / RwwJ, BXD9 / TyJ, BXH19 / TyJ, C57BLKS / J, CXB9 / HiAJ], (D) perda auditiva de alta frequência grave [AXB15 / PgnJ, AXB19 / PgnJ, AXB19a / PgnJ, AXB19b / PgnJ,

AXB5 / PgnJ, BXA25 / PgnJ, BXD12 / TyJ, BXD20 / TyJ, BXD32 / TyJ, DBA / 2J, MA / MyJ / ShiLtJ], (E) perda auditiva de frequência plana e (F) perda auditiva de alta e baixa frequência [AKR / J, C57L / J, I / LnJ, LP / J] indicadas por formas/linhas sólidas e perda auditiva do tipo entalhe [BXD21 / TyJ, BXD38 / TyJ, BXD42 / TyJ, CE / J] indicadas por formas claras / linhas pontilhadas.

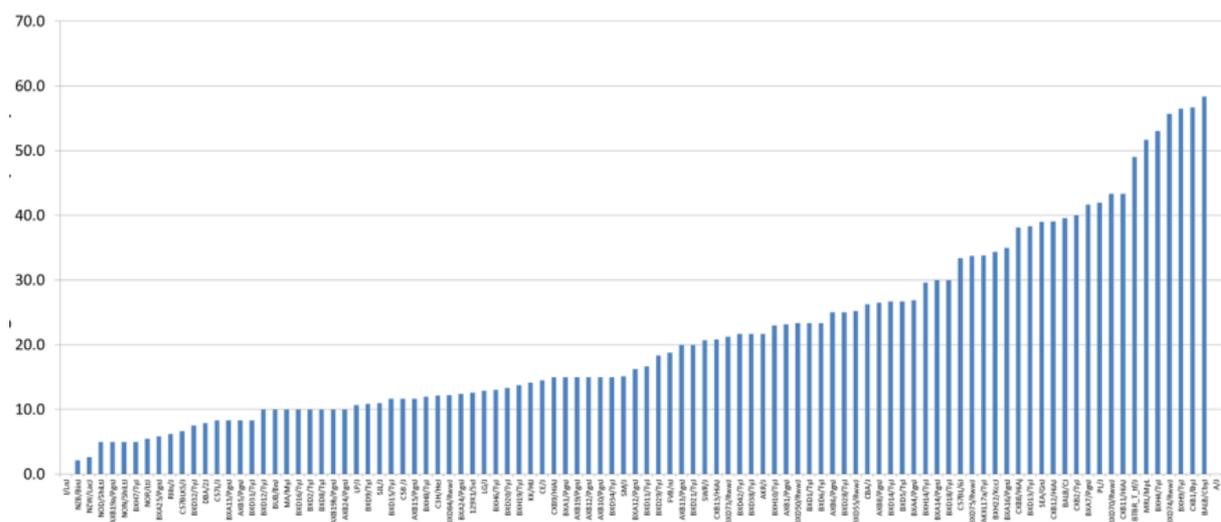
Além dos limiares auditivos basais, também caracterizamos a sensibilidade das mesmas 100 linhagens após a exposição ao ruído. As linhagens foram expostas a níveis prejudiciais de ruído e, em seguida, reavaliadas duas semanas depois por PEATE para limiares pós-exposição. Os valores de *permanent thresholds shift* (PTS) foram calculados a partir da diferença entre os limiares médios de pré-exposição ao ruído (limiar auditivo na linha de base) e pós-exposição ao ruído. As linhagens foram categorizadas em cada frequência de teste como resistente ao ruído (PTS <20) ou sensível ao ruído (PTS ≥20), e os padrões de sensibilidade ao ruído foram ainda categorizados como leve, moderado ou grave.

Vários padrões de sensibilidade ao ruído eram aparentes: resistente ao ruído, sensibilidade em alta frequência, sensibilidade em ampla frequência, sensibilidade multimodal, sensibilidade de frequência média, sensibilidade do tipo entalhe e sensibilidade em altas frequências (Figura 2). As 9 linhagens amplamente sensíveis exibiram PTS em várias frequências consecutivas, como BALB / cByJ que tinha PTS moderado a grave em todas as frequências. As 4 linhagens com sensibilidade de alta frequência demonstraram PTS, especialmente em 24 kHz e 32 kHz. Havia 30 linhagens com sensibilidade de média frequência, compreendendo o maior grupo e demonstrando PTS em frequências consecutivas de 12 e 16 kHz. Este grupo foi subdividido em sensibilidade de média frequência leve, moderada e grave. As 7 linhagens categorizadas como sensíveis do tipo entalhe exibiram um PTS em uma única frequência isolada; por exemplo, BXD42 / TyJ era severamente sensível a 12 kHz, mas resistente em todas as outras frequências. As linhagens de sensibilidade multimodal exibiram PTS de magnitude semelhante em duas ou mais frequências não consecutivas, como FVB / nJ com PTS em 12 e 24 kHz. As linhagens de sensibilidade com inclinação progressiva demonstraram sensibilidade ao ruído progressivamente maior nas frequências mais altas; por exemplo, BXA16 / PgnJ com PTS leve na faixa de 12 e 16 kHz, mas PTS moderado na faixa de 24 e 32 kHz. 14 linhagens resistentes

ao ruído apresentavam PTS mínimo em todas as frequências testadas. Nenhuma linhagem com sensibilidade isolada ao ruído de baixa frequência foi identificada.

A maioria das linhagens demonstrou mudanças de limiar dentro da faixa dinâmica de teste (0–100 dB NPS). NOD / ShiLtJ tinha limiares médios basais de 85,8, 93,3 e 92,5 dB SPL e valores de PTS de 10,8, 3,3 e 5,0 dB nas frequências de teste de 16, 24 e 32 kHz, respectivamente. Esses valores de PTS atenderam aos nossos critérios técnicos para resistência, mas foram resultado de um grave comprometimento auditivo de linha de base, ao invés de uma resistência a ruído “verdadeira”. Conforme observado por (163)., uma possível explicação para esse fenômeno é um "efeito teto", em que há um número limitado de elementos suscetíveis a danos no ouvido interno, e quanto mais elementos já estão danificados por causas anteriores, menos elementos permanecem para serem danificados por uma maior exposição ao ruído. No total, dezesseis linhagens foram excluídas da categorização do padrão de sensibilidade ao ruído.

Figura 2: Linhagens consanguíneas de camundongos mostram padrões distintos de sensibilidade ao ruído.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

A sensibilidade ao ruído para cada linhagem de camundongos é representada por PTS. Os valores de PTS (em dB) são plotados no eixo Y e as linhagens de camundongos no eixo X. As 16 linhagens que foram categorizadas como tendo um “efeito teto”, conforme descrito no texto, não foram incluídas nesta figura.

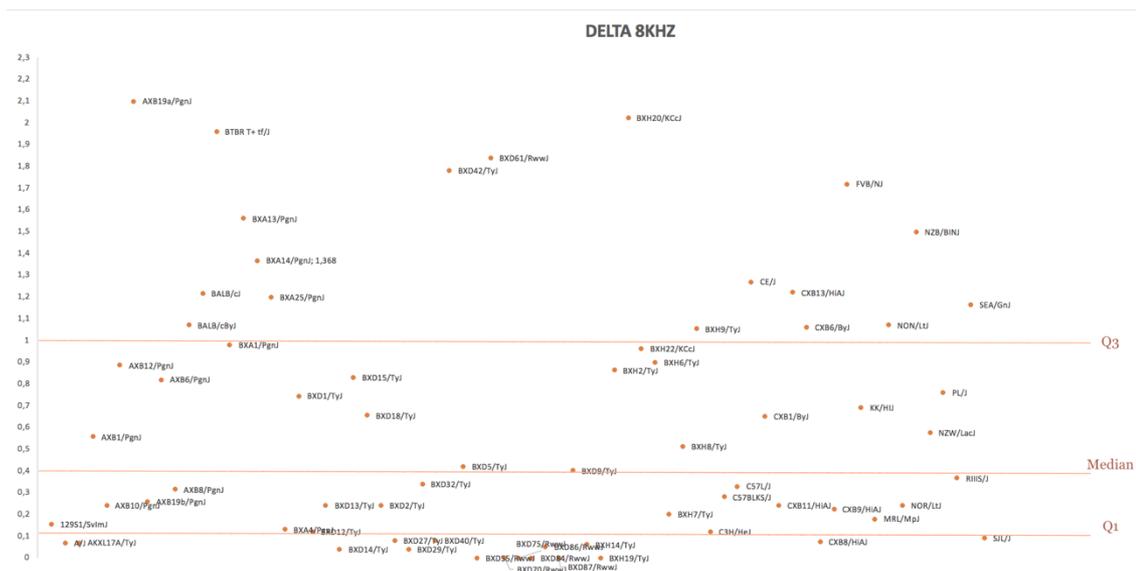
4.2 Caracterização fenotípica da amplitude da onda I do potencial evocado auditivo de tronco encefálico antes e após a exposição ao ruído.

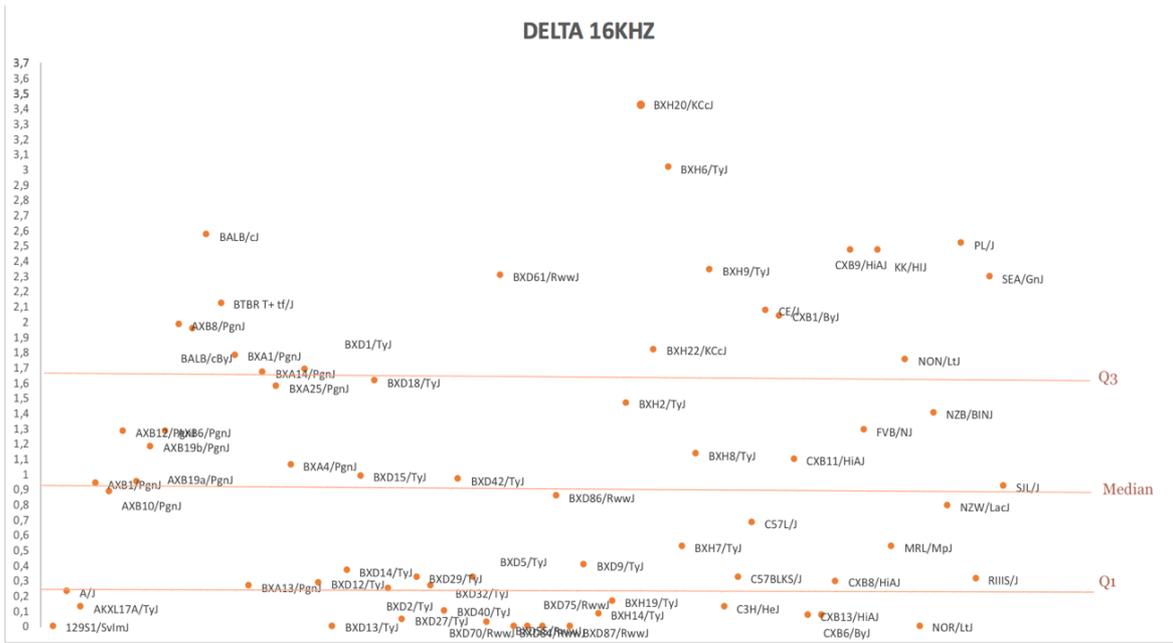
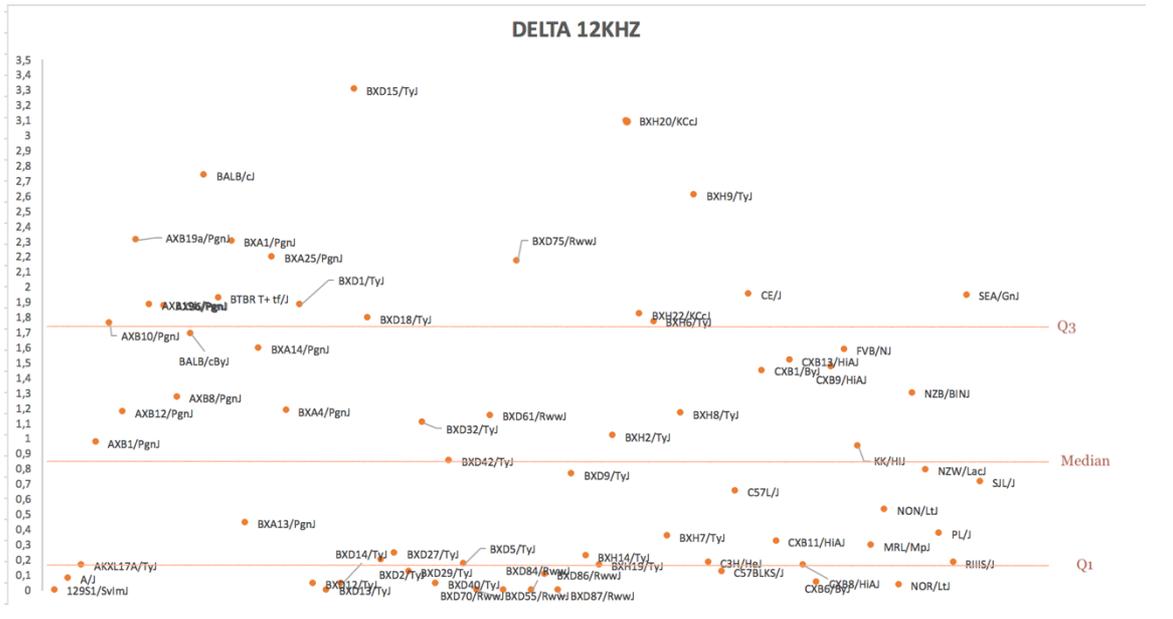
Realizamos uma análise da amplitude da onda I de PEATE antes e após a exposição ao ruído num total de 151 camundongos de 69 linhagens (1-8 camundongos / linhagem). Determinamos o valor da amplitude da onda I do PEATE em 80 dB SPL em todos os 151 camundongos e calculamos as amplitudes antes e após a exposição ao ruído nas frequências de 8, 12, 16, 24 e 32 kHz.

Houve uma redução estatisticamente significativa da amplitude da onda I do PEATE após a exposição ao ruído em todas as frequências testadas, com $p < 0,00001$ (valores de Mann-Whitney: 25582,5 para 8 kHz, 25036 para 12kHz, 24130 para 16kHz, 23377 para 24kHz e 24.393,5 para 32kHz). Em seguida, calculamos o delta da amplitude da onda I antes e após a exposição ao ruído. O delta médio para cada frequência em cada linhagem de camundongo é ilustrado na figura 3.

Classificamos as linhagens que apresentavam uma variação além do terceiro percentil como suscetíveis, pois estão entre as 25% das que tem a maior variação na amplitude após a exposição ruído de acordo com sua amplitude basal. Aquelas abaixo do primeiro percentil, foram classificadas como resistentes, por estar entre os 25% que tiveram a menor variação em sua amplitude após a exposição ao ruído em comparação com sua amplitude basal.

Figura 3: Delta (μV) da amplitude média da onda I do PEATE em cada frequência nas diferentes linhagens de camundongos (organizados em ordem alfabética).

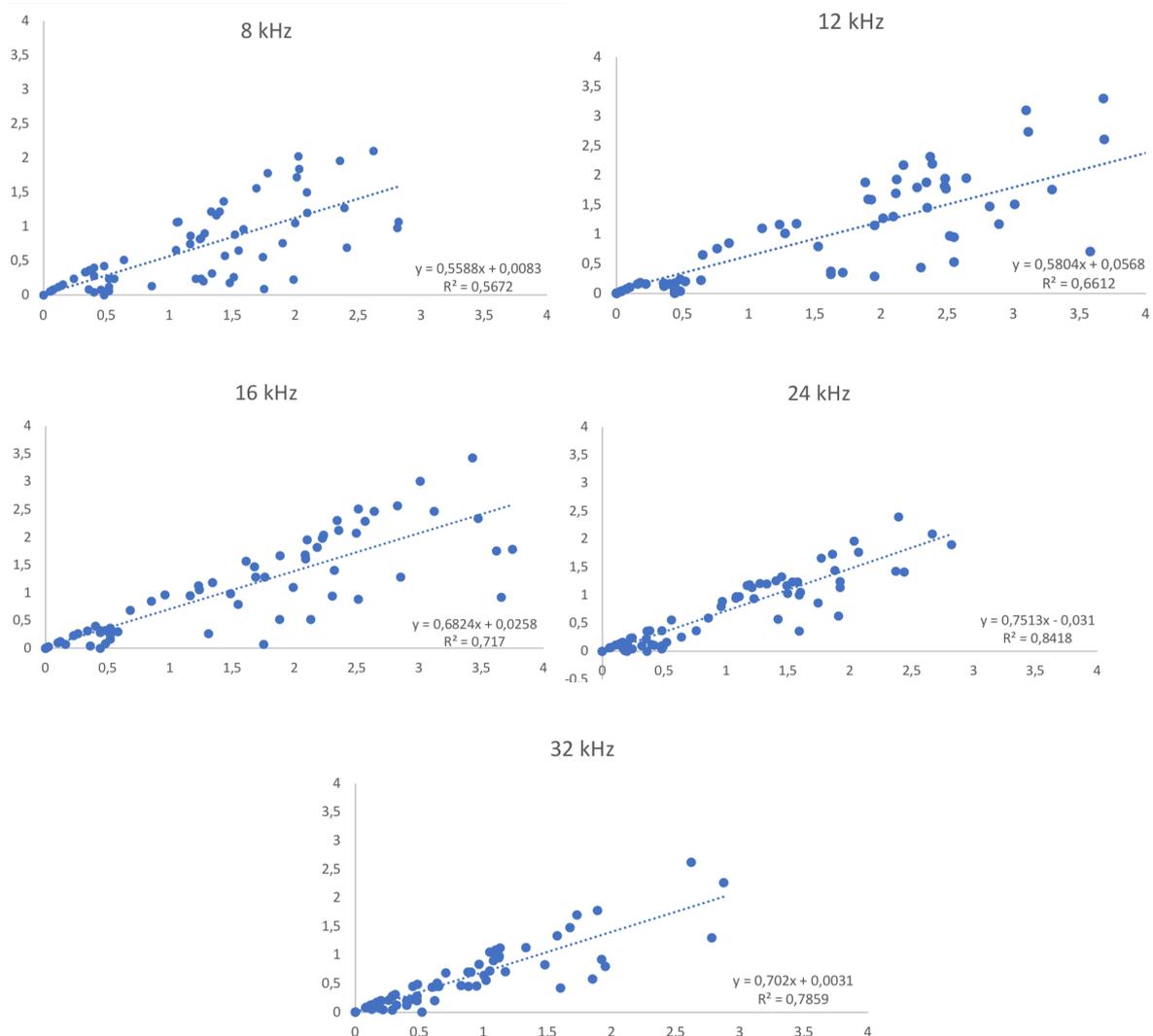




e 32 kHz (alteração de 147, 239 e 65 vezes em relação à linhagem de camundongo com a menor variação, respectivamente), e a segunda maior nas frequências de 8 e 12 kHz.

A linhagem BALB / cJ, comumente usada como modelo de camundongo em estudos auditivos, apresentou a terceira maior alteração após a exposição ao ruído nas frequências de 12, 16, 24 e 32 kHz (alteração de 91, 109, 196 e 44 vezes em relação à linhagem com a menor variação, respectivamente).

Figura 4: Gráficos de dispersão da correlação entre a amplitude média da onda I em cada linhagem e a mudança na amplitude média (delta) após a exposição ao ruído.



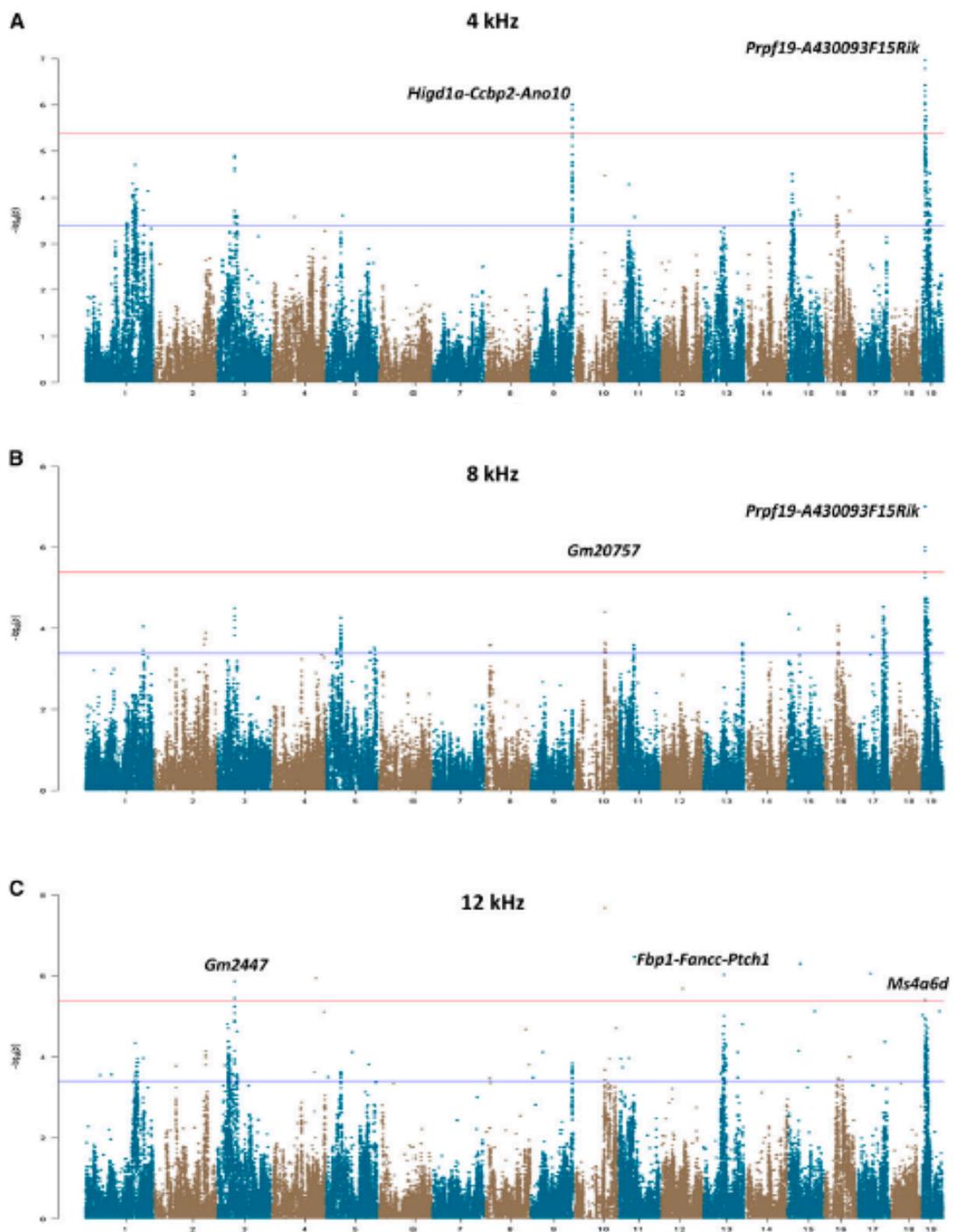
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

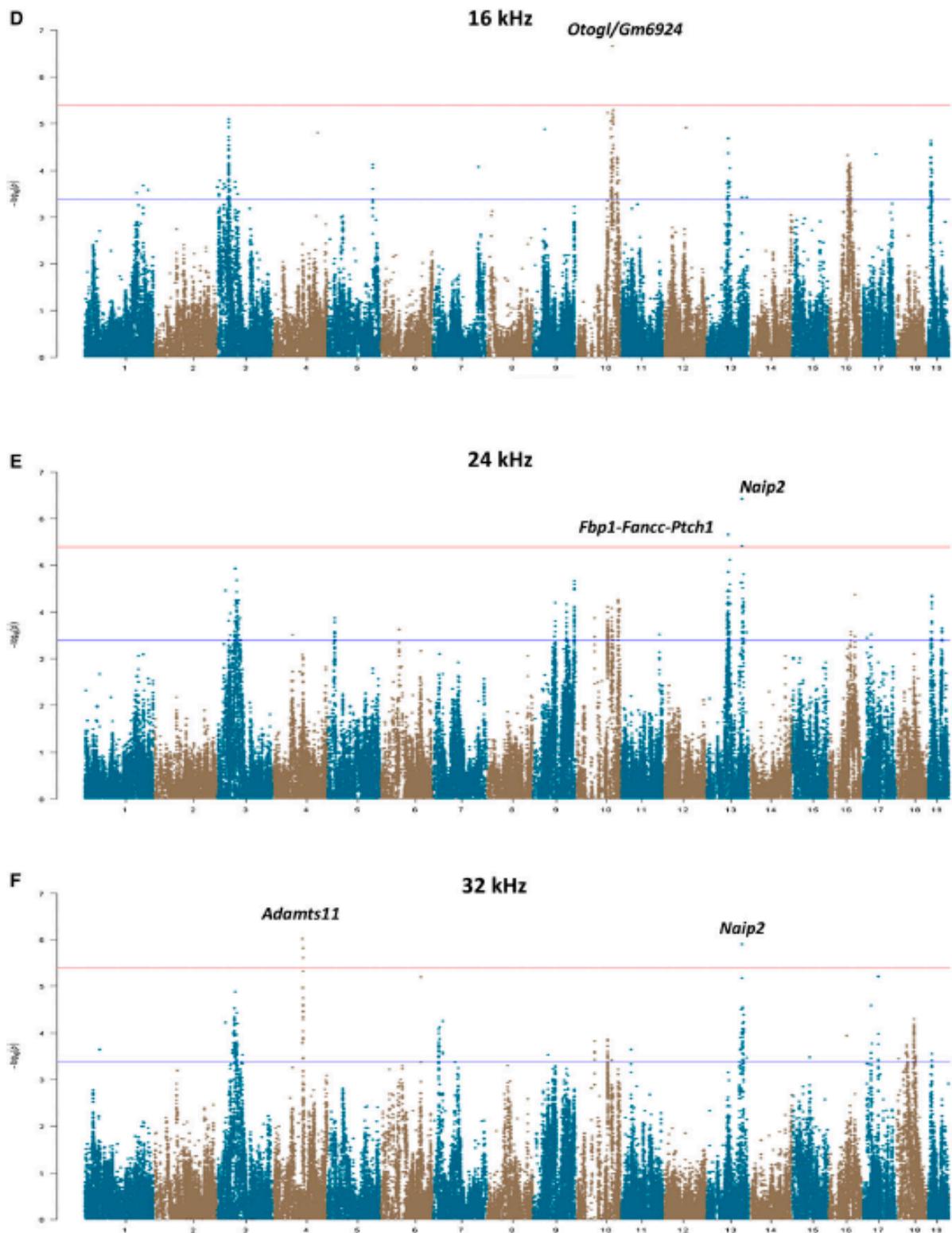
4.3 Estudo de associação do genoma inteiro com limiares auditivos do PEATE antes da exposição ao ruído para diferentes frequências ao longo do eixo tonotópico da cóclea.

Com base nos dados fenotípicos do HMDP, buscamos a seguir na identificação dos fatores genéticos que afetam a audição realizando um estudo de associação do genoma inteiro para limiares auditivos do PEATE em cada frequência de estímulo de *tone burst*. Essas análises usaram um *Efficient Mixed Model Algorithm* (EMMA) que leva em consideração a estrutura populacional subjacente e parentesco genético das linhagens do HMDP (90) e tem sido usado com sucesso para o mapeamento genético.

Essas análises de associação renderam várias observações (Figuras 5, A – 2F.) Primeiro, identificamos pelo menos um locus para cada frequência que alcançou significância em todo o genoma, com um total de nove regiões distribuídas nos cromossomos 3, 4, 9, 10, 13 e 19. Em segundo lugar, com exceção do estímulo na frequência de 24 kHz, cada análise identificou pelo menos um locus que era específico para uma determinada frequência. Terceiro, um locus no cromossomo 3 (rs30259360) que foi associado de forma estatisticamente significativa na frequência de 12 kHz também demonstrou uma associação sugestiva ($p \sim 10^{-5}$) na maioria dos fenótipos do PEATE. Em quarto lugar, os loci que foram associados aos limiares do PEATE em várias frequências se agrupavam na mesma extremidade do espectro. Para exemplo, o locus do cromossomo 19 (rs30354441) que foi associado com limiar do PEATE na frequência de 4 kHz também demonstrou associação após o estímulo de 8 kHz, mas não nas outras frequências. Por outro lado, um locus no cromossomo 13 (rs52344209) era comum apenas nas frequências de 24 kHz e 32 kHz. Finalmente, um locus no cromossomo 10 (rs29362366), que foi associado com PEATE na frequência de 16 kHz, mapeia o gene *Otog1* que já foi implicado em uma forma mendeliana de surdez humana (164).

Figura 5: Manhattan Plots com resultados de estudo de associação do genoma inteiro para PEATE em cada frequência.





Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

(A) PEATE na frequência de 4 kHz foi significativamente associado a um locus no cromossomo 9 e uma região no cromossomo 19. (B) 8 kHz revelou dois loci significativamente associados nos cromossomos 10 e 19. (C) Três loci significativamente associados nos cromossomos 3, 13 e 19 foram identificados na frequência de 12 kHz. (D) Locus estatisticamente significativo foi identificado no cromossomo 10 na frequência de 16 kHz. (E) Frequência de 24 kHz: dois diferentes loci no cromossomo 13 foram considerados significativos. (F) Dois loci significativos nos cromossomos 4 e 13 foram associados com a frequência de 32 kHz.

Para cada locus com associação estatisticamente significativa, o (s) gene (s) mais próximo (s) do pico do SNP é indicado. As análises para cada um dos seis estímulos *tone burst* incluíram 182.270 SNPs, cujas posições genômicas são mostradas ao longo do eixo x com seus valores $-\log_{10} P$ correspondentes indicados pelo eixo y. Os limiares de associação estatisticamente significativa ($P = 4,1 \times 10^{-6}$) e sugestivas ($P = 4,1 \times 10^{-6}$) são indicadas pelas linhas horizontais vermelhas e azuis, respectivamente.

Em seguida, utilizamos abordagens de bioinformática para priorizar genes candidatos em cada locus. Primeiro, usamos dados de expressão gênica publicamente disponíveis em vários tecidos no HMDP (<http://geneeqtl.genetics.ucla.edu/>) para determinar se a variação nos loci identificados apresentaram efeitos de ação cis na expressão do gene.

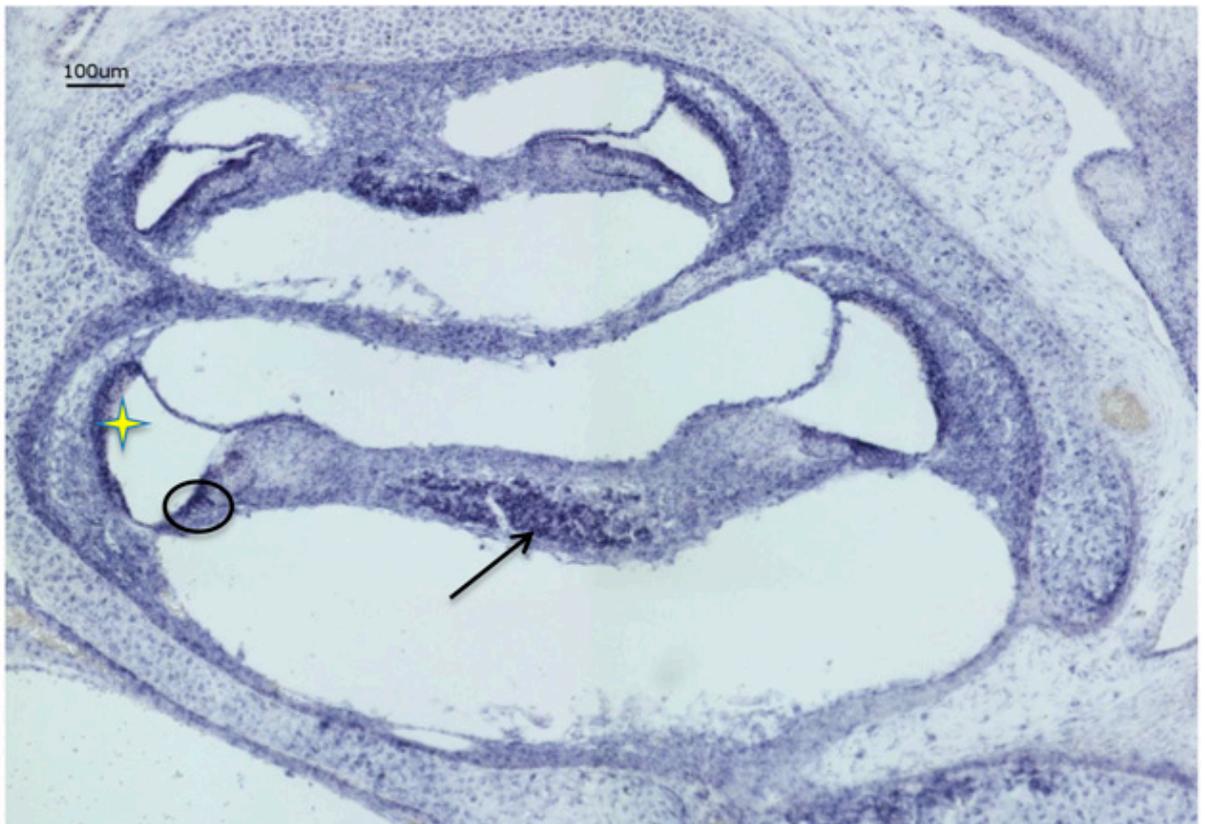
A expressão QTL (eQTL) foram considerados locais, ou *cis*, se o SNP principal mapeado estava dentro de um intervalo de 2 Mb do pico do SNP. Identificamos quatro genes como tendo *cis* eQTL no fígado: três (*Higd1a*, *Ccbp2* e *Ano10*) estão localizados no locus do cromossomo 9 identificado na frequência de 4 kHz, e o quarto *cis* eQTL no fígado é *Naip2*, que está localizado dentro da segunda região do cromossomo 13 que foi identificada na frequência de 24 kHz.

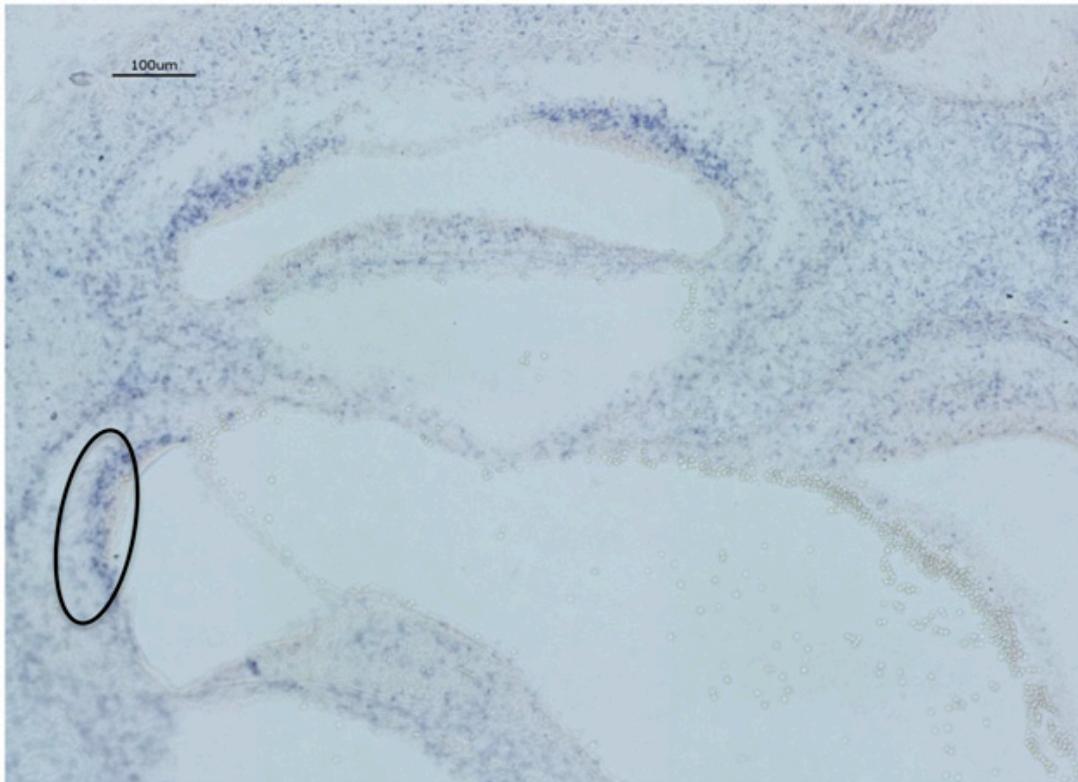
Questionamos se algum de nossos genes exibem *cis* eQTL na cóclea. Portanto, realizamos análise de associação com *microarrays* gerado dados de expressão gênica na cóclea de um subconjunto de 64 linhagens do HMDP. Notavelmente, vários de nossos loci exibiram *cis* eQTL no tecido coclear. Por exemplo, *Prpf19*, que mapeia aproximadamente 700 kb a montante de nosso SNP nas frequências de 4 kHz e 8 kHz, produziram um eQTL significativo na cóclea (rs30899404; $P = 2,7 \times 10^{-6}$), mas não em outros tecidos. Além disso, um eQTL para *Ms4a6d* (rs30768936; $P = 2,7 \times 10^{-6}$)

⁸⁾ foi localizado a 160 kb a jusante de nosso SNP na frequência de 12 kHz em um diferente região no cromossomo 19. Finalmente, o *Fbp1*, um cis eQTL altamente significativo (rs13481847; $P = 6,1 \times 10^{-21}$) na cóclea, mapeia 100 kb a montante do nosso SNP no cromossomo 13 na frequência de 24 kHz. Também realizamos hibridização in situ para visualizar onde estão expressos *Prpf19* e *Fbp1* na cóclea de camundongo (Figura 6), pois a expressão em diferentes regiões do órgão pode indicar diferentes funções biológicas. O epitélio sensorial e gânglio espiral demonstram expressão do *Prpf19* (Figura 6A); além disso, a expressão de *Fbp1* foi detectada na camada basal da estria vascular na cóclea de um camundongo P1 (Figura 6B).

Figura 6: Imagens de hibridização in situ exibindo expressão de mRNA coclear de genes candidatos.

A



B

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

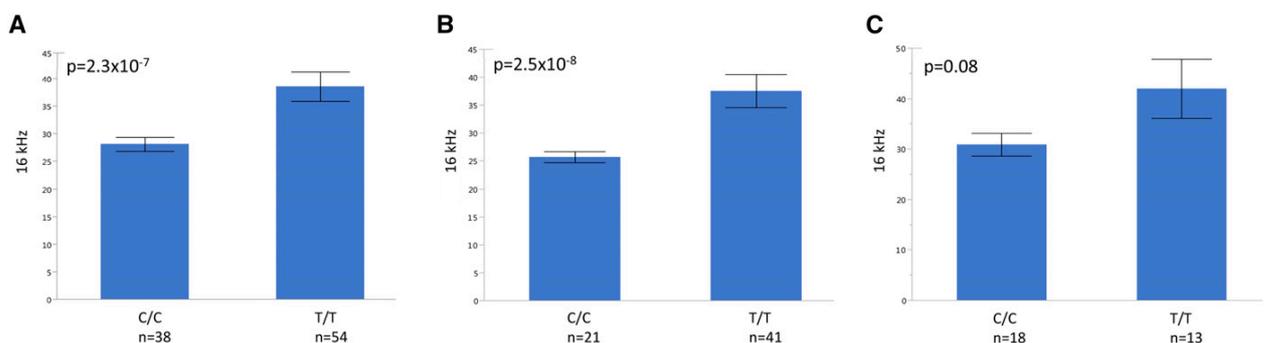
(A) *Prpf19* em P1 demonstra expressão no epitélio coclear, representado pelo círculo preto e pelo gânglio espiral indicado pela flecha preta. A estria vascular está indicada pela estrela amarela. (B) *Fbp1* na cóclea P1 demonstra expressão na camada basal da estria vascular, representada pelo círculo oval preto.

Além da análise eQTL, também usamos o navegador *Ensembl* para determinar se algum dos genes candidatos abriga substituições de aminoácidos entre as linhagens de camundongos consanguíneos que foram sequenciados. Dos genes candidatos examinados, *Otogl* tinha um Polimorfismo *Asn2170Ser* com maior probabilidade de ter consequências deletérias no *SIFT* (pontuação = 0,0) e *PolyPhen2* (pontuação = 1,0). *Otogl* é 87% idêntico ao aminoácido da proteína humana no e *Asn2170Ser* está localizado em uma região de alta homologia que é evolutivamente conservado em sete espécies de mamíferos. Uma análise posterior revelou que *Otogl* abrigava quatro substituições de aminoácidos (*Ser177Leu*, *Ala833Thr*, *Met1107Ile*, *Ser1258Pro*) entre as linhagens disponíveis, mas estas eram semelhantes em suas propriedades físico-químicas. A predição do *SIFT* indicava que poderiam ser

toleradas, ou estavam localizadas em regiões da proteína que não eram tão evolutivamente conservadas quanto a região que contém Asn2170Ser.

Com base nesses dados, concluímos que uma ou mais dessas variantes pode estar gerando essa associação estatisticamente significativa no locus do gene *Otogl*. Já que nenhuma das cinco substituições de aminoácidos foi incluída no painel de SNPs usados em nossas análises, usamos dados de sequência publicamente disponíveis para 25 linhagens consanguíneas para determinar a extensão de desequilíbrio de ligação (DL) entre as variantes e o pico *Otogl* SNP (rs29362366). Esta análise revelou que o Ser177Leu e as variantes Ala833Thr estavam em DL perfeito com rs29362366, enquanto Met1107Ile e Ser1258Pro foram muito mais fracamente vinculados. O polimorfismo Asn2170Ser também estava presente apenas na cepa DBA / 2J. Assim, a associação na *Otogl* poderia ser devido ao Ser177Leu e variantes de Ala833Thr, embora não houvesse previsão de algum efeito, ou de outros polimorfismos desconhecidos que estão presentes em o haplótipo contendo Ser177Leu, Ala833Thr e rs29362366. Alternativamente, a associação significativa pode ser devido à segregação de Asn2170Ser entre as cepas DBA e BXD RI. Para distinguir entre essas possibilidades, realizamos uma análise de associação com rs29362366 com e sem DBA / 2J e as linhagens BXD. Notavelmente, a exclusão dessas linhagens aumentou a associação significativa de rs29362366 na frequência de 16 kHz em uma ordem de magnitude ($P = 2,5 \times 10^{-8}$) em comparação com a análise que incluiu todas as linhagens ($P = 2,3 \times 10^{-7}$) (Figura 7). Por outro lado, rs29362366 não foi associado na frequência de 16 kHz em uma análise que incluiu apenas C57BL / 6J, DBA / 2J, e as linhagens BXD. Juntos, esses resultados sugerem que a associação no locus *Otogl* é devido ao haplótipo abrigando Ser177Leu, Ala833Thr e rs29362366.

Figura 7: PEATE na frequência de 16 kHz varia por genótipo em rs29362366. (A – C)



O efeito do SNP *Otogl* rs29362366 na frequência de 16 kHz. (A) Efeito do genótipo quando todas as linhagens são incluídas na análise. (B) Efeito do genótipo quando as linhagens DBA / 2J e BXD RI derivadas de cruzamentos C57BL / 6J e DBA / 2J são excluídos da análise. (C) Efeito do genótipo quando apenas as linhagens C57BL / 6J, DBA / 2J e BXD RI são incluídas na análise. Haplótipo contendo alelo C está presente em C57BL / 6J e o haplótipo contendo o alelo T está presente em DBA / 2J.

4.4 Estudo de associação do genoma inteiro após a exposição ao ruído com limiares auditivos do PEATE para definição de genes candidatos na PAIR.

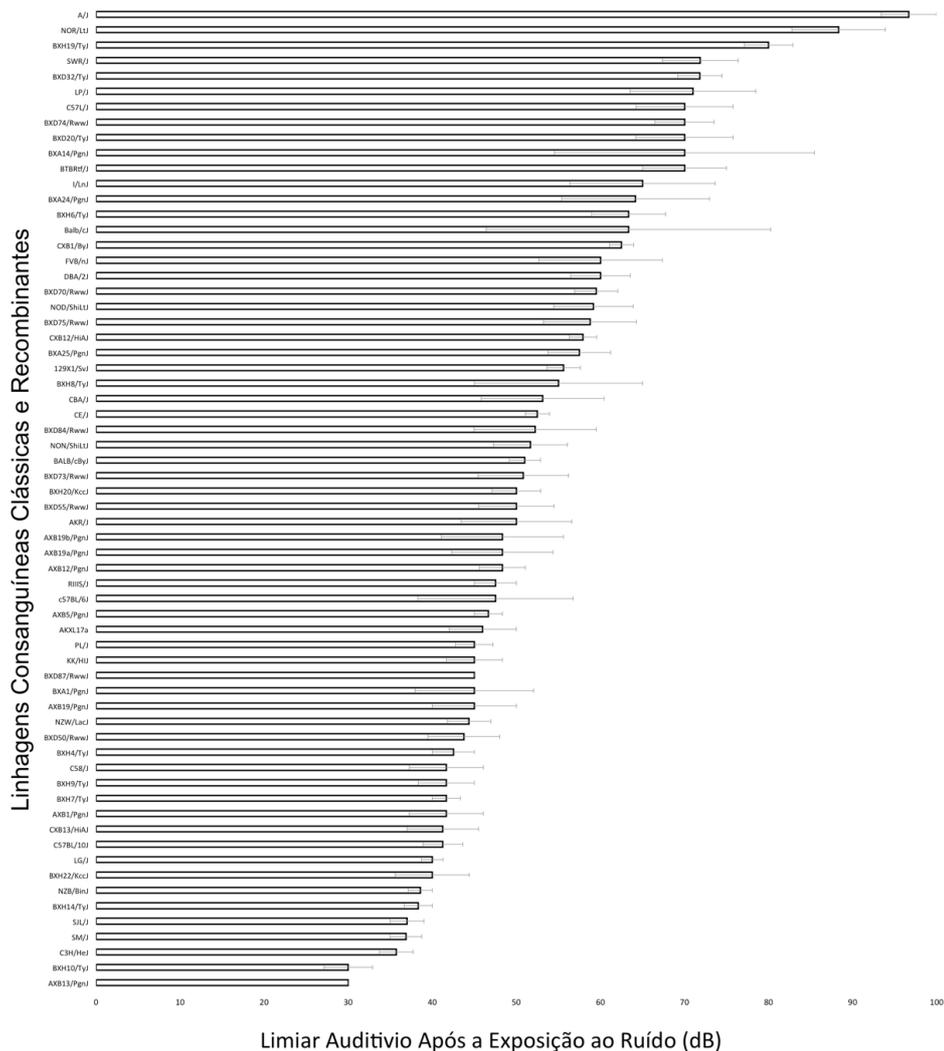
Num esforço para identificar regiões do genoma associados à susceptibilidade da PAIR, foram fenotipados camundongos fêmeas de 5 semanas de vida (n=297) de 64 linhagens do HMDP (n=4-5/linhagem). Foram avaliados os limiares auditivos (após a exposição ao ruído), utilizando os potenciais evocados auditivos de tronco cerebral em frequências específicas de estímulo. Os estímulos foram de 4, 8, 12, 16, 24 e 32 kHz *tone-bursts*.

Uma ampla variação de limiares auditivos (após exposição ao ruído) foi observado entre as 64 linhagens de camundongos do HMDP, sendo a diferença de 3,22 vezes na frequência de 8 kHz após a exposição ao ruído (Figura 8). As frequências de 4, 12, 16, 24 e 32 kHz demonstraram diferenças de 1,55, 3,25, 3,57, 2,74 e 3,75 vezes, respectivamente.

A Média \pm erro-padrão da média dos limiares auditivos após a exposição ao ruído, na frequência de 8 kHz, em 64 linhagens de camundongos consanguíneos do HMDP. A diferença entre os limiares auditivos das linhagens com os valores menores e maiores foi de 3,22 vezes.

O algoritmo EMMA foi aplicado para cada fenótipo, separadamente, a fim de identificar associações genéticas nos 6 diferentes estímulos de *tone-burst* (90). A associação com valores p ajustados foi calculada para 108.064 polimorfismos com uma frequência alélica menor superior a 5%. O equivalente ao valor $p < 0,05$, nos estudos de associação genômica utilizando o EMMA no HMDP, é $p=4.1 \times 10^{-6}$ ou $-\log_{10}P=5,39$.

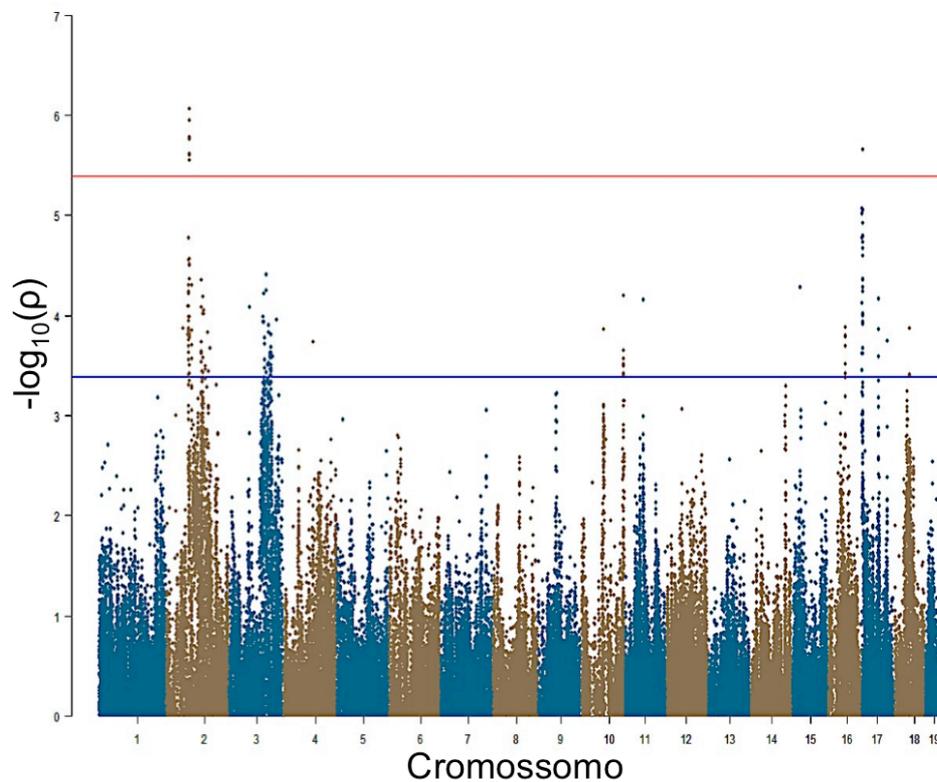
Figura 8: Caracterização dos limiares auditivos após a exposição ao ruído nas diferentes linhagens do Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP).



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Nesse ponto de corte, associações genômicas significativas no cromossomo 2 (rs27972902; $p=8.6 \times 10^{-7}$) e cromossomo 17 (rs33652818; $p=2.3 \times 10^{-6}$) foram identificados para o estímulo de 8 kHz (Tabela 1; Figura 9 e 10). Além disso, um sinal significativamente associado no cromossomo 15 (rs32934144; $p=1.7 \times 10^{-6}$) foi identificado com 16 kHz *tone-burst*. Duas associações significativas no cromossomo 3 (rs30795209; $p=5.5 \times 10^{-7}$) e cromossomo 15 (rs32278602; $p=5.9 \times 10^{-7}$) foram identificadas com 32 kHz *tone-burst*.

Figura 9: Resultados do estudo de associação do genoma inteiro para limiares auditivos após a exposição do ruído com o Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP).

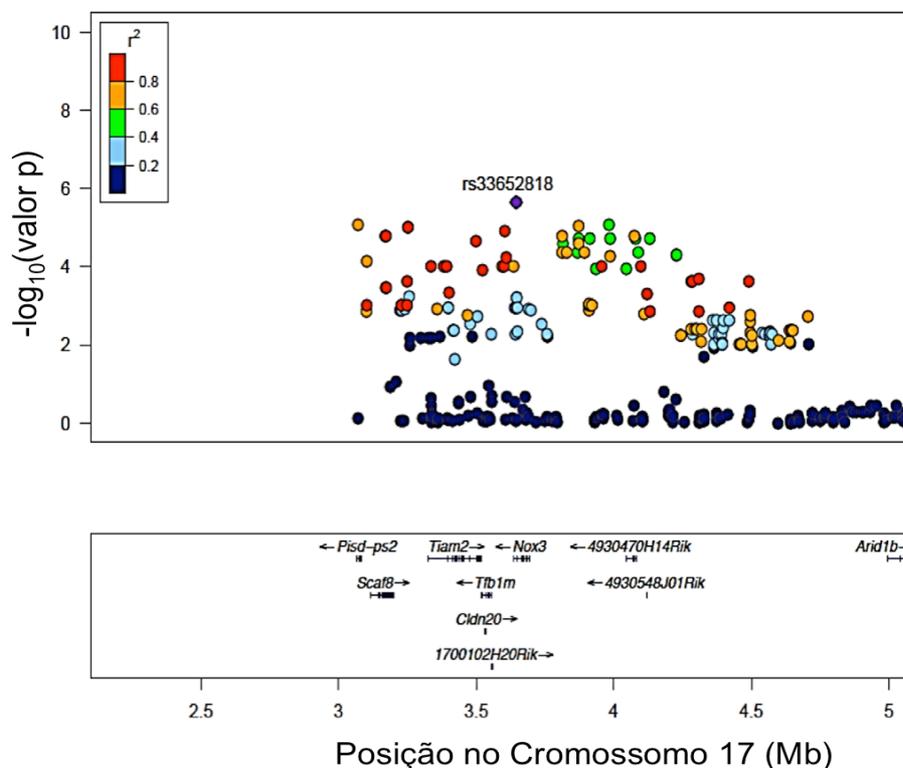


Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

O *Manhattan Plot* demonstra os valores p ($-\log P$) das associações ($-\log_{10}$) na frequência de 8 kHz em 64 linhagens de camundongos consanguíneos do HMDP. A análise foi realizada utilizando 108.064 polimorfismos com uma frequência alélica menor superior a 5%. Cada cromossomo foi traçado no eixo x com cores marrom e azul alternadas. Os polimorfismos nos cromossomos 2 e cromossomo 17, na frequência de 8 kHz, excederam o limiar pré-determinado de significância para estudos de associação do genoma inteiro utilizando o HMDP ($-\log P=5,39$).

O diamante azul representa o polimorfismo mais significativo ($p = 2,25E-06$). Os polimorfismos estão coloridos com base no seu desequilíbrio de ligação com o polimorfismo mais significativo, sendo então: polimorfismos vermelhos estão em desequilíbrio de ligação em $r^2 > 0,8$, polimorfismos laranjas estão em desequilíbrio de ligação em $r^2 > 0,6$ e polimorfismos verdes estão em desequilíbrio de ligação em $r^2 > 0,4$. As posições de todos os genes da sequência de referência (*RefSeq*) são traçados baseado na localização no genoma (*NCBI Build37 genome assembly*).

Figura 10: Gráfico regional da associação com o fenótipo (limiar auditivo após exposição ao ruído na frequência de 8 kHz) no cromossomo 17 centrado no principal polimorfismo do locus do gene *Nox3* (rs33652818).



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Tabela 1: Resultados do estudo de associação do genoma inteiro para PAIR com o Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP).

Fenótipo ^a	Cr.	Polimorfismo	Posição (Mb) ^b	-logP	MAF ^c	No. de Genes ^d	Região Humana (Cr.: Início Mb – Fim Mb)
4 kHz	17	rs33652818	3.8	1.1E-04	0.222	10	Cr6:155.0-155.7
8 kHz	2	rs27972902	68.1	8.58E-07*	0.222	2	Cr2:168.8-169.6
8 kHz	17	rs33652818	3.8	2.25E-06*	0.222	10	Cr6:155.0-155.7
16 kHz	15	rs32934144	28.2	1.74E-06*	0.389	2	Cr5:13.6-14.8
32 kHz	3	rs30795209	96.7	1.95E-07*	0.278	11	Cr1:145.6-147.4
32 kHz	15	rs32278602	22.3	5.86E-07*	0.389	2	Cr5:19.4-22.2

^aLimiares auditivos após a exposição ao ruído em diferenças frequências

^bLocalização baseada na montagem do genoma (*NCBI Build37*)

^cMAF, frequência alélica menor

^dNúmero de genes na sequência de referência (*NCBI Build37 Assembly*) posicionados do intervalo de confiança (2,6 Mb) da associação.

* Significância estatística em estudos de associação do genoma inteiro ($p < 4,1E-6$)

Cr. = cromossomo

Dentro de cada pico associado, existem quatro (cromossomo 15), 11 (cromossomo 3), 10 (cromossomo 17) e dois (cromossomo 2) genes da sequência de referência (*RefSeq*). Após, foram identificados genes, dentro de cada um dos cinco intervalos, que apresentassem alterações funcionais. Os genes foram selecionados com base na sua regulação por um *locus* de fenótipo quantitativo com expressão local (*cis* eQTL) no HMDP ou de acordo com o recebimento de um polimorfismo de base única não sinônimo (NS SNP) com consequências funcionais.

Na análise de *locus* de fenótipo quantitativo de expressão (eQTL), foram gerados *microarrays* com perfis de expressão gênica. Foram utilizados o RNA isolado de cócleas de 64 linhagens do HMDP ($n=3$ *microarrays* por linhagem). O EMMA foi utilizado para realizar uma análise de associação entre todos os polimorfismos e as sondas dos *microarrays* mapeados em cada região. Após excluir sondas sobrepostas em determinados polimorfismos, um total de 18.138 genes foram representados por pelo menos uma sonda, os quais estão presentes nas linhagens consanguíneas clássicas utilizadas no HMDP (seção de Material e Métodos). Desse total, seis genes (quatro na associação do cromossomo 3 e dois na associação do cromossomo 17) foram identificados em pelo menos uma sonda com expressão regulada por um eQTL local (Tabela 2). Entretanto, a única sonda significativa, em que a expressão era regulada por um eQTL local na cóclea, estava localizado no cromossomo 17.

Tabela 2: Genes nos picos das cinco associações para perda auditiva induzida por ruído (PAIR) regulados por um locus de fenótipo quantitativo de expressão (eQTL) local na cóclea.

Gene	RefSeq	Cr	txInício (bp) ^a	txFim (bp) ^b	eQTL local P ^c
<i>Pias3</i>	ILMN_2631014	3	96696384	96706070	6.78E-02
<i>CD160</i>	ILMN_2707181	3	96798763	96829351	1.49E-02
<i>Gja8</i>	ILMN_2625168	3	96918863	96926020	3.09E-01
<i>Gja5</i>	ILMN_2678477	3	97032416	97053634	4.07E-01
<i>Tiam2</i>	ILMN_2836875	17	3326573	3519397	3.71E-01
<i>Tfb1m</i>	ILMN_2690441	17	3519263	3557713	1.08E-06

^atxInício, início da localização do transcrito (*NCBI Build3 genome assembly*).

^btxFim, fim da localização do transcrito (*NCBI Build37 genome assembly*).

^cValor p estatisticamente significativo $\leq 5,1E-04$ (Bonferroni corrigido para o número de sondas testadas)

RefSeq = genes da sequência de referência

Foi determinado se algum desses 27 genes, implicados no estudo preliminar de associação do genoma inteiro, apresenta um papel definido na orelha interna. As

associações nos cromossomos 2, 3 e 15 não apontavam genes cocleares conhecidos. Somente a NADPH oxidase 3 (*Nox3*), no cromossomo 17, tem sido implicada na biologia da orelha interna através da definição de que os mutantes têm ausência de otocônia na mácula sacular e utricular (15) e o gene *Nox3* apresenta alta expressão na orelha interna (90).

4.5 Estudo de Associação do Genoma Inteiro antes e após a exposição ao ruído utilizando o fenótipo da amplitude supraliminar das emissões otoacústicas por produtos de distorção.

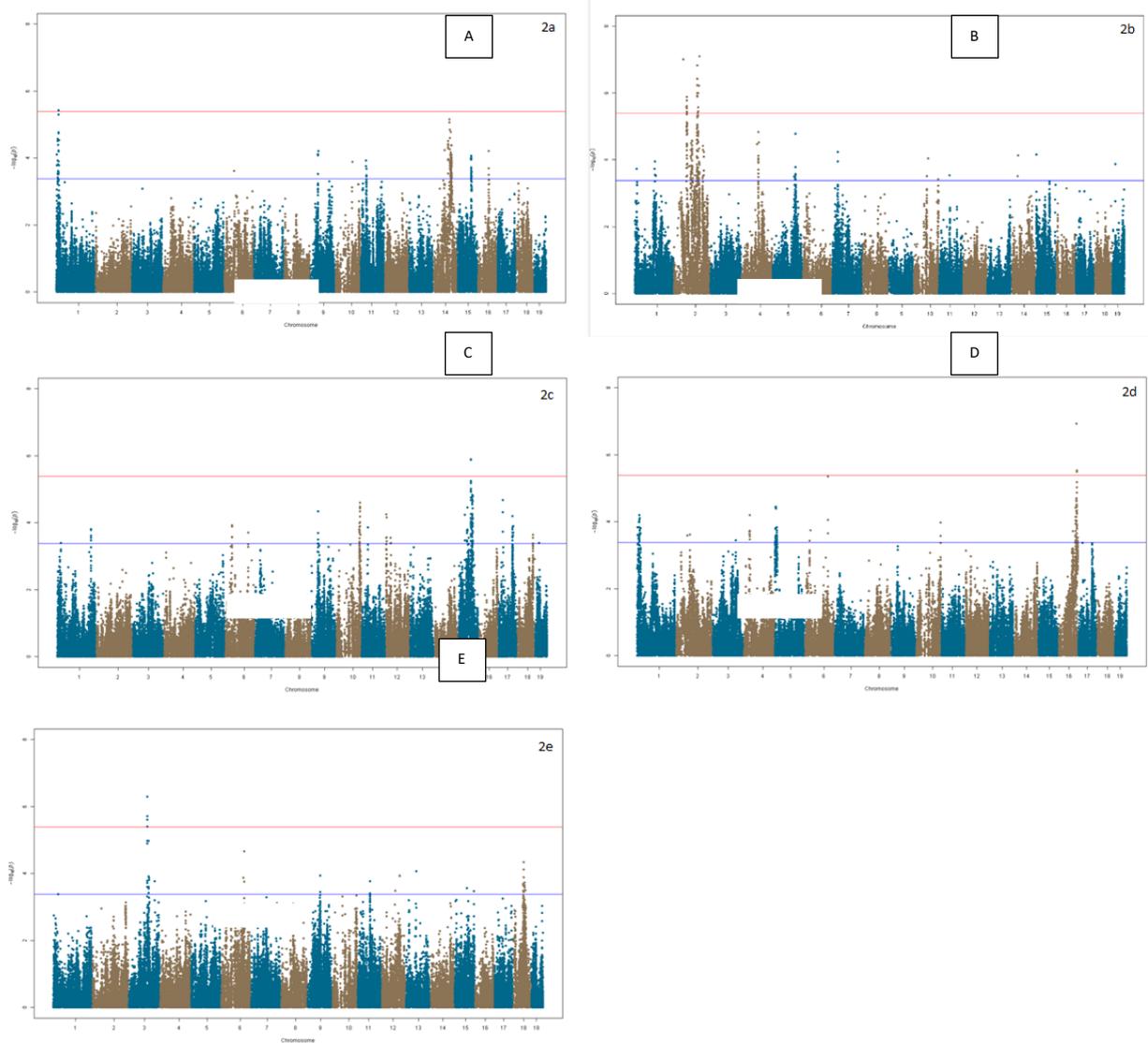
O algoritmo do *Efficient Mixed-Model Association* (EMMA) foi aplicado a cada fenótipo separadamente para identificar associações genéticas para os 6 estímulos *tone-burst*. Os valores de p da associação ajustada foram calculados para os 108.064 SNPs com frequência alélica menor > 5% ($p = 4,1 \times 10^{-6}$, $-\log_{10}p = 5,39$). Neste limiar, associações estatisticamente significativas foram identificadas no cromossomo 1 antes da exposição ao ruído e nos cromossomos 2, 3, 15 e 16 após a exposição ao ruído.

Uma associação foi realizada para cada fenótipo separadamente antes da exposição (Figura 11A) e após a exposição ao ruído (Fig. 11 B-E) e identificou vários loci nas várias frequências testadas.

A análise foi realizada usando aproximadamente 200.000 SNPs com frequência de alelo menor > 5%. Cada cromossomo é plotado no eixo x em cores alternadas de marrom e azul.

O diamante azul representa o SNP mais significativo. Outros SNPs são coloridos com base em seu DL, como segue: SNPs vermelhos em DL em $r^2 > 0,8$, SNPs laranja em DL em $r^2 > 0,6$ e SNPs verdes em DL em $r^2 > 0,4$. As posições de todos os genes *RefSeq* são plotados usando sites genômicos (NCBI Build 37).

Figura 11: Manhattan Plot: Picos de associação ($-\log_{10}$) de valores p ($-\log_{10}p$) para 32 kHz - 70 dB (A) antes da exposição ao ruído e 8 kHz - 70 dB (B), 11,3 kHz - 70 dB (C), 16 kHz - 60 dB (D) e 32 kHz - 70 dB (E) após a exposição ao ruído.



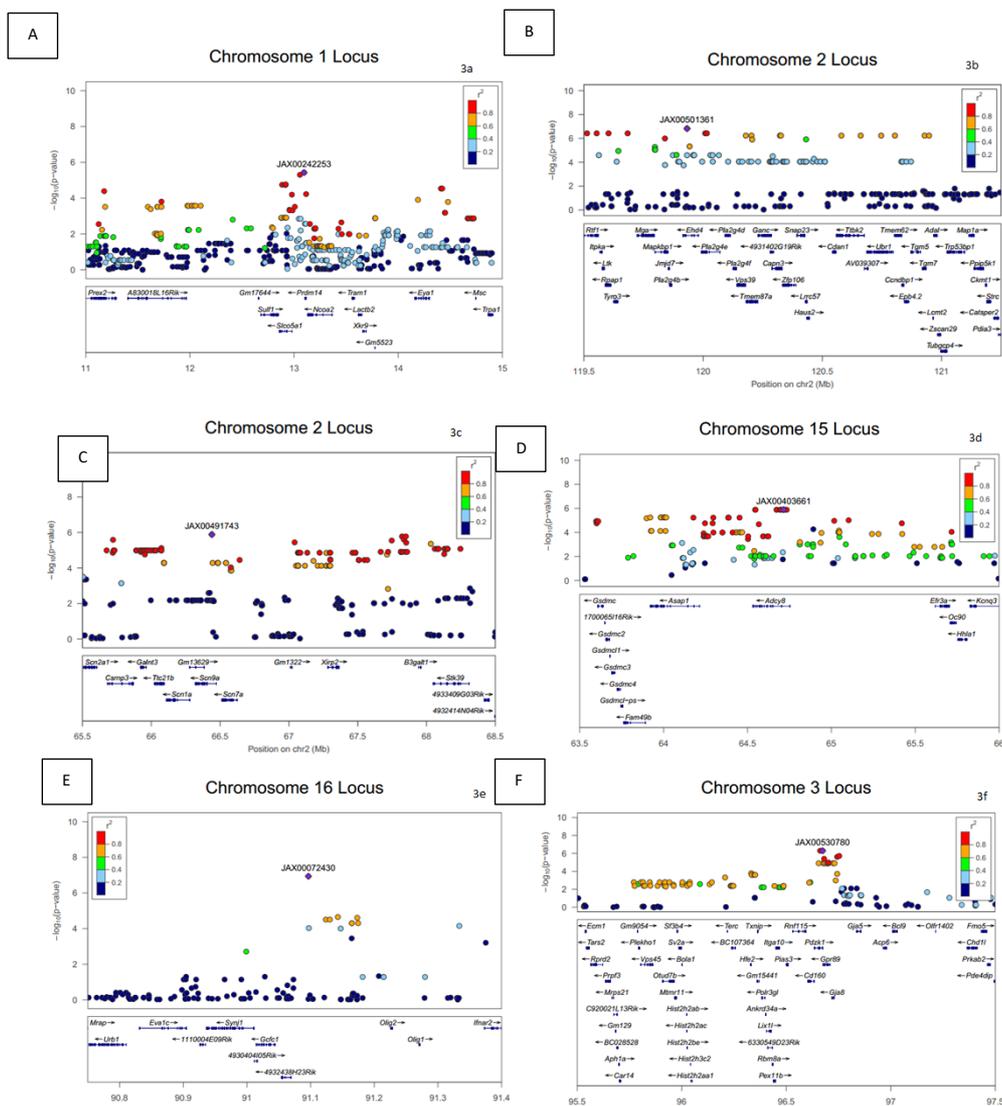
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Antes da exposição ao ruído, uma associação estatisticamente significativa foi identificada no cromossomo 1 (Fig. 12 A). Após a exposição, as associações foram consideradas estatisticamente significativas no cromossomo 2 (Fig. 12 B, C), cromossomo 15 (Fig. 12 D), cromossomo 16 (Fig. 12 E) e cromossomo 3 (Fig. 12 F).

Os dados de expressão gênica no tecido coclear permitiram analisar todos 144 genes candidatos em cada intervalo de associação. Genes foram identificados dentro

de cada um dos intervalos regulados por um *locus* de fenótipo quantitativo de expressão local (eQTL). Com objetivo de realizar uma análise de eQTL, perfis de expressão gênica (*microarrays*) foram gerados usando RNA coclear de 64 linhagens de camundongos (n = 3 camundongos por linhagem). Subseqüentemente, o EMMA foi usado para realizar uma análise de associação entre todos os SNPs e os probes mapeados dentro de cada região. Depois de excluir os probes que se sobrepõem aos SNPs presente entre as linhagens consanguíneas clássicas usadas na HMDP, conforme descrito nos métodos, 18.138 genes foram representado por pelo menos 1 probe.

Figura 12: Pico de associação centrado no SNP principal na frequência de 32 kHz - 70 dB (A) antes da exposição ao ruído e 8 kHz – 70 dB (B, C), 11,3 kHz - 70 dB (D), 16 kHz - 60 dB (E) e 23 kHz - 70 dB (F) após a exposição ao ruído.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Os loci com SNPs mapeados dentro de 2 Mb do gene cuja expressão foi regulada foram considerados eQTLs "locais" ou de ação *cis*, enquanto SNPs mapeados em outro lugar foram considerados "distais" e, presumivelmente, *trans* eQTLs. O ponto de corte significativo de p ($p = 1 \times 10^{-6}$) foi calculado para associações locais e distais. Esses genes foram priorizados se fossem regulados por um eQTL local. Um total de 35 genes nos 6 *loci* identificados tinham pelo menos 1 sonda cuja expressão foi regulada por um *cis*-eQTL significativo na cóclea (Tabela 3).

Tabela 3: Genes candidatos nos picos de associação regulado por *cis* eQTL na cóclea. :

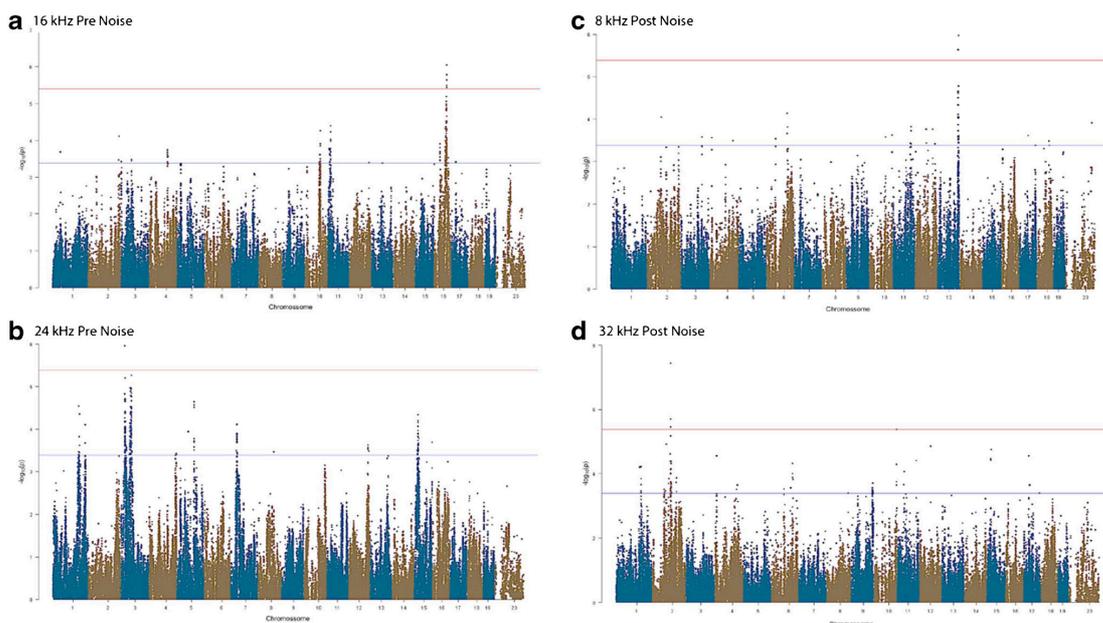
Gene	RefSeq	Cr	txinício(bp) ^a	txfim (bp) ^b	Local eQTL P ^c
<i>Xkr9</i>	ILMN_3159558	1	13668771	13701723	1,79E-01
<i>Eya1</i>	ILMN_2638487	1	14168954	14310200	6,26E-03
<i>Msc</i>	ILMN_2769777	1	14753346	14755966	2,50E-04
<i>Mapkbp1</i>	ILMN_2873793	2	119972699	120027408	3,77E-02
<i>Pla2g4d</i>	ILMN_3156124	2	120265595	120289197	4,79E-02
<i>Ltk</i>	ILMN_1219860	2	119751320	119760431	6,37E-02
<i>Rpap1</i>	ILMN_2602151	2	119763304	119787537	1,65E-02
<i>Pla2g4f</i>	ILMN_2727722	2	120299957	120314165	1,03E-03
<i>Vps39</i>	ILMN_3129752	2	120316461	120353137	1,52E-02
<i>Tmem87a</i>	ILMN_2969172	2	120355312	120404113	1,57E-02
<i>Ganc</i>	ILMN_2791355	2	120403896	120461700	1,85E-01
<i>Zfp106</i>	ILMN_2482427	2	120506820	120563843	2,30E-01
<i>Tgm5</i>	ILMN_2690147	2	121046111	121085841	3,14E-01
<i>Ccndbp1</i>	ILMN_1240178	2	121008403	121016904	3,18E-01
<i>Adal</i>	ILMN_1242772	2	121140428	121156680	3,35E-01
<i>Trp53bp1</i>	ILMN_1243753	2	121193281	121271407	3,80E-02
<i>Tubgcp4</i>	ILMN_1257622	2	121170654	121198770	3,82E-01
<i>Adcy8</i>	ILMN_2607127	15	64699042	64922296	3,79E-01
<i>Gpr89</i>	ILMN_2953098	3	96868281	96905346	3,07E-02
<i>Cd160</i>	ILMN_2707181	3	96798763	96829351	1,49E-02
<i>Fmo5</i>	ILMN_1230890	3	97628804	97655282	3,52E-01
<i>Chd1l</i>	ILMN_2986172	3	97560742	97610203	1,57E-02
<i>Pde4dip</i>	ILMN_3064283	3	97689824	97888707	4,00E-01
<i>Ankrd34a</i>	ILMN_3020599	3	96596636	96599775	6,43E-02
<i>Rbm8a</i>	ILMN_1252850	3	96629928	96633779	6,80E-02
<i>Pex11b</i>	ILMN_1258372	3	96635376	96653101	1,64E-01
<i>Sv2a</i>	ILMN_1213495	3	96181151	96195521	3,01E-01
<i>Mtmr11</i>	ILMN_2676662	3	96162004	96171718	3,77E-01
<i>Hist2h2ac</i>	ILMN_1218380	3	96220361	96220880	4,10E-01
<i>Hist2h2be</i>	ILMN_1231066	3	96221121	96223738	9,24E-03
<i>Prpf3</i>	ILMN_2941430	3	95830124	95855885	5,17E-02
<i>BC028528</i>	ILMN_2656422	3	95883954	95892005	2,21E-01
<i>Aph1a</i>	ILMN_1232821	3	95893969	95898288	3,09E-02

4.6 Estudo de associação do genoma inteiro antes e após a exposição ao ruído utilizando o fenótipo da amplitude da onda I do PEATE para caracterização de genes candidatos a sinaptopatia coclear induzida pelo ruído.

A análise de associação foi aplicada à resposta a cada frequência separadamente para identificar associações para os cinco estímulos *tone-burst*. Apresentamos o estudo de associação do genoma inteiro para antes (Fig. 13 A e B) e após a exposição ao ruído (Fig. 13 C e D) a fim de identificar *loci* associados com as várias frequências testadas. Valores de associação (ajustados) foram calculados para 200.000 SNPs com frequência de alelo menor de 95% ($p = 4,1 \times 10^{-6}$, $-\log_{10}P = 5,39$), conforme descrito acima.

A análise foi realizada usando ~ 200.000 SNPs com uma frequência de alelo menor > 5%. Cada cromossomo é plotado em o eixo x em cores alternadas de marrom e azul. SNPs nos cromossomos 16, 3, 13 e 2 excederam o limiar de significância ($-\log_{10}P = 5,39$). Acima do limiar de significância estatística ($-\log_{10}P = 5,39$), associações nos cromossomos 3 e 16 antes da exposição foram identificadas e nos cromossomos 2 e 13 após a exposição ao ruído (Figura 13). Os detalhes de cada associação são fornecidos na Tabela 4.

Figura 13: Manhattan Plot mostrando a associação ($-\log_{10}$) dos valores de p ($-\log_{10}P$) para as frequências de 16 kHz (a) e 24 kHz (b) antes da exposição ao ruído em 8 kHz (c) e 32 kHz (d) após a exposição ao ruído em 102 HMDP linhagens de camundongos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Tabela 4: Resultados do estudo de associação do genoma inteiro antes e após a exposição ao ruído com amplitude P1-N1 do PEATE.

Fenótipo ^a	Cr	SNP	Posição ^b	-logP	Gene ^c	Região Humana (Cr: Início Mb – Fim Mb)
16 kHz Pré-exposição	16	JAX00424604	73.0	9.02 E-07	2	Cr3:77.5-79.8
24 kHz Pré-exposição	3	JAX00105429	25.7	1.12 E-06	11	Cr3:171.3-174.2
8 kHz Pós-exposição	13	JAX00049416	116.5	1.07 E-06	23	Cr5:50.7-54.9
32 kHz Pós-exposição	2	JAX00497967	101.9	3.68 E-08	14	Cr11:34.8-37.1

a Amplitudes P1-N1 antes e após a exposição ao ruído em diferentes frequências de estímulo.

b Locais baseados na montagem do genoma (NCBI's Build37)

c Número de genes *RefSeq* (montagem NCBI's Build37) localizados no intervalo de confiança de associação (2,6 Mb)

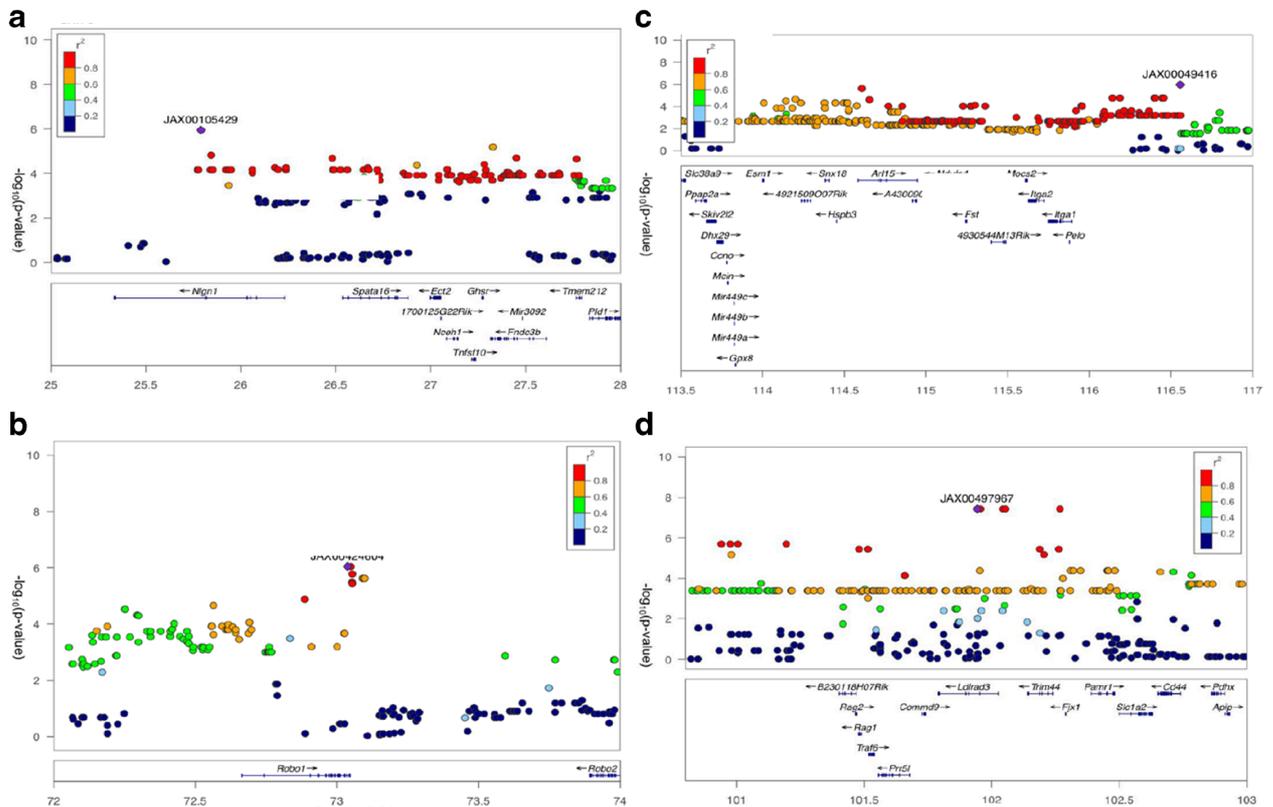
A fim de explorar essas 4 regiões do genoma, definimos 2,6 Mb como nosso intervalo (Tabela 4).

Antes da exposição ao ruído, foram identificadas associações no cromossomo 3 (Fig. 14A) e 16 (Fig. 14B) excedendo o limiar de significância. Após a exposição ao ruído, as associações foram consideradas significativas no cromossomo 13 (Fig. 14C) e cromossomo 2 (Fig. 14D).

O diamante azul representa o SNP mais significativo e os SNPs são coloridos com base em seu DL com o mais significativo SNP. Os SNPs vermelhos em DL em $r^2 > 0,8$, SNPs laranja em DL em $r^2 > 0,6$ e SNPs verdes em DL em $r^2 > 0,4$. As posições de todos os genes *RefSeq* são plotados usando localizações de genoma.

A variação quantitativa nos níveis de expressão gênica em um tecido específico pode atuar como um fenótipo intermediário entre a variação de sequências genômicas e fenótipos para explicar os fatores hereditários “ocultos” restantes. A herdabilidade da expressão do gene significa que pode estar sujeito às mesmas análises de loci de característica quantitativa (QTL) como dados de fenótipos convencionais para revelar o chamado loci de expressão de fenótipos quantitativos (eQTLs). A abundância de transcrição de cada gene será o fenótipo analisado e pode, portanto, ser mapeado no genoma usando métodos de ligação padrão, permitindo identificação de eQTLs que explicam as frações de um fenótipo de expressão gênica.

Figura 14: Intervalo da associação significativa centrada no SNP principal para a exposição antes da exposição ao ruído em 24 kHz (a) e 16 kHz (b) e após a exposição ao ruído em 8 kHz (c) e 32 kHz (d) em 102 linhagens de camundongos consanguíneos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Nossos dados de expressão coclear nos permitiram analisar todos os 50 genes candidatos identificados em cada intervalo de associação. Exceto pelo locus do cromossomo 16, nós identificamos genes encontrados dentro de cada um dos intervalos regulados por um eQTL local. A fim de realizar análises de eQTL, geramos perfis de *microarrays* de expressão gênica usando RNA isolado de cóclea em 64 linhagens do HMDP ($n = 3$ camundongos por linhagem). Em seguida, utilizamos o EMMA para realizar uma análise de associação entre todos os SNPs e os probes mapeados dentro de cada região.

Um total de 17 genes (2 genes dentro da associação do cromossomo 3, 6 genes dentro da associação do cromossomo 2, e 9 genes dentro da associação do cromossomo 13) foram identificadas com pelo menos 1 probe cuja expressão foi regulado por um *cis* eQTL significativo na cóclea (Tabela 5). Embora não houvesse *cis*-eQTLs cocleares identificados para genes dentro do intervalo de associação na

frequência de 24 kHz, o SNP principal está dentro de uma região contendo apenas dois genes, *Robo1* e *Robo2*, ambos associados à inervação da cóclea do camundongo, validando nossa abordagem.

Tabela 5: Genes candidatos dentro de 3 picos de associação regulados por cis eQTL na cóclea.

Gene	RefSeq	Cr	txinício(bp) ^a	txfim (bp) ^b	Local eQTL p ^c
<i>Ghsr</i>	ILMN_2872464	3	27371351	27378010	1.42E-06
<i>Fndc3b</i>	ILMN_2862567	3	27416162	27710439	2.35E-06
<i>B230118H07Rik</i>	ILMN_2726101	2	101560781	101649532	3.42E-06
<i>Ldlrad3</i>	ILMN_1217129	2	101950203	102186385	3.56E-06
<i>Trim44</i>	ILMN_2471289	2	102300119	102407828	3.6E-06
<i>Cd44</i>	ILMN_3114585	2	102810241	102901665	3.65E-06
<i>Slc1a2</i>	ILMN_2642339	2	102658659	102790784	3.82E-06
<i>Traf6</i>	ILMN_2427560	2	101678429	101701669	3.90E-06
<i>Slc38a9</i>	ILMN_1242435	13	112660766	112738743	4.01E-06
<i>Esm1</i>	ILMN_1257574	13	113209659	113218098	2.03E-07
<i>Ndufs4</i>	ILMN_1234521	13	114287795	114388094	1.84E-06
<i>Ppap2a</i>	ILMN_1222991	13	112800894	112867881	2.46E-06
<i>Itga1</i>	ILMN_2701778	13	62677826	62783982	9.28E-07
<i>Dhx29</i>	ILMN_2892376	13	112927730	112969431	2.58E-06
<i>Pelo</i>	ILMN_2853658	13	115088357	115090188	2.62E-06
<i>Ccno</i>	ILMN_2736471	13	112987802	112990778	2.87E-06
<i>Gpx8</i>	ILMN_2653166	13	113042763	113046388	3.10E-06

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

atxStart, local de início da transcrição (montagem do genoma NCBI Build37).

btxEnd, localização da extremidade da transcrição (montagem do genoma NCBI Build37).

cValor de p estatisticamente significativo $\leq E-06$ (Bonferroni corrigido para o número de probes testados)

4.7 Validação do gene candidato *Nox3* no desenvolvimento da PAIR.

De todos os genes no *locus* do cromossomo 17, somente o gene *Tfb1m* apresenta um eQTL significativo ($1,08 \times 10^{-6}$) (Tabela 6). Cabe destacar que o gene *Nox3*, onde o pico do polimorfismo está localizado no estudo de associação, não possui um eQTL na cóclea.

Entretanto, existe clara demonstração (90) de que o *Nox3* é altamente expresso (pelo menos 50 vezes mais do que em qualquer outro tecido) em regiões específicas da orelha interna. Com base nesses dados e na localização do polimorfismo-pico no estudo de associação (rs33652818), focou-se no *Nox3* como um gene candidato plausível para PAIR no *locus* do cromossomo 17.

Tabela 6: Genes nos picos das cinco associações para perda auditiva induzida por ruído (PAIR) regulados por um locus de fenótipo quantitativo de expressão (eQTL) local na cóclea.

Gene	RefSeq	Cr	txInicio (bp) ^a	txFim (bp) ^b	eQTL local P ^c
Pias3	ILMN_2631014	3	96696384	96706070	6.78E-02
CD160	ILMN_2707181	3	96798763	96829351	1.49E-02
Gja8	ILMN_2625168	3	96918863	96926020	3.09E-01
Gja5	ILMN_2678477	3	97032416	97053634	4.07E-01
Tiam2	ILMN_2836875	17	3326573	3519397	3.71E-01
Tfb1m	ILMN_2690441	17	3519263	3557713	1.08E-06

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

^atxInicio, início da localização do transcrito (*NCBI Build3 genome assembly*).

^btxFim, fim da localização do transcrito (*NCBI Build37 genome assembly*).

^cValor p estatisticamente significativo $\leq 5,1E-04$ (Bonferroni corrigido para o número de sondas testadas)

RefSeq = genes da sequência de referência

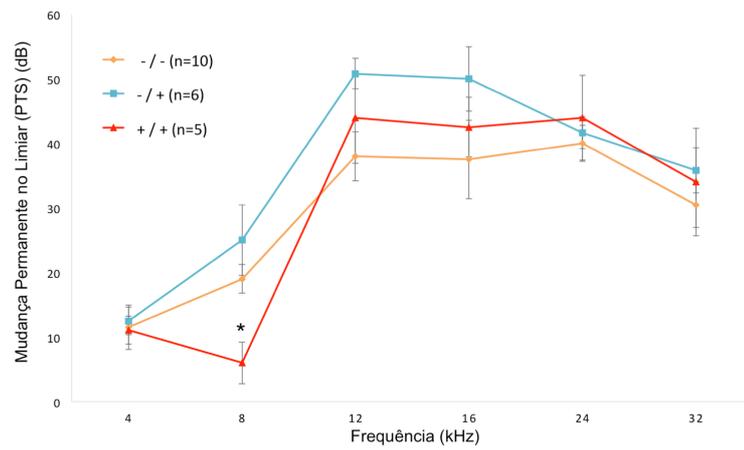
A fim de testar diretamente a hipótese de que o *Nox3* estava associado com a susceptibilidade à PAIR, foi caracterizado um camundongo mutante previamente gerado. O camundongo *Nox3^{het}* foi testado através dos limiares auditivos pré- e pós-exposição ao ruído e mudança permanente de limiar (PTS) após estímulos de 4, 8, 12, 16, 24 e 32 kHz *tone-burst*. De forma consistente com os achados do estudo de associação do genoma inteiro, essa análise revelou uma redução estatisticamente significativa no PTS do camundongo do tipo selvagem (linhagem C57BL/6JEiJ) comparada ao *Nox3^{het/+}* e *Nox3^{het/Nox3^{het}}* em 8 kHz (Figura 15).

De forma comparativa, estão demonstrados, na Figura 5, os efeitos do pico do polimorfismo (rs33652818) no *locus Nox3* nas diferentes frequências do PEATE. Curiosamente, existiam diferenças significativas em função do genótipo nas frequências testadas de 4 kHz e 8 kHz (Figura 16).

Entretanto, na frequência de 4 kHz, foi somente sugestiva ($p=1,1 \times 10^{-4}$) e não alcançou o nível de significância dos estudos de associação do genoma inteiro. Dessa forma, a associação significativa e altamente sugestiva do rs33652818 nos fenótipos

de 8 e 4 kHz, respectivamente, assim como o fenótipo apresentado pelo camundongo $Nox3^{het}/Nox3^{het}$, sugere que o $Nox3$ pode estar envolvido na extremidade inferior do espectro de frequências para PAIR.

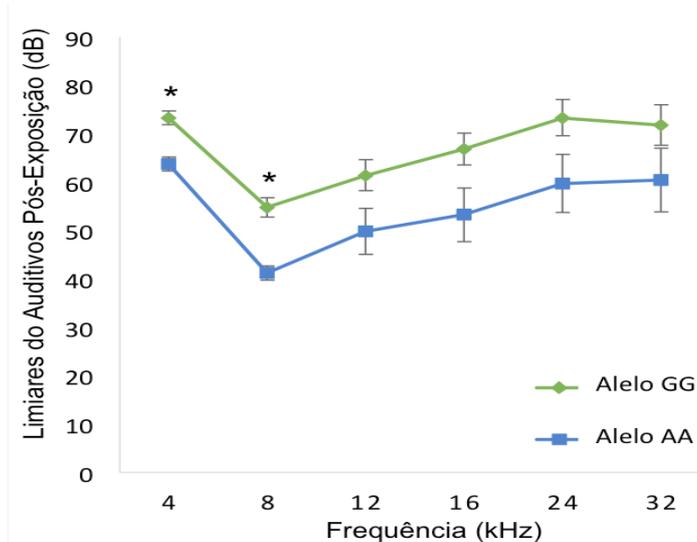
Figura 15: Camundongos $Nox3^{het}$ apresentam maior mudança permanente de limiar (PTS) na frequência de 8 kHz. $Nox3^{het}/Nox3^{het}$ e $Nox3^{het}/+$ apresentam uma PTS significativamente maior em comparação com os controles do tipo selvagem.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Os dados apresentados são as comparações das médias analisadas através do *one-way* ANOVA (teste *post hoc* de Tukey para comparações múltiplas) * $p < 0,05$.
 $-/- = Nox3^{het}/Nox3^{het}$; $-/+ = Nox3^{het}/+$; $+/+ =$ tipo selvagem (linhagem C57BL/6JEiJ).

Figura 16: Efeito genotípico do polimorfismo-pico (rs33652818) no locus do $Nox3$. Comparação entre os alelos GG e AA através de várias frequências.

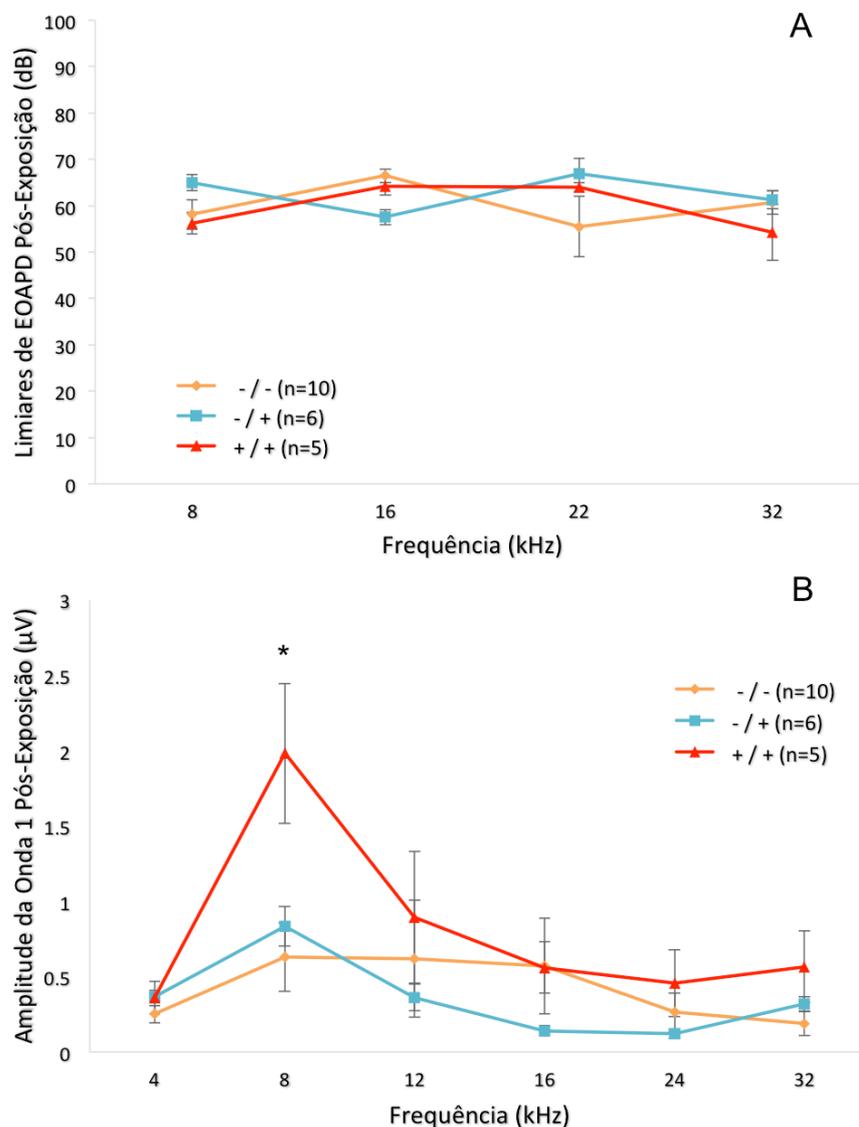


Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Existe uma diferença estatisticamente significativa entre os alelos nas frequências 4 e 8 kHz. * = valor $p < 0,001$. Barras de erro +/- 1 EP.

Numa análise topográfica de toda a via auditiva, foi avaliada a atividade das células ciliadas externas (CCE) através das EOAPDs e das células ciliadas internas (CCI) e respostas neuronais através da amplitude pico-a-pico da onda 1 do PEATE. Mesmo com ausência de diferença estatisticamente significativa nos limiares das EOAPDs (Figura 17A) em 8, 16, 22 e 32 kHz, existiu uma significativa diferença nas amplitudes pico-a-pico da onda 1 do PEATE na frequência isolada de 8 kHz (Figura 17B).

Figura 17: Análise topográfica da via auditiva em diferentes frequências (após a exposição ao ruído).

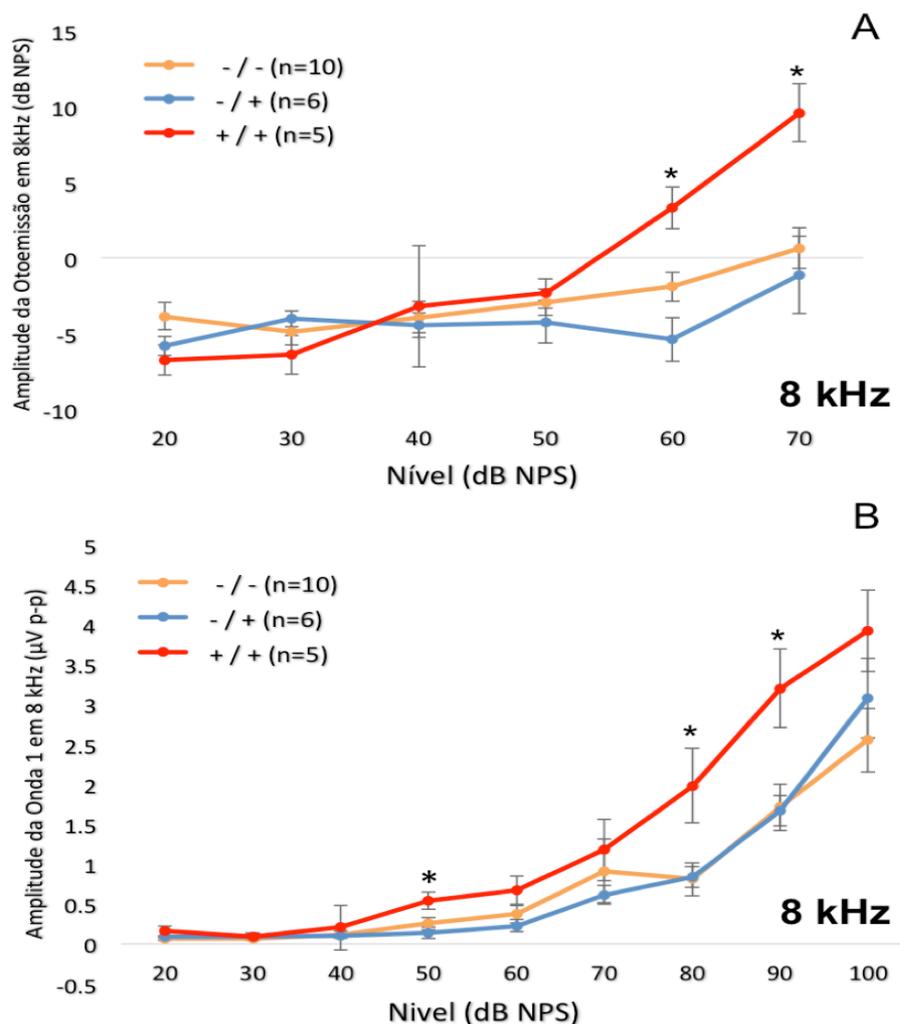


Fonte: Elaborado pelo autor

Embora não tenha sido identificada diferença significativa para os limiares auditivos por EOAPDs (17A), os camundongos do tipo selvagem apresentam uma maior amplitude da onda 1 ($p=0,010$), somente em 8 kHz, quando comparado com $Nox3^{het/+}$ e $Nox3^{het}/Nox3^{het}$ (17B). *One-way* ANOVA (teste de Tukey para comparações múltiplas). * = $p < 0,05$. -/- = $Nox3^{het}/Nox3^{het}$; -/+ = $Nox3^{het/+}$; +/+ = tipo selvagem (linhagem C57BL/6JEiJ).

As amplitudes supraliminares (Figura 18A) das EOAPDs (dB NPS) e da onda 1 do PEATE (μV) (Figura 18B) para 8 kHz (*tone-burst*) foram comparadas através de diferentes intensidades de estímulo. Ambas as análises demonstram, de forma estatisticamente significativa, um menor dano causado pelo ruído no tipo selvagem em comparação com o heterozigoto e o camundongo mutante.

Figura 18: Análise detalhada do estímulo na frequência de 8 kHz.

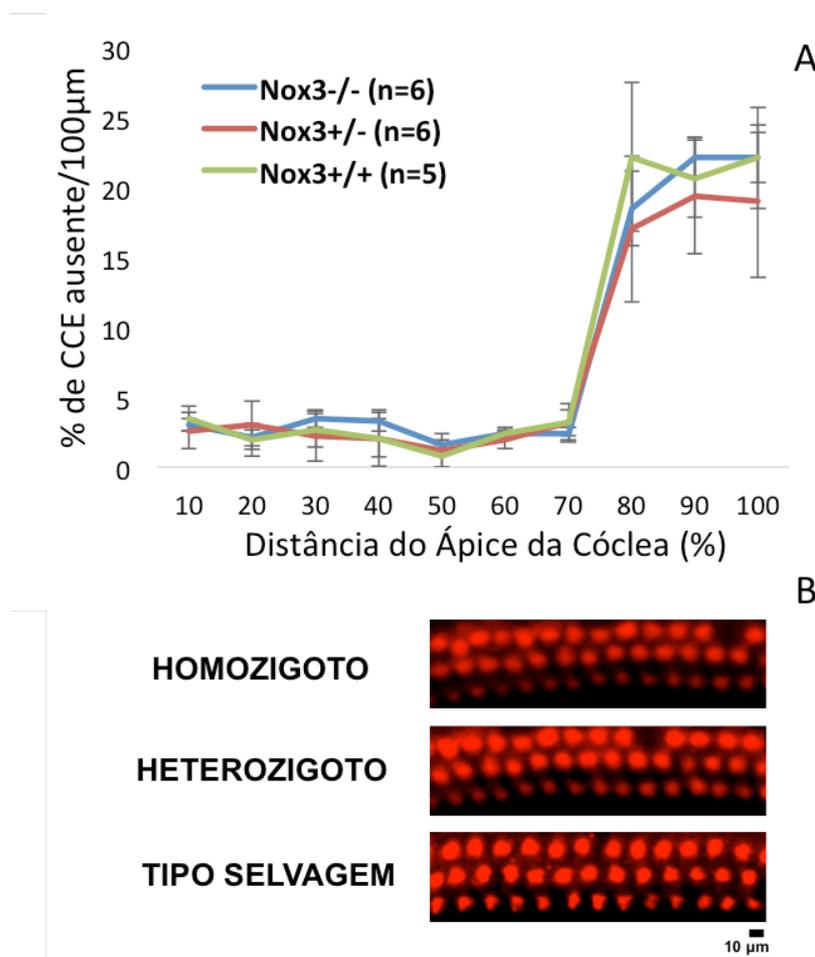


Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

A dissecção da frequência de 8 kHz através da função *input/output* da EOAPD (18A) e amplitude da onda 1 do PEATE (18B) indicaram, de forma consistente, um maior comprometimento no $Nox3^{het}/Nox3^{het}$ e $Nox3^{het}/+$ em comparação com o tipo selvagem. * = $p < 0,05$. -/- = $Nox3^{het}/Nox3^{het}$: -/+ = $Nox3^{het}/+$: +/+ = tipo selvagem (linhagem C57BL/6JEiJ).

A fim de comparar esses achados eletrofisiológicos, foram coletadas cócleas de camundongos $Nox3^{het}$ e do tipo selvagem antes e após a exposição ao ruído. Primeiramente, foi avaliada a perda de células ciliadas externas em toda extensão da cóclea. Isso foi realizado através da criação de um citococleograma (Figura 19A) do órgão de Corti inteiro marcado por técnica de imuno-histoquímica (Figura 19B) para correlacionar com os achados das EOAPDs. De forma subsequente, a densidade de vesículas sinápticas aferentes foi analisada como marcador das respostas neuronais (amplitude supraliminar da onda 1 do PEATE).

Figura 19: Citococleograma dos camundongos do tipo selvagem e $Nox3$ (19A).

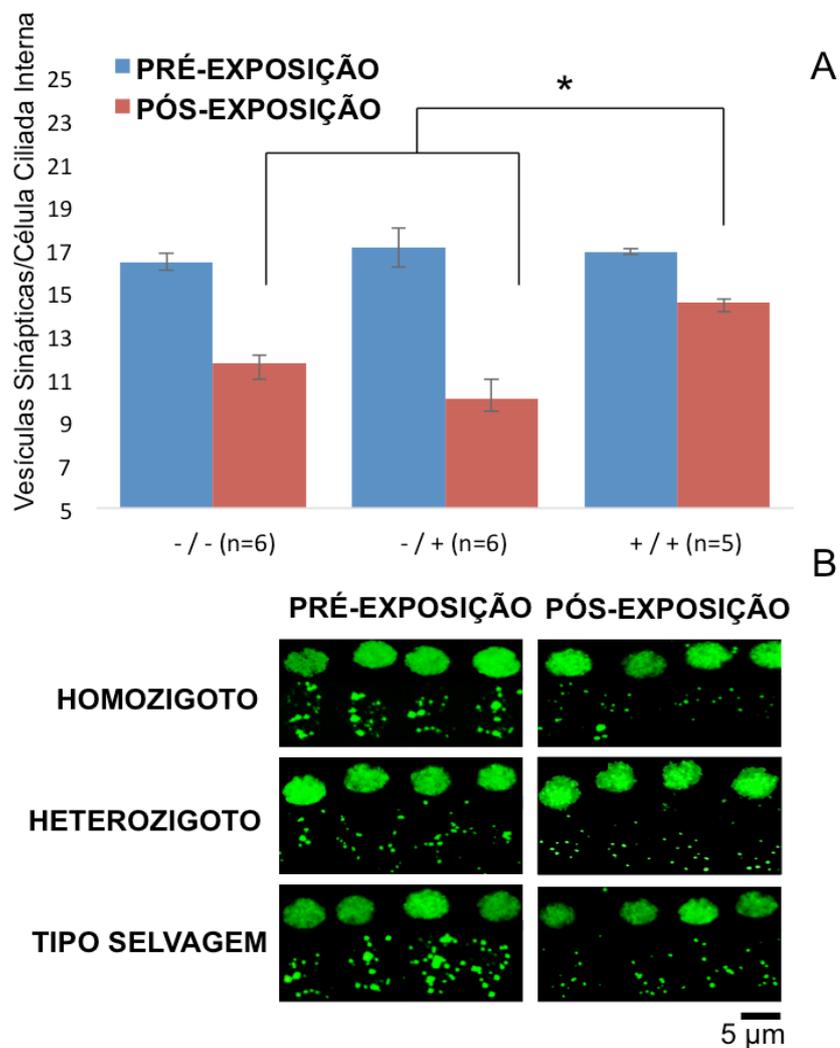


Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Não foram detectadas diferenças na contagem de células ciliadas externas entre o tipo selvagem, $Nox3^{het/+}$ e $Nox3^{het}/Nox3^{het}$. As células ciliadas externas foram preparadas por técnica de imuno-histoquímica (40x) com cócleas de camundongos expostos ao ruído (19B). A localização tonotópica correspondente à frequência de 8 kHz (vermelho = anti-miosina6 de coelho) demonstra uma pequena quantidade de células ciliadas externas mortas (2 semanas após a exposição ao ruído). -/- = $Nox3^{het}/Nox3^{het}$; -/+ = $Nox3^{het/+}$; +/+ = tipo selvagem (linhagem C57BL/6JEiJ).

Embora não houvesse diferença estatística quanto à perda de CCEs, os camundongos $Nox3^{het/+}$ e $Nox3^{het}/Nox3^{het}$ demonstraram uma redução significativa na densidade de vesículas sinápticas após a exposição ao ruído (na localização tonotópica correspondente à 8 kHz).

Figura 20: Cocleograma sináptico em 8 kHz.



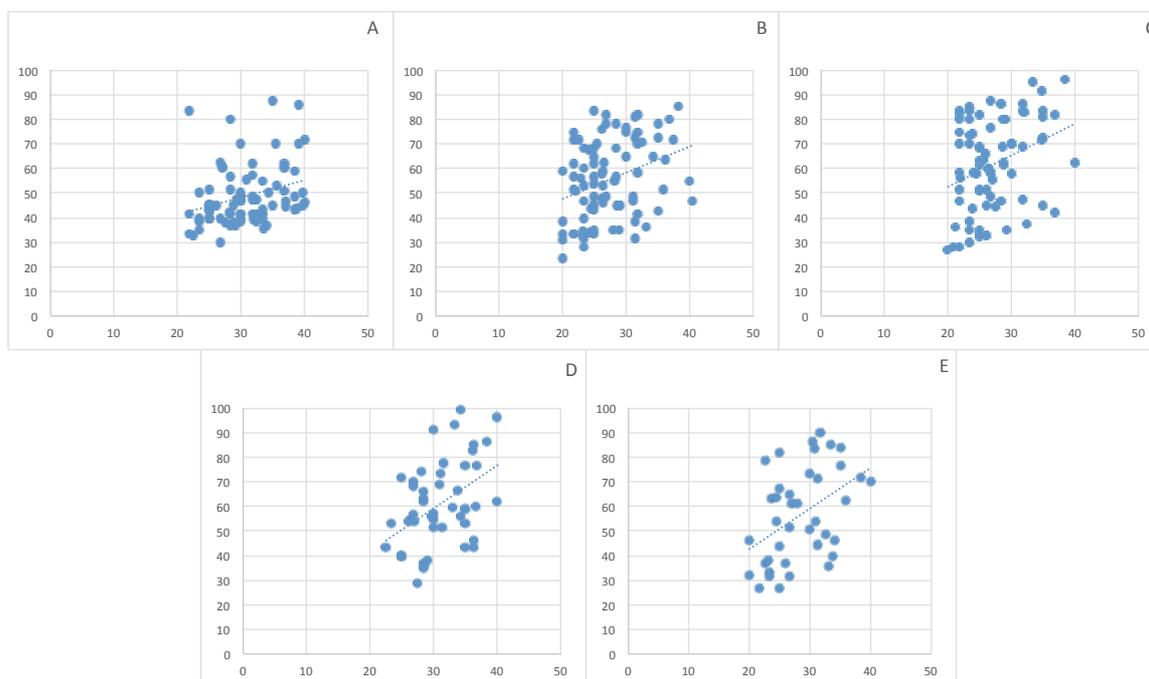
A contagem de vesículas sinápticas foi mensurada na posição tonotópica correspondente à frequência de 8kHz na cóclea. Mesmo com a ausência de diferença estatística na contagem de células ciliadas externas, o camundongo do tipo selvagem demonstrou uma significativa maior densidade de vesículas sinápticas/célula ciliada interna após a exposição ao ruído (20A). Projeções (60x, zoom 3x, imerso em óleo) de imagem confocal agrupada (20B) demonstram vesículas sinápticas de células ciliadas internas por imuno-histoquímica (verde = anti-CtBP2 de camundongo) antes e após a exposição ao ruído. -/- = *Nox3^{het}/Nox3^{het}*; -/+ = *Nox3^{het}/+*; +/+ = tipo selvagem.

4.8 Análise da interação gene-ambiente no desenvolvimento da PAIR.

Em um esforço para entender as semelhanças e diferenças dos fenótipos pré e pós-exposição, verificamos se os limiares auditivos basais estavam correlacionados com aqueles após a exposição ao ruído. Para conseguir isso, analisamos as comparações de pares entre as duas métricas para todas as combinações de frequências de linha de base e pós-exposição para as 100 linhagens do HMDP. Descobrimos que várias linhagens tinham déficits auditivos basais severos em certas frequências que tornavam os cálculos subsequentes dos limiares pós-exposição não confiáveis. Este fenômeno foi denominado "efeito teto" por (163) e é explicado pelo menor número de elementos suscetíveis a danos, de modo que se mais elementos forem danificados na linha de base, haverá menos elementos potenciais que podem ser danificados como resultado da exposição ao ruído. Para mitigar esse "efeito teto", optamos por usar um critério de inclusão de limiar de <40 dB antes da exposição ao ruído, uma vez que parecia ser um limite inferior natural da deficiência auditiva da linha de base. Como todas as linhagens apresentaram limiares de linha de base acima de 40 dB na frequência de 4 kHz, nenhum teste de correlação foi realizado entre a linha de base e o limiar de pós-exposição na frequência de 4 kHz.

As correlações entre os limiares do PEATE basais e os limiares de pós-exposição para cada uma das linhagens revelaram correlações fracas ($r < 0,5$) quando corrigidas para comparações múltiplas (Figura 21, Tabela 8) e isso contribuiu para fornecer mais evidências das interações entre o gene e o ambiente na PAIR. Essas análises sugerem que, embora haja variação nos limiares auditivos pré e pós-exposição, os fundamentos genéticos são diferentes.

Figura 21: Correlações entre o limiar do PEATE na linha de base e o limiar após a exposição ao ruído para 8, 12, 16, 24 e 32 kHz (A, B, C, D, E respectivamente), após a exclusão de linhagens com perda auditiva na linha de base



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Tabela 7: Correlação de Pearson entre os limiares do PEATE na linha de base e após exposição ao ruído das 100 linhagens do HMDP, após a exclusão das linhagens com limiares de linha de base > 40 dB.

		PEATE (pré-exposição)				
Pearson (r)		8 kHz	12 kHz	16 kHz	24 kHz	32 kHz
Mudança Permanente do Limiar (PTS)	8 kHz	-0,13	0,01	-0,09	0,00	0,05
	12 kHz	-0,16	0,02	-0,02	-0,14	-0,17
	16 kHz	0,00	0,15	0,08	-0,07	-0,06
	24 kHz	-0,02	0,06	0,23	0,21	0,11
	32 kHz	0,13	0,23	0,23	0,19	0,19

Fonte: Elaborado pelo autor

A frequência de 4 kHz foi completamente excluída, pois nenhuma linhagem apresentou limiares de linha de base abaixo de 40 dB.

Em seguida, usamos nosso banco de dados com perfis de expressão de genes cocleares das linhagens do HMDP para identificar os 50 principais genes mais correlacionados com os limiares auditivos após a exposição ao ruído. Na cóclea, o *Enpp6* apresentou o maior escore de correlação com os limiares auditivos ($r = 0,60$, $p = 9,22E-06$). *Enpp6* tem um papel específico por meio da hidrólise de

lisofosfatidilcolina poliinsaturada, glicerofosforilcolina ou esfingosilfosforilcolina nos rins, cérebro e coração, mas não tem função auditiva conhecida.

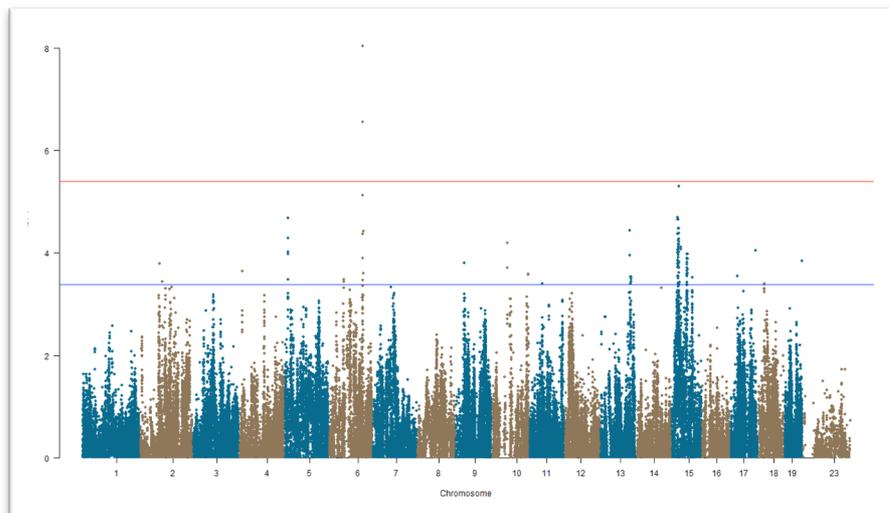
Em comparação, dois outros genes correlacionados, *Cln1* e *Elmod1*, foram implicados na audição. *Cln1* ($r = 0,51$, $p = 2,54E-04$) codifica uma proteína que pode ser importante no desenvolvimento e homeostase do ouvido interno. Além disso, mutações neste gene foram associadas à síndrome de Usher tipo IIIa (163). *Elmod1* ($r = -0,505$, $p = 3,35E-04$) regula a dinâmica da actina que determina o comprimento dos estereocílios em células ciliadas internas de mamíferos. Uma predisposição genética à perturbação da homeostase endolinfática ou da arquitetura estereociliar após a exposição ao ruído pode ser responsável por essas correlações e justifica uma investigação mais aprofundada.

Em outra abordagem, usamos a base de conhecimento DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) para determinar se os 500 principais genes expressos na cóclea estão correlacionados com os limiares auditivos após a exposição ao ruído foram enriquecidos para categorias de ontologia genética específica (GO). A ferramenta de agrupamento de anotação funcional DAVID foi usada para identificar agrupamentos de genes significativos (pontuação de enriquecimento (ES) > 3,0;) contendo termos GO altamente relacionados. O grupo superior apresentava genes envolvidos em: 1) transdução / receptor olfatório (8,3 vezes, $p = 9,5E-14$ ajustado), 2) percepção sensorial e (2,9 vezes, $p = 4,3E-7$ ajustado) 3) processos do sistema neurológico (2,3 vezes, $p = 1,2E-6$ ajustado). Curiosamente, o gene *CDH23* faz parte de um grupo de genes envolvidos na percepção sensorial. O gene *CDH23* é membro da família da caderina, cujos genes codificam glicoproteínas de adesão célula-célula dependentes de cálcio. A proteína codificada está envolvida na organização dos estereocílios e na formação do feixe de cabelo. O *CDH23* está localizado em uma região contendo os loci *DFNB12* e *USH1D* da surdez humana. Camundongos homocigotos para mutações nulas nos genes da caderina 23 são surdos e têm botões de estereocílios desorganizados. Além disso, a perda auditiva induzida por ruído em heterocigotos é duas vezes maior do que em irmãos de ninhada do tipo selvagem.

Em seguida, realizamos um estudo de associação do genoma inteiro para limiares auditivos pós-exposição para identificar loci associados com PAIR nas várias frequências testadas (Figuras 22 e 23; Tabela 9).

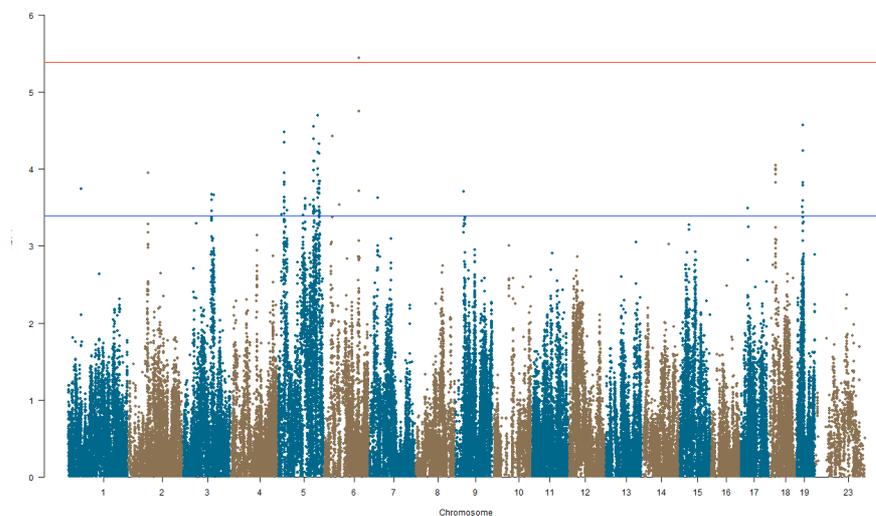
A análise foi realizada usando mais de 200.000 SNPs com uma frequência de alelo menor > 5%. Cada cromossomo é plotado no eixo x em cores alternadas de marrom e azul. SNP no cromossomo 6 excedeu o limite de significância de todo o genoma predeterminado ($p = 4,1 \times 10^{-6}$).

Figura 22: Resultados do estudo de associação para limiães após exposição ao ruído na frequência de 32 kHz. Gráfico de Manhattan Plot mostrando a associação ($-\log_{10}$) p-valores ($-\log P$) na frequência de 32 kHz em 100 linhagens de camundongos consanguíneos do HMDP.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 23: Resultados de estudo de associação do genoma inteiro para limiães após exposição ao ruído na frequência de 24 kHz. Gráfico de Manhattan Plot mostrando a associação ($-\log_{10}$) p-valores ($-\log P$) na frequência de 24 kHz em 100 linhagens de camundongos.



Fonte: Elaborado pelo autor

A análise foi realizada usando mais de 200.000 SNPs com uma frequência de alelo menor > 5%. Cada cromossomo é plotado no eixo x em cores alternadas de marrom e azul.

Tabela 8: Loci identificados no HMDP para fenótipos após exposição ao ruído.

Fenótipo ^a	Cr	SNP ^b	Posição (Mb) ^c	-logP	MAF ^d	No. de Genes ^e
PEATE 24 kHz Pós-exposição	6	rs37517079	116.6	3.66E-06	0.120	14
PEATE 32 kHz Pós-exposição	6	rs37517079	116.6	9.8E-09*	0.120	14

a ABR limiares auditivos pós-exposição ao ruído em diferentes frequências.

b SNP, o polimorfismo de nucleotídeo único mais significativo

c Localizações baseadas na montagem do genoma (NCBI's Build37)

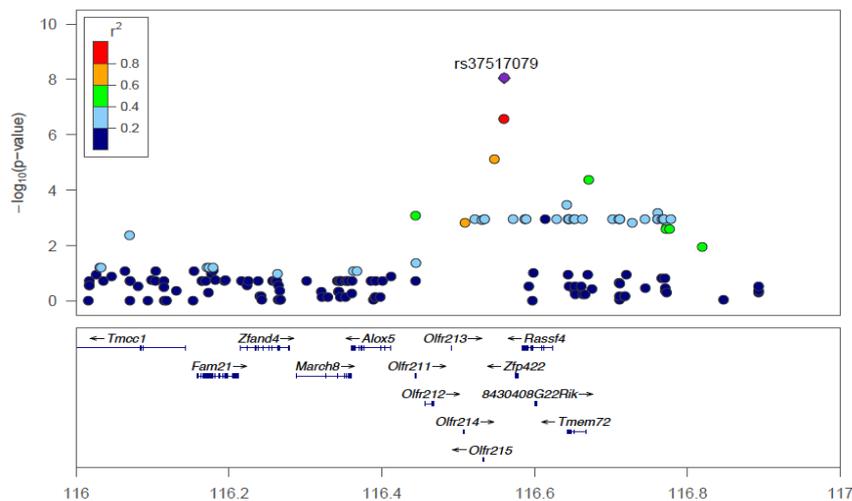
d MAF, frequência de alelo menor

e Número de genes RefSeq (NCBI's Build37 assembly) localizados no intervalo de associação do camundongo. O intervalo de confiança (95%) para a distribuição das distâncias entre os SNPs mais significativos e os verdadeiros SNPs causais, para associações simuladas que explicam 5% da variância no HMDP, é de 2,6 Mb.

* Estatisticamente significativo ($p < 4,1E-6$)

Após a exposição ao ruído, as associações foram consideradas significativas no cromossomo 6 nas frequências de 32 kHz e 24 kHz (Figura 24) com o SNP de pico idêntico (rs37517079). Esses dados, em conjunto com nossa análise corroboram o conceito de que a arquitetura genética da PAIR é específica para cada frequência (Tabela 9). Em seguida, focamos nossa atenção em genes candidatos dentro desse novo intervalo.

Figura 24: Gráfico regional da associação no cromossomo 6 nas frequências de 24 e 32 kHz centrado no SNP mais significativo (rs37517079).

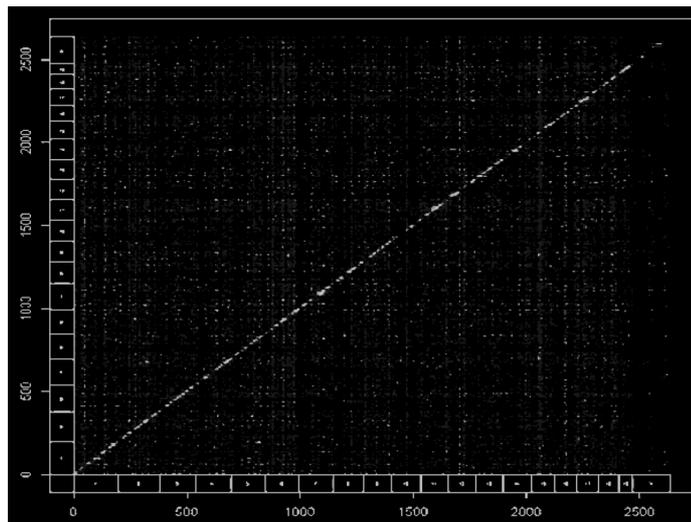


Fonte: Elaborado pelo autor

O diamante azul representa o SNP mais significativo ($p = 9,8E-09$) no fenótipo de 32 kHz e os SNPs são coloridos com base em seu DL com o SNP mais significativo, sendo: SNPs vermelhos em DL $r^2 > 0,8$, SNPs laranja DL em $r^2 > 0,6$ e SNPs verdes DL em $r^2 > 0,4$. As posições de todos os genes RefSeq são plotadas usando localizações do genoma (montagem do genoma Build37 do NCBI). O valor no eixo y representa o $-\log_{10}$ do valor P e corresponde à significância estatística.

Existem várias estratégias pelas quais os genes candidatos podem ser selecionados dentro dos intervalos, incluindo padrões de expressão conhecidos, implicação do envolvimento no fenótipo em estudo e o uso de dados de eQTL específicos de tecido. Exploramos nosso intervalo para a presença de *cis* eQTLs cocleares.

Figura 25: Gráfico de eQTL coclear. A linha diagonal representa *cis* eQTLs. Linhas verticais densas representam pontos ativos trans eQTL. eixo x = posição eSNP, eixo y = posição do probe.



Fonte: Elaborado pelo autor

O *locus* para PAIR tinha pelo menos um gene dentro do pico de associação regulado por um eQTL coclear local significativo. Dos quatorze genes candidatos no *locus*, identificamos cinco como tendo *cis* eQTL significativo na cóclea (Tabela 10).

Tabela 9: Genes dentro dos picos de associação de PAIR regulados por um eQTL local significativo na cóclea.

Gene	RefSeq	Chr	txinício (bp) ^a	txfim (bp) ^b	Local eQTL P ^c
<i>Rassf4</i>	ILMN_2956095	6	962600683	962641511	6.22E-09
<i>March8</i>	ILMN_1242531	6	962305610	962377215	6.88E-09

Gene	RefSeq	Chr	txinício (bp) ^a	txfim (bp) ^b	Local eQTL P ^c
Zfp422	ILMN_2435673	6	962591691	962596674	6.80E-07
Olf212	ILMN_1250164	6	962474191	962485640	7.47E-07
Olf215	ILMN_2673515	6	962549613	962550706	1.87E-06

Fonte: Elaborado pelo autor

a txinício, local de início da transcrição (montagem do genoma NCBI Build37).

b txfim, localização da extremidade da transcrição (montagem do genoma NCBI Build37).

c Valor de p estatisticamente significativo $\leq 5.1E-06$ (Bonferroni corrigido para o número de sondas testadas)

Rassf4 pode desempenhar um papel na supressão tumoral. *March8* induz a internalização de várias glicoproteínas de membrana. *Zfp422* pode desempenhar um papel no desenvolvimento osteogênico. *Olf212* e *Olf215* fazem parte da família de genes do receptor olfativo. Em seguida, avaliamos nossos “pontos de acesso” *trans*-eQTL. Esses “pontos de acesso” regulam os níveis de muitos transcritos e podem perturbar vias inteiras e mediar as interações gene-gene e ambiente-gene complexas (165). O genoma foi dividido em compartimentos de 2 Mb e o número de eQTL distantes significativos foi contado em cada compartimento. Os “hotspots” de eQTL foram determinados pelo enriquecimento de características de expressão gênica mapeadas para os mesmos *loci*. A partir da Figura 25, é evidente que existem loci presentes que afetam o nível de expressão dos transcritos distantes do gene que codifica o transcrito (*trans*-eQTL). Analisamos cada SNP no *hotspots trans*-eQTL no cromossomo 6 e nenhum estava na região de nosso SNP de pico. As densas bandas verticais (Figura 25) representam *hotspots trans*-eQTL que denotam loci distantes que impactam a expressão de centenas de genes. Há claramente um desses pontos de acesso no cromossomo 6 que não se sobrepõe ao nosso *locus* mapeado. Uma análise aprofundada desses *hotspots* no futuro fornecerá ferramentas adicionais para capturar as redes de genes envolvidos na audição normal e comprometida.

A base de conhecimento DAVID foi usada para determinar se os 300 principais pontos de acesso *trans*-eQTL foram enriquecidos para categorias de ontologia de gene específico (GO) (informações de apoio, Tabela S3). A ferramenta de agrupamento de anotação funcional do DAVID foi usada para identificar agrupamentos de genes significativos (pontuação de enriquecimento (ES) > 3,0;) contendo termos GO altamente relacionados. O cluster de anotação funcional superior

continha genes envolvidos na atividade mitocondrial (1,8 vezes, p ajustado = $1,30E-09$).

A fim de validar a interação gene e ambiente, comparamos os efeitos do locus pós-exposição ao ruído na frequência de 32 kHz (rs37517079) com aqueles relatados anteriormente das mesmas linhagens não expostas. Não houve sobreposição entre os loci detectados no estudo de associação do genoma antes da exposição ao ruído e os do presente estudo. Por exemplo, nosso SNP (rs37517079) foi associado à suscetibilidade ao ruído em 32 kHz, mas não associado à audição basal ou pré-exposição, conforme mostrado pelo nível de significância da associação e tamanho do efeito (Tabela 11).

Tabela 11: Tamanho do efeito na linha de base versus pós-exposição ao ruído no SNP do cromossomo 6.

SNP ^a	$-\log P^b$ Pré-Exposição	$-\log P^c$ Pré-Exposição	SNPefeito ^d (dB) Pré-exposição	SNPefeito ^e (dB) Pós-exposição
rs37517079	1.15E-04	9.8E-09*	-0,422	0,605

Fonte: Elaborado pelo autor

a SNP, o polimorfismo de nucleotídeo único mais significativo

b Valores p de associação ($-\log_{10}$) ($-\log P$) em 32 kHz na linha de base em 100 linhagens de camundongos consanguíneos

c Associação ($-\log_{10}$) valores de p ($-\log P$) em 32 kHz após a exposição ao ruído em 100 linhagens de camundongos consanguíneos

d Tamanho do efeito ambiental (dB) em 32 kHz na linha de base.

e Tamanho do efeito ambiental (dB) em 32 kHz após exposição ao ruído.

* Estatisticamente significativo ($p < 4,1E-6$)

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Fenotípica dos Limiares Auditivos Antes e Após a Exposição ao Ruído

Nosso objetivo foi expandir a literatura existente sobre fenótipos auditivos, caracterizando a audição inicial de 47 linhagens inéditas na literatura. Além disso, nenhum grupo tinha publicado dados fenotípicos em grande escala de sensibilidade ao ruído em camundongos. Assim, os dados de sensibilidade ao ruído apresentados neste estudo fornecem um novo recurso para o estudo da PAIR.

Estudamos a genética de formas comuns de perda auditiva em camundongos, incluindo perda auditiva relacionada à idade e induzida por ruído. As 100 linhagens de camundongos usadas neste estudo foram selecionadas do Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP), que é uma biblioteca de linhagens de camundongos consanguíneos projetado para uso nos estudos de associação do genoma inteiro (15). O HMDP é um recurso poderoso para dissecar a variação genética subjacente aos fenótipos comuns e é capaz de detectar a variação genética responsável por apenas 5% da variância fenotípica (90). As 30 linhagens consanguíneas comuns e 70 linhagens recombinantes que compõem o HMDP fornecem alto poder estatístico e resolução de mapeamento (166). Em particular, as linhagens consanguíneas recombinantes, que incluem AXB, BXA, BXD, BXH e CXB, são derivadas de cruzamentos de pares de linhagens consanguíneas clássicas; sua inclusão no HMDP aumenta significativamente o poder estatístico para detectar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados a características complexas (167). Dessa forma, apresentamos o painel completo de 100 linhagens com de fenótipos dos limiares auditivos no PEATE na linha de base e fenótipos de sensibilidade ao ruído, com a esperança de que esses dados facilitem futuras investigações em investigações sobre surdez.

Muitas linhagens de camundongos consanguíneos possuem características biológicas distintas que os tornam modelos úteis para doenças humanas; tais características também são um meio conveniente de estudar as relações entre a perda auditiva e outros processos de doença. Por exemplo, NZB / BinJ e NZW / LacJ, que foram identificados como resistentes ao ruído em nosso estudo, são ambos modelos

de doenças autoimunes (168) e podem fornecer uma plataforma útil para estudar o papel da autoimunidade no desenvolvimento ou resistência contra a PAIR. Camundongos C3H / HeJ são modelos de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e imunidade celular, tornando-os altamente suscetíveis às bactérias gram-negativas (169). Curiosamente, essa característica deletéria pode ser vantajosa em relação à perda auditiva, pois identificamos essa linhagem como resistente a ruído. Este achado corrobora a noção de que o estresse oxidativo desempenha um importante papel na mediação do dano às células ciliadas durante a perda auditiva (170). Tanto o BTBR quanto o I / LnJ carecem de um corpo caloso, que contém projeções nervosas dos córtex auditivo primário e secundário; essas linhagens mostram fenótipos de sensibilidade ao ruído divergentes, sendo o primeiro severamente sensível ao ruído e o último resistente ao ruído.

Além de características biológicas únicas, a diversidade genética fornecida pelo HMDP permite o estudo dos efeitos da origem genética na penetrância e expressividade alélica. Várias das linhagens do HMDP possuem o alelo *Cdh23ahl*, que leva à perda auditiva progressiva com tempo e gravidade variáveis, dependendo da base genética. As linhagens consanguíneas recombinantes em particular fornecem um modelo útil para dissecar tais efeitos devido à heterogeneidade de sua composição genética, que é derivada de vários cruzamentos de linhagens consanguíneas clássicas. A análise de diferentes linhagens recombinantes com o alelo *Cdh23ahl* compartilha progenitores comuns que pode revelar fenótipos divergentes que surgem de diferenças sutis no histórico genético. Por exemplo, os fenótipos de perda auditiva nas linhagens BXD, que são derivados dos cruzamentos C57BL / 6J e DBA / 2J, mostraram variar substancialmente antes da exposição ao ruído, a progressão e gravidade; esta variação é determinada em parte pelo número de genes AHL herdados de cada linhagem progenitora e pelos efeitos em sua origem genética (171). Assim, as linhagens e os dados fenotípicos incluídos em nosso painel fornecem uma plataforma útil para a identificação adicional de genes modificadores na perda auditiva. Além disso, como observado anteriormente por Zheng et al. (26), o histórico genético pode confundir a análise de experimentos auditivos ou testes comportamentais que dependem da audição para a produção experimental, portanto, os limiares auditivos de linha de base característica e a sensibilidade ao ruído para uma determinada exposição são considerações importantes em qualquer projeto

experimental que dependa da audição para uma interpretação precisa dos resultados. Os padrões audiológicos de perda auditiva têm uma longa história em estudos clínicos e modelos animais, e diferentes padrões foram mostrados para refletir distintos mecanismos fisiopatológicos subjacentes (172,173). Um exemplo clássico é o padrão audiológico da perda auditiva relacionada ao envelhecimento. Caracterizado por perda auditiva plana de magnitude semelhante em baixas frequências e perda progressivamente mais severa em frequências mais altas, a perda auditiva relacionada ao envelhecimento surge de uma perda gradual do potencial endococlear (PE) ao longo do tempo e da resposta diferencial das porções basal e apical da cóclea a esta perda de potencial endococlear (172,174,175). Outros exemplos clássicos incluem os perfis audiológicos de PAIR e perda auditiva induzida por toxinas, que são ambos caracterizados por um entalhe de perda auditiva bem definida em altas frequências e surgem de danos no amplificador coclear (176,177). Assim, os padrões audiológicos distintos de perda auditiva e sensibilidade ao ruído descritos neste estudo podem fornecer mais informações sobre os mecanismos subjacentes à perda auditiva.

De fato, muito progresso já foi feito em relação à complexa fisiopatologia da perda auditiva, particularmente o papel da genética. O papel da hereditariedade na perda auditiva é apoiado pela especificidade dos padrões de perda auditiva em linhagens de camundongos consanguíneos (8,41,170). Por exemplo, em seu perfil fenotípico de linhagens consanguíneas comuns, (26). observaram padrões de perda auditiva em determinadas frequências para certas linhagens, observando que os camundongos A / J têm uma perda auditiva específica na frequência de 16 kHz, enquanto os camundongos C57BR / cdJ e C57L / J são menos prejudicados nessa frequência (26). Estudos de deleção de genes direcionados delinearam ainda mais os componentes genéticos e celulares importantes para o desenvolvimento normal e a função do sistema auditivo. Li et al. demonstraram que a deleção do gene *Aquaporin4* (*AQP4*) em um camundongo de origem CD1 causa perda auditiva de ampla frequência, que eles atribuem à incapacidade das células epiteliais do órgão de Corti de se adaptarem a grandes fluxos de potássio durante a transdução de sinal mecânico-elétrico (178). Camundongos jovens com defeitos em *Barhl1*, um homólogo de camundongo para os genes *homeobox* de *Drosophila* BarH, desenvolvem uma perda auditiva de baixa frequência em 4 kHz que progride para perda de audição nas

altas frequências com a idade; a perda auditiva se correlaciona com a degeneração progressiva das células ciliadas externas que começa no ápice coclear e se espalha até a base (179). Anormalidades de desenvolvimento do ouvido interno e das vias auditivas centrais também podem ser responsáveis por padrões distintos de deficiência auditiva. *Kcnq4* (180) e *Bdnf* (181) cada um tem gradientes de desenvolvimento distintos nas células ciliadas da cóclea ao longo do eixo longitudinal do órgão de Corti. Disfunções nesses e em outros genes com papéis de desenvolvimento específicos de localização podem dar origem a padrões distintos de perda auditiva.

Como mencionado anteriormente, estudos anteriores demonstraram que a perda auditiva neurossensorial preexistente influencia nas mudanças de limiar após a exposição ao ruído (161,163), uma tendência que também observamos durante a nossa fenotipagem da sensibilidade ao ruído. Lin et al. observou que uma possível explicação para esse fenômeno é um "efeito teto". De acordo com essa explicação, há um número limitado de elementos suscetíveis a danos no ouvido interno; quanto mais elementos já tenham sido danificados por exposições anteriores ou por defeitos herdados como neste estudo, menos elementos permanecem para serem danificados por mais exposição ao ruído (163). Um substrato primordial para a perda auditiva é o amplificador coclear e seus principais componentes: as células ciliadas externas e a estria vascular. O amplificador coclear é um órgão anatomicamente e fisiologicamente complexo, crítico para a sensibilidade e especificidade em cada frequência (182), e a disfunção do amplificador coclear terá um impacto significativo nessas funções (176,183,184). No caso das linhagens consanguíneas usadas em nosso estudo, diferenças herdadas na função do amplificador coclear podem ser responsáveis por defeitos da linha de base na audição que limitarão as variações de limiar em resposta à exposição ao ruído, embora outros fatores não abordados em nosso projeto experimental possam estar envolvidos também.

Uma teoria alternativa é que pode haver um processo fisiológico ativo que, em resposta a perda auditiva neurossensorial preexistente, pode reduzir o trauma acústico subsequente. Estudos anteriores demonstraram os efeitos da "tenacidade" acústica, em que o pré-condicionamento com estímulo acústico de nível moderado pode reduzir os danos da exposição posterior ao mesmo estímulo em alta intensidade (160,163,185,186), embora os efeitos protetores de tal pré-exposição sejam

transitórios. Esses estudos estão focados no ruído como meio de pré-condicionamento, enquanto neste estudo a “fonte” de pré-condicionamento seriam as perdas auditivas preexistentes devido a diferenças genéticas, um tópico para o qual há poucos estudos até o momento.

A vulnerabilidade ao ruído muda em função da idade, de modo que humanos e animais jovens são particularmente sensíveis a insultos acústicos. Em camundongos, este período de sensibilidade (alternativamente conhecido como “período crítico” ou “janela inicial”) atinge o pico em torno de 6–8 semanas e, em seguida, diminui gradualmente para níveis permanentes em torno de 4 meses de idade (187). Nosso estudo utilizou camundongos de 5 a 8 semanas de idade para evitar confusão com perda auditiva relacionada ao envelhecimento, mas deve-se notar que grupos de idades mais jovens e mais velhos devem ser vistos como modelos mecanicamente distintos e que nossos resultados de sensibilidade ao ruído de 'janela inicial' são mais apropriadamente usados com essa consideração em mente.

Além disso, as condições de exposição ao ruído utilizadas neste estudo foram sujeitas a variação em vários parâmetros que são importantes a considerar. Por exemplo, foi demonstrado que a hipotermia (30 ° C) é protetora para a PAIR, enquanto a hipertermia (40 ° C) exacerba a PAIR (188). Para reduzir possíveis artefatos decorrentes da flutuação da temperatura corporal, os camundongos foram deixados acordados durante a exposição. Além disso, como a presença de materiais sólidos dentro da gaiola de exposição pode bloquear a transmissão de ondas sonoras, os ratos foram alojados em uma gaiola de exposição de tela de arame em forma de torta com quatro compartimentos usando um design circular para garantir níveis de pressão sonora equivalentes entre os camundongos. Os camundongos foram separados para minimizar o agrupamento que pode reduzir a transmissão do som. Selecionamos o Fostex FT17H Tweeter Speaker devido à baixa variação (± 3 dB) em sua curva de resposta em frequência, mas ainda existe variações inevitáveis inerentes ao equipamento que merecem destaque.

O conceito mais importante é que existe variação fenotípica nos limiares auditivos entre as linhagens do HMDP antes e após a exposição ao ruído. Esse conhecimento é fundamental para ser aplicado em nos estudos de associação do genoma inteiro, como o que estamos apresentando nessa tese de livre-docência.

5.2 Caracterização Fenotípica da Amplitude P1-N1 Antes e Após a Exposição ao Ruído

A amplitude da onda I parece ser uma maneira acessível de avaliar a sinaptopatia, pois representa a atividade combinada das fibras nervosas cocleares medidas em resposta a estímulos supraliminares. As contagens sinápticas correlacionadas com a linha de base e a amplitude da onda I após a exposição ao ruído apoiam a hipótese de que o número de células ciliadas internas e das sinapses funcionais variam em conjunto com os valores de amplitude da onda I correspondentes, e que a amplitude da onda I do PEATE pode ser usada como uma métrica confiável para analisar indiretamente a função sináptica e sinaptopatia em grandes populações.¹³Essa avaliação expande a literatura existente sobre o fenótipo auditivo de camundongos, fornecendo novas fontes para o estudo sobre perda auditiva. Todos os camundongos estudados eram fêmeas, 5 semanas de idade, e submetido ao mesmo protocolo de exposição ao ruído. Conseqüentemente, as diferenças na amplitude da onda I observadas corroboram a hipótese de que os fenótipos da perda auditiva em camundongos têm uma base genética, devido às distintas suscetibilidades à sinaptopatia coclear.

Construímos um conjunto de dados completo com os valores da linha de base da amplitude da onda I em 151 camundongos de 69 linhagens consanguíneas diferentes, e disponibilizamos este conjunto de dados para uso geral. Especificamente, esses dados constituem um novo recurso para o estudo da sinaptopatia coclear.

Conforme descrito anteriormente, camundongos com perda auditiva prévia são menos suscetíveis à perda auditiva pela exposição ao ruído. Da mesma forma como comentado em relação aos limiares auditivos, uma possível explicação para esse achado é o “efeito teto”, ou seja, existe um número limitado de elementos no ouvido interno que ainda podem ser danificados.¹⁴ A forte correlação entre a amplitude da linha de base e a variação após a exposição ao ruído pode ser atribuído a um efeito de teto: quanto menor a amplitude da linha de base, menor o número de sinapses funcionais - isso limita o número de locais disponíveis para que ocorram danos por ruído, resultando em um “delta” menor.

Zumbido e hiperacusia são alterações perceptivas frequentemente precedidas pela exposição ao ruído.¹⁵ Podem ser o resultado de plasticidade compensatória, ou

seja, um ganho na sinapse auditiva central ocorre em consequência de uma atenuação do sinal da sinapse auditiva periférica.⁵ Embora o envelhecimento e a exposição ao ruído contribuam para uma deficiência auditiva supraliminar, a variabilidade de fatores genéticos e epigenéticos podem também contribuir para o desfecho.¹⁶ O desenvolvimento de novos testes de diagnóstico (ou validação dos já existentes) para confirmar a perda auditiva “oculta” seria de grande utilidade, fornecendo um diagnóstico para o grande número de pacientes com zumbido ou comprometimento da discriminação auditiva que, no entanto, apresentam limiares auditivos normais no audiograma.

BALB / cJ é uma linhagem de camundongo frequentemente usada em modelos de pesquisa auditiva envolvendo PAIR, presbiacusia e exposição a drogas ototóxicas. Em nosso experimento, os camundongos BALB / cJ tiveram um dos resultados mais consistentes em relação à variação após a exposição ao ruído na amplitude da onda I. Esta linhagem apresentou o terceiro maior delta após a exposição ao ruído nas frequências de 12, 16, 24 e 32 kHz. Seguindo a hipótese que esse achado esteja associado com a sensibilidade coclear, BALB / cJ teve a maior variação de limiar em comparação com as outras linhagens testadas após administração de cisplatina¹⁷, exposição a ruído¹⁸ e administração de canamicina¹⁹. Este padrão de variação nessa linhagem pode sugerir um mecanismo compartilhado de danos entre a exposição ao ruído e agentes ototóxicos.

A amplitude da onda I não está bem estabelecida como métrica auditiva em seres humanos. Mais estudos são necessários para obter um protocolo de teste válido capaz de diagnosticar a sinaptopatia coclear para avaliar a audição de indivíduos expostos ao ruído. O desenvolvimento de uma modalidade de diagnóstico capaz de detectar precocemente os danos causados pelo ruído à orelha interna possibilitaria a criação de protocolos para prevenir potenciais danos à audição e atuar com antecedência na proteção auditiva. Isso seria de suma importância, uma vez que o método diagnóstico padrão-ouro disponível (o audiograma) começa a mostrar mudanças apenas quando uma lesão generalizada e irreversível na via auditiva já se estabeleceu.

5.3 A arquitetura genética da linha de base de acordo com as frequências ao longo do eixo tonotópico da cóclea

Usamos uma abordagem de associação do genoma inteiro com correção para estrutura populacional para mapear vários loci para características auditivas em linhagens consanguíneas de camundongos. Nossos resultados identificam uma série de novos loci e demonstram duas contribuições importantes à literatura. Primeiro, com exceção do locus *Otog1*, que foi identificado em humanos, nenhum dos loci identificados nessa análise com o HMDP se sobrepõe aos loci Mendelianos identificados para perda auditiva em camundongos. Esta observação corrobora o conceito de que a variação na audição entre linhagens de camundongos consanguíneos tem uma arquitetura genética complexa. Em segundo lugar, assim como a cóclea tem um mapa de posição funcional específico para a frequência, demonstramos que a genética da sensibilidade auditiva também é específica para cada frequência.

Publicamos recentemente a primeira meta-análise para perda auditiva relacionada à idade em camundongos usando vários conjuntos de dados, incluindo um subconjunto das linhagens do HMDP (23). A meta-análise identificou cinco loci significativamente associados, incluindo *Fscn2*, o gene responsável pelo locus *Ahl8* identificado em um cruzamento entre as linhagens DBA / 2J e C57BL / 6J. No entanto, não houve sobreposição entre os loci detectados na metanálise e os do presente estudo. Por exemplo, a meta-análise continha apenas 35 das 99 linhagens do HMDP e foi predominantemente alimentada pela inclusão de camundongos N2 de um retrocruzamento DBA / 2J com C57BL / 6J gerado por (189). Por outro lado, o presente estudo procurou identificar os determinantes genéticos dos limiares auditivos e, portanto, seria mais provável de detectar a variação alélica que está presente em todas as 99 linhagens. Por fim, nosso estudo atual avaliou a audição nas frequências de 4 e 24 kHz, além das demais frequências (8, 16 e 32 kHz) que utilizamos em nosso estudo anterior.

Existe variação genética de determinadas frequências nos limiares auditivos em linhagens consanguíneas de camundongos. Uma das descobertas mais importantes de nossa análise é a aparente existência de uma grande variação genética nos limiares auditivos em cada frequência em linhagens de camundongos consanguíneos. Ruben demonstrou por meio de um estudo da cóclea de camundongo

que as mitoses terminais no epitélio coclear em desenvolvimento foram detectadas pela primeira vez no ápice coclear (190). A partir deste estudo concluiu-se que a diferenciação do órgão coclear de Corti ocorreu da base ao ápice. A cóclea dos mamíferos tem inúmeras especializações ao longo de seu comprimento que contribuem para a representação tonotópica do som percebido com a porção basal respondendo a frequências mais altas do que o ápice (191,192). Críticas para o ajuste de frequência da cóclea são as propriedades morfológicas e mecano-transdutivas das células ciliadas, a membrana basilar e os neurônios do gânglio espiral ao longo do comprimento da espiral coclear. As bases moleculares para essas especificações tonotópicas ao longo do eixo longitudinal da cóclea permanecem amplamente desconhecidas.

As observações iniciais feitas por (26) que diferentes linhagens exibem diferentes sensibilidades de limiar auditivo para determinadas frequências de estímulo foram consistentes e serviram como uma informação preliminar sobre a existência de variação genética de sensibilidades ao longo do eixo coclear. (193), usando a tecnologia de *microarray*, também demonstrou gradientes de expressão gênica na cóclea de camundongo adulto e em desenvolvimento, um subconjunto dos quais (aproximadamente 5% dos genes testados) exibiu claras variações espaciais e temporais na expressão ao longo do eixo da cóclea. Utilizando uma abordagem baseada em associação, nos baseamos nesses estudos anteriores para elucidar a arquitetura genética das sensibilidades auditivas ao longo do eixo coclear em linhagens consanguíneas de camundongos. Por exemplo, a descoberta de pelo menos um *locus* significativo do genoma específico para cada frequência em nossa análise corrobora esse conhecimento. Isso foi verdadeiro para cada frequência testada, exceto na frequência de 24 kHz. O suporte adicional para os determinantes genéticos específicos em cada frequência, ou específicos da região coclear, vem da identificação de um locus no espectro coclear apical de baixa frequência no cromossomo 19 (4 kHz e 8 kHz) e de uma região no cromossomo 13 para o espectro coclear basal de maior frequência (24 kHz e 32 kHz). Embora uma parte dessa associação genética específica de frequência possa ser explicada por questões relacionadas ao poder do estudo, também detectamos um *locus* significativo no cromossomo 3 na frequência de 12 kHz que demonstrou uma associação sugestiva em quase todas as demais frequências.

Até o momento, aproximadamente 18 *loci* para perda auditiva relacionada ao envelhecimento e perda auditiva induzida por ruído foram descritos em camundongos usando estratégias tradicionais de mapeamento de QTL (<http://hearingimpairment.jax.org/table2.html>). No entanto, nenhum dos *loci* que identificamos se sobrepõe a essas regiões previamente identificadas. Pode haver várias razões para esta observação. Primeiro, testamos camundongos com apenas 5 semanas de idade, e muitas linhagens usadas nos estudos de mapeamento da prebiacusia relatados anteriormente não desenvolvem perda auditiva até uma idade mais avançada; portanto, não detectaríamos perda auditiva nessas linhagens em 5 semanas. Em segundo lugar, estudos anteriores de QTL foram realizados usando cruzamentos F2 de duas linhagens de camundongos, resultando em aproximadamente 50% da frequência de cada alelo na população de camundongos. Com o HMDP, no entanto, efeito do alelo pode não ser frequente o suficiente entre as linhagens usadas para fornecer poder estatístico suficiente com o algoritmo de mapeamento de modelo linear misto. Apesar da sobreposição limitada entre QTL auditivo de camundongo relatado anteriormente e os picos de associação neste estudo, nossos resultados ainda podem ter relevância clínica e sugerem uma conexão com fenótipos auditivos em humanos. Por exemplo, análises genéticas estratificadas no *locus* do cromossomo 10 implicaram *Otogl* como um forte candidato para a frequência de 16 kHz. Curiosamente, mutações do gene humano, *OTOGL*, foram identificadas como a causa das formas Mendelianas de perda auditiva de alta frequência moderada não síndrômica em humanos (164,194).

Essa análise de associação para fenótipos auditivos em camundongos revelou nove *loci* candidatos estatisticamente significativos; destes, a análise sugeriu priorizar pelo menos quatro genes candidatos posicionais para validação funcional. Conforme descrito acima, *Otogl* é um forte candidato para *locus* na frequência de 16 kHz e, com base em análises de eQTL coclear, *Prpf19*, *Ms4a6d* e *Fbp1* representam fortes candidatos dentro de seus respectivos intervalos. *Prpf19* é um fator de processamento de pré-mRNA que tem sido implicado no reparo do DNA de mamíferos (Mahajan e Mitchell 2003), mas não tem função conhecida no sistema auditivo. Consistente com os resultados de eQTL, os dados de RNAseq demonstram um nível de expressão duas vezes maior nas células ciliadas cocleares em comparação com as células não sensoriais e nossos dados *in situ* indicam a expressão no epitélio sensorial e no

gânglio espiral. Os dados confirmam de forma semelhante a expressão duas vezes maior de *Prpf19* nos neurônios do gânglio espiral de camundongos em comparação com o gânglio vestibular, começando em E16 e estendendo-se até a idade adulta (<http://goodrichlabmicroarrays.hms.harvard.edu>).

Ms4a6d é um membro de uma família multigênica de quatro transmembranas relacionadas ao CD20, uma proteína específica para células hematopoiéticas e uma cadeia beta de receptor de IgE de alta afinidade (195) sem função conhecida no sistema auditivo de mamíferos. *Ms4a6d* demonstra níveis quase quatro vezes maiores de expressão em células não sensoriais do ouvido interno e níveis de expressão semelhantes nos gânglios espirais e vestibulares que atingem o pico mais de 2 semanas pós-natal, próximo ao início da audição em camundongos.

Recentemente, foi demonstrado que a *Fbp1* localiza-se no núcleo da célula de maneira dependente do ciclo celular e pode estar envolvida no processamento do RNA, montagem do nucleossomo e regulação do ciclo celular. Como os outros genes posicionais descritos acima, ele não tem papel conhecido na audição em mamíferos (196). Os dados de RNAseq também revelaram uma expressão duas vezes maior desse gene em células não sensoriais do ouvido interno e níveis variáveis de expressão nos gânglios espirais e vestibulares de camundongos durante os períodos pré-natal e pós-natal. Além disso, nossos dados *in situ* colocam o mRNA de *Fbp1* na estriavascular, o que é crítico para a manutenção do potencial endococlear. Embora uma função específica não tenha sido atribuída à camada de células basais, existem junções GAP generalizadas entre as células basais e as células basais e células intermediárias. Isso sugere que essas células formam um sincício funcional semelhante ao observado no miocárdio, apoiando a noção de que esse gene pode desempenhar um papel na audição em camundongos. Portanto, esses resultados demonstram que *Prpf19*, *Ms4a6d* e *Fbp1* são expressos em vários tipos de células cocleares e que os *loci* que abrigam esses genes contêm variação genética funcional em relação à sua expressão. Estudos funcionais adicionais serão necessários para determinar se esses genes desempenham um papel na audição dos mamíferos.

5.4 Associação Genômica define os genes candidatos para susceptibilidade à perda auditiva induzida pelo ruído

Os estudos de associação do genoma inteiro com camundongos têm revolucionado o campo da genética e têm gerado a descoberta de centenas de genes envolvidos em fenótipos complexos (14). O sucesso desse mapeamento ocorreu em função da observação inicial de que existia uma evidente variação fenotípica entre as linhagens nos limiares auditivos pós-exposição ao ruído, reiterando a contribuição de fatores genéticos na susceptibilidade à PAIR. Essa ampla distribuição de fenótipos e genótipos facilitou o mapeamento genético com alta resolução.

Os resultados identificaram diversos *loci* envolvidos na susceptibilidade à PAIR. Além disso, essa análise demonstrou uma susceptibilidade genética ao ruído, a qual é frequência-específica na cóclea. Nessa análise foi utilizado um conjunto combinado de 64 linhagens de camundongos consanguíneos clássicos e recombinantes. Isso é uma parcela do HMDP e uma extensão do estudo de associação que utilizava somente linhagens consanguíneas clássicas. A inclusão de um conjunto de linhagens consanguíneas recombinantes aumentou o poder estatístico do estudo de associação (166). Dessa forma, o HMDP gerou poder estatístico significativo e resolução para identificar *locus* de susceptibilidade à PAIR, o qual foi precisamente reiterado em um camundongo mutante (167).

Considerando que esse painel é composto por 100 linhagens de camundongos consanguíneos comercialmente disponíveis, com aproximadamente dois terços desse painel, essa análise conseguiu mapear cinco *loci*, refletindo o poder para detectar *loci* com efeito moderado. Além do poder presente nesse recurso, a resolução desse painel é, em alguns casos, duas ordens de magnitude maior do que é alcançado com a análise de ligação (*linkage*). Isso foi também demonstrado em um estudo de associação do genoma inteiro para perda auditiva relacionada à idade com camundongos (23).

De forma sem precedentes, esse novo paradigma foi aplicado ao primeiro mapeamento de alta resolução de genes candidatos para susceptibilidade à PAIR. Este estudo gerou associações significativas em pelo menos cinco *loci* em três diferentes frequências de estímulo pós-exposição ao ruído, correspondendo a um total de 27 genes candidatos. Todos esses genes necessitam de uma adequada caracterização, mas o primeiro gene escolhido para ser validado através de um

modelo genético com camundongo mutante foi *Nox3*. O *Nox3* foi selecionado para essa investigação adicional, pois apresenta uma expressão alta e específica no epitélio cócleo-vestibular e nos neurônios do gânglio espiral (197).

5.5 Associação Genômica com o Fenótipo da Amplitude P1-N1 do PEATE antes e após a exposição ao ruído

Nessa associação utilizamos a amplitude da onda I do PEATE em amplitude supraliminar. Essa análise apresenta algumas limitações. Primeiro, medimos as amplitudes da onda 1 em uma única intensidade de estímulo (80 dB NPS) e as comparamos com limiares auditivos variáveis antes e após a exposição ao ruído. Um único nível de estímulo pode não ativar os mesmos elementos, potencialmente confundindo a análise fenotípica. Assim, danos às células ciliadas internas ou neurônios na extremidade basal da cóclea podem impactar o tamanho aparente da onda I, independentemente da frequência do estímulo. Embora seja possível que as diferenças na onda I não reflitam diferenças genéticas verdadeiras na função sináptica nas localizações cocleares que utilizamos, a plausibilidade dos genes candidatos que identificamos corrobora nossa abordagem. Esses dados auxiliarão os pesquisadores no estudo de genes e vias envolvidas na inervação coclear antes e após a exposição ao ruído.

A recente expansão da profundidade da genotipagem e do número de linhagens do HMDP levou a um aumento no número de associações significativas detectadas (25). Existem recursos adicionais para o estudo de características complexas em camundongos, como o Cruzamento Colaborativo (CC), populações de roedores consanguíneos (OS) que têm a vantagem adicional da variação de linhagens selvagens e o potencial para identificação de loci adicionais (198). O HMDP tem a vantagem de homozigosidade genômica e reprodutibilidade completa de medições fenotípicas e adições recentes ao HMDP, incluindo a adição de ~ 75 linhagens adicionais e genotipagem de SNPs com densidade mais alta, aumentaram substancialmente o poder e a cobertura genômica (25).

Nossos dados mostraram uma ampla variação de amplitudes da onda 1 com um padrão discernível detectado antes e depois da exposição ao ruído nas linhagens do HMDP e uma correlação inversa pequena significativa entre os valores das amplitudes da onda I do PEATE e seus respectivos limiares do PEATE. Usando o

PEATE, nós e outros identificamos anteriormente vários padrões distintos de comprometimento auditivo na linha de base (26).

A análise das contagens sinápticas das 4 linhagens extremas representando a menor e a maior da onda I antes e depois da exposição ao ruído apoiou a hipótese de que o número de sinapses nas células ciliadas internas tradicionais varia em conjunto com os valores de amplitude da onda I correspondentes. Dessa forma, a amplitude P1-N1 pode ser usada como uma métrica confiável para analisar indiretamente a função sináptica e sinaptopatia em grandes populações. (34) mostraram que a perda de sinapses das células ciliadas internas se correlaciona com diminuição da amplitude da onda I.

Recentemente, *Clrn1ex4fl / fl Myo15-Cre +/-* um modelo de camundongo sem uma variante de *Clarin1* demonstrou ter diminuído a amplitude da onda I e uma distribuição desorganizada de $CaV1.3 Ca^{2+}$ canais (199). Otof C2C / C2C é outro modelo sem um C2C funcional do *otoferlin* no sítio de ligação de cálcio que mostrou amplitude de onda I reduzida do PEATE e a reposição interrompida de vesículas em comparação com seus controles de tipo selvagem (200). Esses dois modelos apresentaram números de sinapses semelhantes ao seu controle, apesar da aparente sinaptopatia.

Geramos associações significativas em duas regiões antes da exposição ao ruído e em outras duas regiões separadas após a exposição a ruído, gerando um total de 50 genes candidatos identificados. Usando nossos dados de expressão coclear e análise eQTL, fomos capazes de reduzir substancialmente os genes candidatos. Nossos resultados demonstram que a arquitetura genética da sinaptopatia coclear induzida por ruído é distinta daquela da integridade do nervo auditivo / sinapse basal.

Um *locus* na linha de base e dois loci após a exposição ao ruído tinham pelo menos dois genes dentro do pico de associação regulado por um eQTL coclear local significativo (Tabela 2). O outro *locus* reside em uma região contendo apenas dois genes, *Robo1* e *Robo2*. Todos os 17 genes candidatos com *cis*-eQTLs são expressos nas células do epitélio coclear e gânglio espiral (<https://umgear.org/>).

Slc1a2 é um forte candidato para o *locus* de 32 kHz (após exposição ao ruído) com base em nossos dados cocleares de eQTL. *Slc1a2* codifica um membro de uma família de proteínas transportadoras (201). Esta proteína ligada à membrana é o

transportador-chave que limpa o neurotransmissor excitatório glutamato do espaço extracelular nas sinapses do sistema nervoso. A depuração de glutamato é necessária para a ativação sináptica e para prevenir o dano neuronal causado pela ativação excessiva dos receptores de glutamato. A sinapse é composta por uma banda pré-sináptica envolvida por um halo de vesículas contendo neurotransmissores dentro das células ciliadas internas (202) e uma zona pós-sináptica ativa no terminal do nervo coclear com receptores de glutamato (tipo AMPA) para os receptores liberados pelo neurotransmissor (203). Acredita-se que a regulação anormal desse gene esteja relacionada a vários distúrbios neurológicos (204). (205) mostrou que a aplicação local de agonistas do receptor de glutamato (GluR) pode produzir um edema dose-dependente nos terminais nervosos cocleares em contato com células ciliadas internas. A inflamação dendrítica é observada sob as células ciliadas internas, mas não nas células ciliadas externas, sendo isso impedido através de perfusão intracoclear prévia de antagonistas de glutamato (206). Com base em conjecturas (49), essa excitotoxicidade seria um insulto inicial primário na cascata inflamatória observada após o ruído. Assim, *Slc1a2* poderia desempenhar um papel importante na suscetibilidade à sinaptopatia coclear induzida por ruído, regulando a depuração do glutamato após a exposição.

Neuroglin1, um gene candidato no *locus* de 24 kHz (após exposição ao ruído), é uma molécula de adesão celular sináptica que conecta os neurônios pré e pós-sinápticos. *Neuroglin1* é responsável pela sinalização através da sinapse, que regula a atividade sináptica e determina as propriedades das redes neuronais (207).

Wang et al. (208), demonstraram anteriormente que *Robo1* e *Robo2* foram ativamente expressos por neurônios do gânglio espiral. Além disso, em mutantes duplos *Robo1 / 2* em E18, os neurônios do gânglio espiral foram deslocados no espaço dorsal ao epitélio coclear e não inervaram as células ciliadas. Assim, a sinalização pelo *Robo* medeia o posicionamento espacial dos neurônios do gânglio espiral durante o desenvolvimento da cóclea. Curiosamente, não houve alterações significativas da estrutura coclear geral nos mutantes duplos *Robo1 / 2* em comparação com seus irmãos heterozigotos (as células ciliadas não foram afetadas) (208). Assim, nossos dados de associação na linha de base no cromossomo 16 com o SNP de pico no *Robo1* valida nossa abordagem.

5.6 Associação Genética com Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção com Amplitude Supraliminar antes e após a exposição ao ruído

Essa análise avaliou a variação auditiva pré e pós-exposição ao ruído em camundongos utilizando a amplitude supraliminar das emissões otoacústicas por produto de distorção. Essa análise gerou associações significativas em 1 *locus* na linha de base e em 5 *loci* independentes após a exposição ao ruído, resultando em 144 genes candidatos, dos quais 35 nestes 6 loci foram identificados como tendo um cis-eQTL significativo na cóclea. Após análise cuidadosa dos genes candidatos com base na expressão do gene e após uma revisão da literatura, 2 genes candidatos principais foram priorizados: *Eya1* (linha de base) e *Efr3a* (pós-exposição).

O gene *Eya1*, que estava presente em um pico de associação significativo antes da exposição ao ruído na intensidade de 32 kHz a 70 dB, é uma proteína codificadora de genes que atua em outros genes, sendo considerado um fator de transcrição. É interessante notar que as funções até agora identificadas de *Eya1* se correlacionam com certas formas de perda auditiva genética em humanos e desenvolvimento coclear normal (204). A proteína *Eya1* interage com várias outras proteínas ativando e inativando genes que são importantes para o desenvolvimento normal. Os papéis principais incluem o desenvolvimento do segundo arco branquial, que dá origem aos tecidos do pescoço, olhos, orelhas e rins.

O gene *Eya1* ganhou destaque com a descoberta de sua expressão em células-tronco cocleares de mamíferos. Uma população de células progenitoras foi identificada em camundongos que expressam *Eya1* são capazes de se diferenciar em células ciliadas, células de suporte e células ganglionares após ablação de células ciliadas até 1 semana de vida. A identificação da regeneração coclear após o nascimento em mamíferos e a caracterização desta população de células (*Eya1*-positiva) proporcionou uma nova fonte celular com potencial para reparo e regeneração coclear (204).

Além disso, as mutações do gene *Eya1* são a causa mais comum da síndrome branquio-oto-renal. Mais de 80 mutações patogênicas foram identificadas em *Eya1* em diferentes populações. A síndrome branquio-oto-renal é um distúrbio autossômico dominante raro caracterizado por perda auditiva neurossensorial, mista ou condutiva, fístulas ou cistos branquiais, fossetas pré-auriculares, malformações de ouvido e anomalias renais.

Outra correlação importante foi a confirmação de que a inativação de *Eya1* e *Six1* em camundongos resulta em uma alteração significativa no desenvolvimento da orelha devido a uma interrupção precoce do desenvolvimento no estágio de otocisto (26). Outra evidência robusta foi a descoberta do envolvimento de *Eya1 / Six1* no desenvolvimento de células ciliadas e sua coexpressão em explantes cocleares de camundongos. A expressão desses genes foi suficiente para induzir o destino das células ciliadas no epitélio não sensorial que expressa *Sox2*, ativando não apenas vias dependentes de *Atoh1*, mas também independentes de *Atoh1*, e ambas as vias induzem *Pou4f3* a promover a diferenciação de células ciliadas.

Efr3a é o nosso principal gene candidato, que foi encontrado na frequência de 11,3 kHz a 70 dB após a exposição ao ruído. Ele codifica uma proteína da membrana plasmática cuja insuficiência foi inicialmente implicada no aumento da sobrevivência dos neurônios do hipocampo em camundongos adultos. Este é o primeiro gene com correlação descrita na PAIR, mas que tem sido investigado na perda auditiva relacionada à idade e na ototoxicidade. Esses achados estão de acordo com estudos anteriores que investigaram a expressão de *Efr3a* na via neural auditiva, que é regulada positivamente logo após a destruição das células ciliadas. O impacto da insuficiência de *Efr3a* também foi avaliado pela comparação funcional e morfológica da cóclea entre camundongos deficientes em *Efr3a* e seus companheiros de ninhada de tipo selvagem. O presente estudo sugere que a deficiência de *Efr3a* está associada às perdas auditivas menos severas após exposição ototóxica e maior dano morfológico aos neurônios do gânglio espiral coclear. Esses efeitos benéficos da deficiência de *Efr3a* podem ser atribuídos ao aumento da expressão de alguns fatores neurotróficos e seus receptores, suprimindo assim a neurodegeneração.

Nosso achado também é consistente com outro achado recente de pesquisas sobre perda auditiva relacionada à idade, de que a deficiência de *Efr3a* resulta em melhor função auditiva em camundongos senescentes (aos 10 e 12 meses de idade). Foi demonstrado que camundongos senescentes deficientes em *Efr3a* tiveram degeneração menos severa dos neurônios do gânglio espiral coclear na curva basal; quando a degeneração ocorreu, ocorreu mais tarde.

Além disso, a lesão ototóxica em camundongos mostrou induzir rapidamente a perda de células ciliadas, resultando em degeneração progressiva do gânglio espiral 5 dias após a administração da droga. O número de células do gânglio espiral

começou a diminuir no dia 15. A expressão de *Efr3a* aumentou notavelmente no gânglio espiral no dia 5, diminuindo para níveis próximos ao normal no dia 10. Isso sugere que a mudança na expressão de *Efr3a* no gânglio espiral coincide com o tempo de degeneração do gânglio espiral, o que implica que esta alta expressão de *Efr3a* pode ser importante para o início da degeneração do gânglio espiral após a perda de células ciliadas.

5.7 Validação do gene *Nox3* com responsável pelo desenvolvimento da perda auditiva induzida pelo ruído

O gene *Nox3* foi descrito em 2000, baseado na similaridade da sua sequência com outras isoformas da família *NOX* (codifica uma NADPH oxidase) (78). A estrutura global do *Nox3* é altamente semelhante à estrutura de *Nox1* e *Nox2* (79), e o *Nox3* compartilha 56% dos aminoácidos de *Nox2* (80). Codificadas pelo *Nox3*, as seis proteínas transmembrana de ligação à NADPH interagem com duas proteínas transmembrana (codificado pela *Cyba*) e uma proteína citosólica (codificada por *NOXO1*). Essa ativação libera o complexo funcional NADPH oxidase que é capaz de transportar elétrons através de membranas. Isso leva à geração de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a partir de oxigênio (O_2) e, subsequentemente, espécies reativas de oxigênio (71).

Os primeiros estudos sobre a função de *Nox3* foram publicados em 2004 e geraram a definição de *Nox3* como a NADPH oxidase da orelha interna (50,73). Banfi et al. realizaram análises da distribuição do *Nox3* (por PCR em tempo real e hibridização *in situ*) e identificaram uma alta expressão de *Nox3* na orelha interna (epitélio sensorial coclear/vestibular e gânglio espiral). Seguida da exposição à cisplatina, células HEK293 transferidas com *Nox3* produziram $O_2^{\bullet-}$ espontaneamente e geraram um aumento significativo na produção de $O_2^{\bullet-}$ (50). Paffenholz et al. (209) demonstraram que mutações do *locus het* afetam o *Nox3* e, esse camundongo mutante de cabeça inclinada (*het*), apresentava formação deficiente de otocônia no sáculo e utrículo. Isso resultava em defeitos de equilíbrio, como incapacidade em detectar a aceleração linear ou gravidade. Com base nesses achados, optou-se por prosseguir a investigação do gene *Nox3* como o principal candidato no *locus* do cromossomo 17.

Estudos subsequentes têm estabelecido o papel do gene *Nox3* como fonte primária da geração de espécies reativas de oxigênio na cóclea, especialmente

induzida pela ototoxicidade da cisplatina (81). O “*knockdown*” de *Nox3* (por pré-tratamento com *siRNA*) preveniu a ototoxicidade pela cisplatina através da preservação dos limiões auditivos e células ciliadas. Além disso, reduziu a expressão de *Nox3* e de biomarcadores de dano (TRPV1 - receptor de potencial transiente vaniloide do tipo 1 e KIM-1 - molécula de lesão renal-1) nos tecidos cocleares (82). O mediador *siRNA* (silenciador de genes) para *Nox3* reduziu a perda auditiva induzida pela cisplatina e a apoptose de células ciliadas sensoriais na cóclea em ratos (83). Embora não exista evidência similar em relação à PAIR, esse papel do *Nox3* no desenvolvimento da ototoxicidade pela cisplatina (especialmente nos mecanismos regulatórios de dano coclear) direcionou o interesse pela validação desse gene como candidato à PAIR.

O único estudo que explorou a relação entre a PAIR e a família NOX (incluindo *Nox3*) foi realizado em ratos (84). Esse estudo não indicou se o gene *Nox3* aumentou ou reduziu a susceptibilidade à PAIR. Em vez disso, avaliou os níveis de expressão de *Nox3* após a exposição ao ruído. Alguns membros da família NADPH oxidase (*NOX1* e *DUOX2*) sofreram *upregulation* após a exposição ao ruído, sugerindo que essas isoformas podem estar ligadas ao dano coclear. Por outro lado, a isoforma *Nox3* sofreu uma *downregulation* de sete e cinco vezes após a exposição a um ruído de 100 dB NPS e 110 dB NPS, respectivamente. Isso poderia representar um mecanismo protetor endógeno contra o estresse oxidativo. Esse mecanismo protetor pode ter diminuído o impacto do ruído entre os camundongos do tipo selvagem através da redução da expressão de *Nox3* e, conseqüentemente, diminuindo a diferença em relação aos mutantes. Entretanto, esses dados *in vivo* foram baseados no uso de um inibidor NOX inespecífico que atingia múltiplos membros da família simultaneamente. Dessa forma, não conseguiu demonstrar, de forma conclusiva, que o *Nox3* tem um papel na PAIR. Por outro lado, nosso estudo utilizou modelos animais com variação genética com ocorrência natural e perturbação genética específica em *Nox3*.

De acordo com o nosso estudo, a exposição ao ruído poderia ter um efeito oposto à cisplatina na expressão de *Nox3*, sugerindo um envolvimento diferencial de *Nox3* no ruído e no dano coclear induzido pela cisplatina. De acordo com essa literatura, foi desenvolvida a hipótese de que a ausência ou redução do produto do gene *Nox3*, responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio na cóclea, reduziria a susceptibilidade ao ruído; porém, nossos resultados foram

surpreendentemente no sentido oposto. Uma revisão da literatura demonstra que existem diversos mecanismos protetores e fisiológicos atribuídos aos genes da família NOX. Esses mecanismos incluem: defesa do hospedeiro e inflamação (morte celular dependente de espécies reativas de oxigênio, inativação de fatores microbianos virulentos, regulação do pH e da concentração iônica no fagossomo e atividade anti-inflamatória), regulação da expressão gênica (TNF-alfa, TGF-beta1 e angiotensina II), potencial de redução celular, sinalização celular (inibição de fosfatases, ativação de quinases, regulação de canais iônicos e sinalização do cálcio), sensores de oxigênio (rim, corpo carotídeo e pulmão), biossíntese, regulação da pressão arterial, crescimento celular, angiogênese, diferenciação e senescência (80). Esses mecanismos protetores podem ter desempenhado um papel importante na susceptibilidade à PAIR entre os camundongos do tipo selvagem.

Foi possível validar nossos achados do estudo de associação do genoma inteiro em cada um dos fenótipos auditivos e, de forma isolada, por meio do estudo com o camundongo mutante *Nox3^{het}*. Foi demonstrada uma diferença estatisticamente significativa, após a exposição ao ruído, entre o camundongo do tipo selvagem em comparação com os mutantes homocigotos e heterocigotos. Essa diferença foi confirmada através de diversos estudos de função auditiva, porém esse achado foi restrito à frequência de 8 kHz. De forma contrária às nossas expectativas iniciais, a presença do gene *Nox3* foi claramente protetora em relação ao dano auditivo. Além disso, foi possível demonstrar o efeito do genótipo (polimorfismo) no mesmo fenótipo (8 kHz) apresentado pelo estudo de associação. Também foi identificado o efeito em 4 kHz, porém esse achado foi somente sugestivo no estudo de associação e não foi confirmado entre os mutantes *Nox3^{het}*.

Foi realizada uma detalhada dissecação eletrofisiológica do fenótipo através da avaliação da função das CCEs por meio de EOAPDs e das CCI e do nervo auditivo através do PEATE. Embora não tenha existido diferença estatisticamente significativa nos limiares das EOAPDs entre os genótipos, existiu uma marcada diferença na amplitude da onda 1 do PEATE após estimulação supraliminar na frequência de 8 kHz *tone-burst*. Isso sugere que o mecanismo de perda auditiva, em relação ao *Nox3*, está presente nos neurônios do gânglio espiral e provavelmente na região do mapa coclear que corresponde à frequência de 8 kHz.

Existem diversos genes expressos de forma diferenciada ao longo do eixo tonotópico da cóclea, como foi demonstrado para *Nox3* (85). É provável que esse achado na frequência específica de 8kHz, na variação da susceptibilidade à PAIR, seja resultado desse padrão de expressão tonotópica.

Considerando que todos os resultados apontavam para a área correspondente à frequência de 8 kHz, foi iniciada uma profunda dissecação eletrofisiológica e histológica dessa frequência. A avaliação das EOAPDs e da amplitude supraliminar da onda 1 do PEATE foi realizada através de múltiplos níveis de intensidade de estímulo. Em todos os testes, o camundongo do tipo selvagem foi mais resistente à PAIR, de forma isolada, na frequência de 8 kHz. A imuno-histoquímica foi realizada duas semanas após a exposição ao ruído. Embora a diferença na proporção de CCEs mortas não tenha sido significativa, foi demonstrada uma densidade significativamente mais alta de vesículas sinápticas nos camundongos do tipo selvagem (após a exposição ao ruído). Dessa forma, os achados eletrofisiológicos foram confirmados pela imuno-histoquímica. Isso comprovou que a presença de *Nox3* é protetora ao nível neuronal e que a perda auditiva, após a exposição ao ruído, ocorre nesse nível do sistema auditivo periférico.

A ausência de diferença na contagem de CCEs foi também verificada através da sua medida eletrofisiológica correspondente, o limiar auditivo por EOAPDs. Entretanto, através da avaliação da amplitude supraliminar por EOAPDs, foi possível observar uma amplitude significativamente maior no camundongo do tipo selvagem. Essas três diferentes medidas da integridade das CCEs (contagem de CCEs, limiar auditivo por EOAPDs e amplitude supraliminar por EOAPDs) apresentam diferentes perfis de sensibilidade para demonstrar o impacto do ruído. Provavelmente, a amplitude supraliminar por EOAPDs é a medida mais sensível, já que existe uma melhor relação sinal-ruído. Essa medida indica que existe, significativamente, menos impacto na atividade das CCEs no camundongo do tipo selvagem.

Embora o gene *Nox3* esteja associado com a produção de $O_2^{\bullet-}$ na orelha interna, a família NOX tem diversos mecanismos fisiológicos e potencialmente protetores. Certamente, esse papel protetor explica o fato de que a ausência de *Nox3* aumentou a susceptibilidade à PAIR nos nossos modelos de camundongo mutante. Entretanto, existe uma falta de estudos específicos sobre os mecanismos do gene *Nox3* em função de sua expressão específica na orelha interna. Além disso, os

estudos funcionais sobre *Nox3* têm sido realizado através de sistemas de sobre-expressão (15). A maioria das evidências em relação a esses mecanismos é derivada das outras isoformas, como *Nox2*, que é funcionalmente similar a *Nox3* (79). Assim, devido à literatura escassa, nos baseamos em outras isoformas para formular hipóteses sobre os mecanismos de susceptibilidade à PAIR.

Já que as espécies reativas de oxigênio são frequentemente relacionadas à inflamação, parece ilógico imaginar que as enzimas NOX apresentem atividade anti-inflamatória. Entretanto, nos últimos anos, diversos estudos surpreendentes têm apontado na direção oposta. A maioria dos dados sobre a atividade anti-inflamatória das enzimas NOX advém de estudos que utilizam camundongos deficientes do fagócito NADPH oxidase *Nox2*. Foi demonstrada uma reduzida capacidade de degradar o material fagocitado nas células deficientes em *Nox2*, gerando um acúmulo de debris (86). Além disso, essa hiperinflamação pode ocorrer em função da carência de sinalização dependente de espécies reativas de oxigênio nos fagócitos deficientes e também por uma atenuação na dependência das espécies reativas de oxigênio para sinalização do cálcio, contribuindo para o aumento da inflamação. Finalmente, a deficiência na inativação oxidativa de mediadores pró-inflamatórios gera o prolongamento da resposta inflamatória (80).

A hiperinflamação no camundongo deficiente para NADPH oxidase foi demonstrada em modelos para *Helicobacter gastritis* (15,16), artrite (87) doença desmielinizante (88) e queimadura solar (89). Numa infecção pulmonar experimental por influenza, camundongos com deficiência de *Nox2* apresentaram um maior infiltrado inflamatório (90). Além disso, em estudos sobre disfunção endotelial, a ausência de *Nox4* resultou na redução da expressão endotelial de óxido nítrico sintetase, produção de óxido nítrico e expressão da heme-oxigenase 1, as quais estão associadas a apoptose e ativação inflamatória (90).

Existe evidência crescente de que as enzimas NOX têm um papel importante na limitação da resposta inflamatória. Isso foi demonstrado ser também verdadeiro no dano induzido pelo ruído. Contudo, essa atividade antiinflamatória das enzimas NOX é pouco entendida na fisiologia coclear. Por enquanto, como descrito para as outras isoformas, nossa hipótese é a de que existem mecanismos protetores importantes, como a resposta antiinflamatória resultante da exposição ao ruído. Esse mecanismo antiinflamatório seria crucial para proteger a cóclea do dano gerado pelo ruído,

compensando o potencial dano causado pela liberação de espécies reativas de oxigênio.

5.8 Primeira Evidência Experimental de Interação do Gene e Ambiente na Perda Auditiva Induzida pelo Ruído

Identificar as interações do gene e ambiente pode ter implicações importantes para a saúde pública e se tornará um componente cada vez mais significativo na área de saúde na era da medicina personalizada (210). Existem grandes desafios para o estudo dessas interações em humanos, incluindo avaliação da exposição, tamanho de amostra e heterogeneidade (211). É raro que os pesquisadores sejam capazes de obter medições precisas de exposição ao longo da vida, limitando assim a precisão fenotípica. Esta é uma grande barreira para o estudo da PAIR em humanos. Estimulados pelos sucessos dos estudos de associação em humanos e pelas dificuldades inerentes aos estudos de interação gene e ambiente em humanos, muitos pesquisadores recorreram a abordagens semelhantes em camundongos. Existem várias vantagens que usamos em nossa análise, incluindo nossa capacidade de controlar a exposição ambiental (ruído), acesso aos tecidos cocleares para análises de expressão gênica e a disponibilidade de um conjunto renovável de linhagens de camundongos consanguíneos para estudo.

Por quase 50 anos, o camundongo tem sido um modelo animal essencial para estudos de perda auditiva. Diferentes suscetibilidades à PAIR foram observadas em diferentes linhagens consanguíneas de camundongos. Isso indica que um componente significativo da perda auditiva associada à exposição ao ruído é de origem genética. Vários *loci* específicos de linhagens para perda auditiva relacionada à idade também estão associados à suscetibilidade a PAIR (8).

Os camundongos demonstraram uma variabilidade dependente da frequência no grau de dano por ruído, o curso de tempo no qual o dano ocorre e o impacto sobre os tipos de células cocleares. Este trabalho mostrou claramente que linhagens consanguíneas de camundongos exibem variação significativa em sua capacidade de absorver ruído. Vários *loci* Mendelianos associados com a perda auditiva induzida pelo ruído foram descritos, mas o *locus* mais significativo até o momento é *Ahl1*, que contém o gene *Cdh23*. Embora esteja claro que o alelo *Cdh23* 753A aumenta a suscetibilidade à PAIR, os resultados de alguns estudos, incluindo o nosso,

demonstram que loci adicionais nos genomas de camundongos consanguíneos contribuem para essa suscetibilidade (48,212–214). A análise funcional da variação natural é uma grande promessa para elucidar processos biológicos. A seleção de amostras de um *pool* de mutações que ocorreram ao longo do tempo, como aquelas encontradas em uma população, revelará variantes naturais com propriedades diferentes em comparação com mutações induzidas experimentalmente. Aqui, descrevemos a primeira análise de associação para perda auditiva induzida pelo ruído que demonstramos, pela primeira vez, uma interação do gene com o ambiente para esse fenótipo.

Nessa associação, apresentam-se limiares auditivos pós-exposição e mudança permanente de limiar para identificar *loci* associados com PAIR nas várias frequências testadas. No entanto, nessa análise de interação gene-ambiente, demonstram-se associações que excedem a significância usando apenas limiares pós-exposição. Existem várias razões para essas descobertas. Várias linhagens tinham déficits auditivos basais severos e cálculos subsequentes de mudança de limiar permanente não confiáveis (o “efeito teto”).

Consistente com a observação clínica em humanos de que a PAIR e a maioria das ototoxinas afetam a função nas altas frequências da cóclea, nosso *locus* também foi mapeado nas frequências mais altas do espectro (24 kHz e 32 kHz). Ao integrar informações transcriptômicas, demonstramos cinco genes dentro do bloco de haplótipos presumidos (*Rassf4*, *March8*, *Zfp422*, *Olf212* e *Olf215*) que também tinham *cis* eQTLs significativos na cóclea e necessitam de análises mais aprofundadas. Curiosamente, nenhum desses genes foi associado à audição até agora. *Zfp422* participa da osteogênese durante o desenvolvimento (215) e pode desempenhar um papel no desenvolvimento do labirinto ósseo (cápsula ótica). *Olf212* e *Olf215* são conhecidos como genes de receptores olfativos (216) e também podem estar presentes em outros órgãos sensoriais, como o ouvido interno.

Com base em nosso banco de dados de expressão dos 500 genes mais correlacionados com limiares auditivos após exposição ao ruído, *Ceacam16* teve a maior significância estatística. Certamente, há um papel promissor da *Ceacam16* na PAIR, uma vez que é responsável pela manutenção da integridade da membrana tectória. Pouco se sabe sobre o impacto da exposição ao ruído na membrana tectória e isso requer uma investigação mais aprofundada. Além disso, nossa análise de

enriquecimento para receptor sensorial e função mitocondrial sugere um conjunto de genes e vias, além de nossos genes candidatos, que merecem ser investigados em estudos futuros.

Em nossa associação anterior identificamos cinco *loci* significativos em todo o genoma com 64 cepas que não aparecem nessa análise de interação gene-ambiente. Esse fenômeno provavelmente resulta da adição de 36 linhagens, algumas das quais não segregam o SNP causal e / ou “tag”, fazendo com que esses *loci* não atinjam mais a significância. Isso provavelmente representa a adição de linhagens que não conseguiram segregar o alelo de sensibilidade da perda auditiva induzida pelo ruído. Além disso, *rs37517079* não foi considerado significativo em nossa análise anterior em 24 kHz e 32 kHz. Provavelmente, nosso painel incompleto (64 linhagens) não foi poderoso o suficiente para destacar este SNP.

As descobertas deste e de nossos estudos anteriores confirmam três conceitos essenciais que, até o momento, não foram relatados. Em primeiro lugar, *rs37517079* foi associado aos limiares do PEATE após a exposição ao ruído na frequência de 32 kHz e 24 kHz, que, semelhante à nossa associação antes da exposição ao ruído, sugere a existência de suscetibilidade genética específica em cada frequência na PAIR. Em segundo lugar, não parece haver nenhum *locus* associado a frequências no espectro de audição mais baixo após a exposição ao ruído, pelo menos com base nas 100 linhagens do HMDP caracterizados nessa análise. Esse achado posterior é consistente com a literatura sobre PAIR, por ser uma doença que afeta as altas frequências. No entanto, não podemos excluir a possibilidade de que o uso de outros recursos para mapeamento poderiam incluir linhagens selvagens ou outros painéis de camundongos como referência poderia melhorar a cobertura genômica e gerar *loci* adicionais em todas as frequências. Por fim, esses achados também demonstram que a arquitetura genética da PAIR é distinta daquela dos limiares auditivos na linha de base nas interações entre a genética e o ambiente na PAIR.

Como perspectivas de futuras linhas de pesquisa à presente linha de pesquisa vamos realizar a aplicação dessa abordagem em outros fenótipos eletrofisiológicos como a eletrococleografia, por exemplo. Estamos expandindo a fenotipagem para um maior número de linhagens, sendo crucial para aumento o poder estatístico e resolução do mapeamento. E, finalmente, a validação de outros genes candidatos mapeados nessas diversas análises apresentadas nessa tese de livre-docência.

6. CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Inicialmente descrevemos o fenótipo dos limiares auditivos com PEATE antes e após a exposição ao ruído de 100 linhagens de camundongos consanguíneos, 47 dos quais nunca foram caracterizados previamente. Essas 100 linhagens apresentavam padrões distintos de limiares auditivos e de vulnerabilidade à exposição ao ruído. Disponibilizamos essa base de dados fenotípica para uso público como um novo recurso para o estudo de PAIR em camundongos. Da mesma forma, descrevemos a amplitude da onda P1-N1 antes e depois da exposição ao ruído nessa população e identificamos padrões distintos de suscetibilidade ao ruído através dessa métrica. E, o mais importante, demonstramos que existe uma clara variação fenotípica entre as linhagens. Portanto, isso explica o nosso sucesso no mapeamento genético do fenótipo da perda auditiva induzida pelo ruído.

A primeira associação elucidou a arquitetura genética da audição em resposta a determinadas frequências antes da exposição ao ruído. Identificamos vários novos *loci* que são, em sua maior parte, específicos para cada frequência e ilustram a natureza complexa da audição dos mamíferos. A sobreposição entre o efeito do locus *Otog1* na perda auditiva em camundongos e a perda auditiva não sindrômica em humanos reforça o conceito de que as vias biológicas subjacentes provavelmente são conservadas entre os mamíferos. Ao combinar a genética de sistemas com a bioinformática, também identificamos genes candidatos posicionais plausíveis em vários *loci* que podem ser buscados posteriormente para validação funcional.

Subsequentemente a associação após a exposição ao ruído mapeou 27 genes candidatos utilizando um conjunto de 64 linhagens e, posteriormente, ampliado para 100 linhagens de camundongos do HMDP. Foi o primeiro estudo de associação sobre perda auditiva induzida pelo ruído em camundongos. Utilizamos os níveis de transcrição coclear para priorizar os nossos genes candidatos. E, posteriormente, analisamos a interação gene-ambiente e determinamos a importância do polimorfismo *rs37517079* na perda auditiva induzida pelo ruído. A combinação e integração do fenótipo de PAIR, associação genômica e níveis de transcrição coclear sugere fortemente que as interações do gene com o ambiente desempenham um papel importante na suscetibilidade à PAIR.

A análise do fenótipo com amplitudes supra-liminares das emissões otoacústicas por produtos de distorção antes e após a exposição ao ruído identificaram 6 novos *loci* inéditos na literatura e priorizamos 2 genes candidatos, *Eya1* (linha de base) e *Efr3a* (pós-exposição). E, finalmente, a amplitude supraliminar da onda P1-N1 do PEATE em camundongos permitiu um entendimento da arquitetura genética da sinapse auditiva das células ciliadas e a suscetibilidade à sinaptopatia coclear induzida por ruído. Identificamos vários novos *loci* e, usando nossos eQTLs cocleares, também priorizamos genes candidatos posicionais (*Robo 1* e *Robo 2*).

E, finalmente, relatamos a primeira validação funcional de um gene do sistema auditivo proveniente de um estudo de associação. Demonstramos que *Nox3* está envolvido na suscetibilidade a PAIR e que camundongos deficientes em *Nox3* são os mais suscetíveis. Esse achado foi específico na frequência de 8 kHz tanto do ponto de vista eletrofisiológico (limiar do PEATE e medidas supralimiais das emissões otoacústicas e PEATE) quando histologicamente no nível das bandas sinápticas célula ciliada / neurônio auditivo. Nossos resultados validam o poder do HMDP para mapear genes de suscetibilidade de PAIR e as suscetibilidades genéticas tonotópicas presentes na cóclea de camundongo.

7 ANEXOS

Anexo A

University of Southern California
Institutional Animal Care and Use Committee
Protocol Synopsis Form

- Please fill out all fields on this form accurately and completely. Review all applicable institutional policies involving animal use (links to available policies are presented as underlined blue text). Links to [instructions](#) on specific sections of the protocol synopsis form are available.
- Please append the following supplemental attachments only if they apply:
 - Attachment A: Tumor Growth
 - Attachment B: Radioactive and Biohazardous Materials
 - Attachment C: Genetically Engineered Animals
 - Attachment D: Surgery
- Print and sign the completed form (please DO NOT STAPLE) or sign the form electronically and submit as an email attachment.
- Submit the signed protocol form (paper or electronic version), with attachments, **along with a copy of the matching grant proposal** to the [IACUC coordinator](#). **Please note:** the *PI name, project title and animal procedure information* listed in the IACUC protocol should match that listed in the grant proposal.
- Please keep electronic and paper copies of this form for your records.

General Information

PI Last Name: Friedman	First Name: Rick	Protocol No.:
-------------------------------	-------------------------	----------------------

Degree: MD, PhD	Title: Professor USC ID: 5979108749	Department: Otolaryngology
------------------------	---	-----------------------------------

Campus Address: Zilkha Neurogenetics Institute	Co-Investigator(s):	
Phone: 323-442-2144	FAX: 323-442-2145	E-mail: rick.friedman@med.usc.edu

Emergency No. (e.g. pager or home telephone): 310-403-1581

Proposed Project Start Date*: 9-1-2013	Proposed Termination Date: 12-31-2015
---	--

*Regardless of the actual project start and termination dates, the IACUC protocol synopsis will be considered approved for 3 years, starting with the date listed in the approval letter; after 3 years, submission of a new protocol synopsis is required.

Title of Project:

Funding Agency and Address:

Funds Deposited: USC Contracts and Grants HRA Departmental
 Other _____

Please check all boxes that apply to your study:

Peer Reviewed? Yes No

Type of Protocol: New Continuation GLP

Type of Project: Research Research & Development Teaching
Pilot

Animal Information

Species	*Strain	Animal Use Classification *please refer to instruction sheet				Maximum # of Animals per Year ordered from outside vendors	Maximum # of Animals per Year Produced from USC Breeding Colonies
Mice	100 strains	<input type="checkbox"/> A	<input checked="" type="checkbox"/> B	<input type="checkbox"/> C	<input type="checkbox"/> D	504	
Dcctm1Wbq/Mm	1 knockout	<input type="checkbox"/> A	<input checked="" type="checkbox"/> B	<input type="checkbox"/> C	<input type="checkbox"/> D	4	
		<input type="checkbox"/> A	<input type="checkbox"/> B	<input type="checkbox"/> C	<input type="checkbox"/> D		
		<input type="checkbox"/> A	<input type="checkbox"/> B	<input type="checkbox"/> C	<input type="checkbox"/> D		

Please note any special requirements for animal housing or care of which the IACUC should be aware:

Dr. Lusic's group (UCLA) has developed a panel of 150 inbred strains with statistical power and resolution for gene mapping. 5 mice of each strain (female, age-matched) will come to the USC (Room 716A) each week, tested for hearing and exposed to noise. Two weeks later the mice will be retested and euthanized.

Inbred		Recombinant Inbred				
129X1/SvJ	KK/HIJ	BXD40/TyJ	BXA1/PgnJ	BXD39/TyJ	BXD20/TyJ	BXH14/TyJ
A/J	LG/J	BXD42/TyJ	BXA11/PgnJ	BXD1/TyJ	BXD21/TyJ	BXH19/TyJ
AKR/J	LP/J	AXB1/PgnJ	BXA12/PgnJ	BXD5/TyJ	BXD22/TyJ	BXH2/TyJ
C57BL6/J	MA/MyJ	AXB10/PgnJ	BXA13/PgnJ	BXD6/TyJ	BXD24a/TyJ	BXH20/KccJ
BALB/cJ	NOD/ShiLtJ	AXB12/PgnJ	BXA14/PgnJ	BXD8/TyJ	BXD24b/TyJ	BXH22/KccJ
BTBR	NON/ShiLtJ	AXB13/PgnJ	BXA16/PgnJ	BXD9/TyJ	BXD27/TyJ	BXD11/TyJ
BUB/BnJ	NZB/BINJ	AXB15/PgnJ	BXA2/PgnJ	BXD12/TyJ	BXD28/TyJ	BXH6/TyJ
C3H/HeJ	NZW/LacJ	AXB19/PgnJ	BXA24/PgnJ	BXD13/TyJ	BXD29/TyJ	BXH7/TyJ
C57L/J	PL/J	AXB19a/PgnJ	BXA25/PgnJ	BXD14/TyJ	BXD31/TyJ	BXH8/TyJ
C58/J	Riis/J	AXB19b/PgnJ	BXA26/PgnJ	BXD15/TyJ	BXD32/TyJ	BXH9/TyJ
CBA/J	SEA/GnJ	AXB2/PgnJ	BXA4/PgnJ	BXD16/TyJ	BXD33/TyJ	B6Cc3-1/KccJ
CE/J	SjL/J	AXB23/PgnJ	BXA7/PgnJ	BXD18/TyJ	BXD34/TyJ	BXH10/TyJ
DBA/2J	SM/J	AXB24/PgnJ	BXA8/PgnJ	BXD19/TyJ	BXD36/TyJ	
FVB/NJ	SWR/J	AXB4/PgnJ	AXB6/PgnJ	BXD2/TyJ	BXD38/TyJ	
I/LnJ	tf/J	AXB5/PgnJ	AXB8/PgnJ			

Table I. List of Inbred and Recombinant Inbred strains included in the HMDP.

Although we cannot guarantee choice, please select the campus location (a specific building on the UPC or HSC campus) where you prefer your animals to be housed

1st Choice:

2nd Choice:

3rd Choice:

Personnel and Training

Training and experience with the animals and procedures to be used on the project: List the name, USC employee number, and e-mail address of all individuals who will come into contact with the animals used on this project. For each individual, please indicate whether they have received training for the appropriate species by the USC Department of Animal Resources. Also indicate for each person their experience and qualifications to perform the procedures listed in this protocol. **Note that all individuals who handle animals must participate in the USC Occupational Health and Safety Program. Individuals listed below will be contacted by the USC safety office for enrollment.**

Name	USC 10 Digit Employee No.	E-mail address	Training (yes/no)
Rick Friedman	5979108749	rick.friedman@med.usc.edu	Yes
Juemei Wang	7390591494	iuemeiwa@usc.edu	Yes
Maria Ho	9335036833	mariaho@usc.edu	Yes
Joel Lavinsky	5478416997	ilavinskybr@yahoo.com	Yes
Sarah Kayne	6273025768	sarahekayne@gmail.com	Yes
Pezhman Salehi	2654243381	salehide@usc.edu	Yes

Relevant experience/qualifications for each person:

These studies will be performed by Dr. Rick Friedman, Juemei Wang, Maria Ho, Joel Lavinsky and Sarah Kayne. Dr. Friedman has more than 20 years of experience in handling and performing hearing measurements on animal models such as mice and Jumei Wang has more than 11 years.. Both were trained and have used approved animal protocols at the House Research

Procedures

1. Locations of preparations and procedures involving animals or tissues:

Procedure rooms are located in HMR 716A, and lab procedure room on fifth floor, Norris, Room 5509A.

2. Nontechnical description of the project (research or teaching) and its potential value: In the space provided below **briefly** describe the overall purpose, goals and significance (importance to the advancement of scientific knowledge, general contribution to the well-being of mankind and/or potential benefits for amelioration of disease or suffering) of your project. Bearing in mind that the IACUC membership includes USC faculty not engaged in animal research, administrative personnel and community volunteers, use language understandable to the lay person. **Descriptions with excessive technical jargon, scientific terminology, laboratory procedures, and/or grant specific aims will not be accepted.** Previously submitted

nontechnical descriptions [examples](#) are available for guidance.

Balance disorders and dizziness arising from the inner ear are serious problems for older humans and will get worse as human life spans increase. At this time, very little is known about the genetic basis of human balance disorders and serious technical issues prevent our ability to understand the disease without an autopsy. In mice, few strains have been studied as well. The proposed study takes advantage of the well-known genetics of inbred strains of mice and the detailed genomic data for these strains to find genes that cause susceptibility to balance disorders. Once we know the genes and pathways responsible for the development of such disorders, we can begin to test therapeutic compounds to counter the effects of balance disorders.

Please indicate whether your procedures with animals will include any of the following:

3. Adjuvant use? (Freund's or Ribi) Yes No

If yes, please refer to the institutional policy (Investigator Manual, page 16) for [Adjuvants](#) use before continuing.

4. Tumor Growth? Yes No

Such as occurs following a specific treatment and/or injection of tumor cells or monoclonal antibody producing hybridomas. Please note if you have indicated yes above, you must refer to the institutional policy (Investigator Manual, page 17) for [Tumor Growth](#) then complete and submit **Attachment A: Tumor Growth**.

5. Food restriction (beyond that required for surgery)? Yes No

If yes, how long?

If yes, please refer to the institutional policy (Investigator Manual, page 25) on [Food or Fluid Restriction](#) before continuing.

6. Water restriction? Yes No **If yes, how long?**

If yes, please refer to the institutional policy (Investigator Manual, page 25) on [Food and Fluid Restriction](#) before continuing.

7. Blood collection? Yes No

If yes, please refer to the institutional policy (Investigator Manual, page 19) on [Blood Collection](#) before providing details on the blood volume, frequency of collection and collection site in the box below.

Volume	Frequency and number of samples	Collection Site

8. Radioactive materials or X-rays (including the use of fluoroscopy, etc.).

Are these used in live animals? Yes No

If yes, you must complete and submit **Attachment B: Radioactive and Biohazardous Materials**.

9. Biohazardous materials.

Are these used in live animals? Yes No

(Biohazardous materials include, but are not limited to: infectious agents, select agents, mutagens, carcinogens, recombinant DNA, the use of nonhuman primates, the use of human or nonhuman primate tissues or cell lines in animals). Please note if you have indicated yes above, you must complete and submit **Attachment B: Radioactive and Biohazardous Materials**.

10. Genetically Engineered Animal Production/utilization? Yes No

If yes, you must complete and submit **Attachment C: Genetically Engineered Animals**.

11. Surgery? Yes No

If your procedures involve surgery (survival or non-survival surgery) on live animals, you must refer to the institutional policy (Investigator Manual, page 48) for [Surgery and Post-operative Care](#) then complete and submit **Attachment D: Surgery**.

12. Pain and/or Discomfort: (Federal law requires that procedures involving animals must avoid or minimize discomfort, distress and pain to the animals).

a) If animals will be exposed to procedures that cause more than momentary or slight pain or distress, indicate below the sedatives, anesthetics or analgesics to be used. Recommended [anesthetics, analgesics, and tranquilizer dosages](#) are available.

Sedative/Anesthetic	Dose/Kg body weight	Route of Administration	Frequency of Administration
Ketamine+Xylazine	80-126 mg/kg + 10-14 mg/kg	IP	Max once per day
Isoflurane	1-4%	Inhalational	Max once per

Analgesic	Dose/Kg body weight	Route of Administration	Frequency of Administration

b) If animals will be exposed to painful or distressful procedures that will NOT be alleviated by the use of sedatives, anesthetics or analgesics, or the use of these agents are contraindicated, please explain in the space below:

N/A

13. Adverse effects.

If you expect any adverse effects (including pain and distress) of your procedures or stimuli on the animals (e.g. weight loss, fever, poor appearance, neurological deficits or behavioral abnormalities), please describe in the space below. Describe the conditions, complications and criteria (e.g. 20% weight loss, maximum tumor size, vocalizing, and lack of grooming) that would lead to euthanasia of an animal before the expected completion of the experiment. Note: if any unanticipated adverse effects not described below do occur during the course of the study, a complete description of those effects and any action taken in response to them must be submitted to the IACUC as an amendment to this protocol.

As the mice will only undergo only vestibular evoked potential after anesthesia and we do not anticipate adverse effects.

14. Procedures to be performed: In the space provided and on the following page, please provide a **written narrative** describing...

a) Procedures to be performed on all live animals utilized (each species used), including the following:

-the experimental or study groups , clearly defined.	-how the animals will be monitored post-procedure.
-a description of all planned procedures (treatments, surgery, injections, behavioral testing, tissue collection, etc.).	-when the animal will be euthanized during or following the procedures.
-the number of procedures to be performed on each animal and the endpoint established for each experiment.	-the drugs administered including frequency and dose.
-the expected effect of each procedure on the animal, including, but not restricted to pain and discomfort.	-the final disposition of all animals included on this project

b) Briefly, procedures performed on tissues obtained from live animals euthanized for the purposes of this protocol. Note: Please be concise and use only the cell on this page and the one on the next. Neither cell will expand beyond its page. Data will not flow from one to the other.

In the inner ear, balance involves the perception of movement of the head and can be measured via vestibular evoked potentials (VsEPs). VsEPs will be measured in up to 10 mice per strain at 4 to 10 weeks of age. VsEP analysis is carried out under anesthesia to minimize discomfort. We anesthetize the mice with a Ketamine/Xylazine (80-126 mg/kg+10-14 mg/kg) mixture administered IP at 1% volume/weight, and then measure VsEP. Once the mice are anesthetized, electrodes are placed at the base of the skull, base of the tail, and in the cheek of the mouse. The probe in the cheek then records neural transmissions through the vestibular nerve. Anesthetized animals are coupled to a padded head holder which snugly cradles the head. The head holder is coupled to a device that moves the head and records a calibrated output. Additionally, a speaker will play noise to mask any extraneous sound generated from the device, which may activate the cochlear nerve that runs next to the vestibular nerve and cause false signals to be measured. Mice will be visually monitored during VsEP analysis and during recovery to ensure survival. The VsEP measurements will be used as a quantitative trait for gene discovery using the efficient mixed model association (EMMA) software. Mice will be euthanized and vestibular system RNA will be harvested to conduct weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) with RNA. Our goal is to sample the vestibular system and conduct network analysis with both sets of RNA to reveal gene networks associated with worse balance perception. These network data are then used in conjunction with the gene mapping data to prioritize candidate genes for further analysis.

Following the determination of vestibular evoked potentials and while the mouse is still under anesthesia the mouse will be euthanized.

Euthanasia: Mice are euthanized by CO₂ inhalation followed by cervical dislocation.

Animal transport from UCLA to USC: Dr. Hooman Allayee or Akbari will be the two designated persons to transfer animals from UCLA to USC. Animals will be placed in transport cages and will stay in A/C equipped car during the transport. The average time of transport is 20-35 mins.

Precautions during the experiments: Juemei Wang/Maria Ho will be the designated person for animal exposure experiments and will not go to any other animal facilities on the same day that he visits Room 716A. He also wears mask and perform the exposure in a fume hood close to Room 716A.

Animals will be transported in transporting cages with water and food to Room 5509 and all the equipment and surfaces will be disinfected with "Strike Bac".

15. Numbers (please see [instructions](#) for guidance and examples):

Indicate the number of animals you plan to use for each experimental group or procedure and **justify according to accepted statistical principles or other**

scientific rationale. Experimental groups and procedures should match those listed under question 13 "procedures to be performed." The total number of animals to be ordered from outside vendors and the total number to be produced from USC breeding colonies must be included. If the totals requested are for a multi-year study, the numbers needed per year must be indicated here and entered in the table on page 1.

For the purpose of our studies, each group of animals will consist of 5 mice as this is the number required based upon our observed standard error of the mean. We anticipate performing three to five experiments per week, roughly 100 strains (500 mice) in a year.

Breeding plan: There will be no breeding, all mice will be purchased. All mice are age-matched and come from UCLA.

The inclusion of 2 breeding pairs of a knockout strain (Dcctm1Wbg/Mmmh) is required for the confirmation of Dcc gene as candidate gene. We are requesting to add this knockout mice, because in our efficient-mixed-model-association (EMMA) with 35 strains was demonstrated association with the Dcc gene (deleted in colorectal carcinoma). So, we need confirmation as a candidate gene. According to the Genome Wide Association Studies (GWAS), should be performed the phenotype confirmation in at least 3-5 mice per strains. Therefore, we are requesting the inclusion of these 4 mice in our study.

16. Euthanasia: Euthanasia must be conducted in accordance with the [Report of the AVMA Panel on Euthanasia](#)!!br0ken!!.

a) Indicate the method(s) of euthanasia for each species. Include the euthanasia agent, dose and route/method of administration:

Euthanasia: Mice are euthanized by CO₂ inhalation followed by cervical dislocation.
Alternative euthanasia: Mice are treated with single IP dose of sodium pentobarbital (120 mg/kg) followed by cervical dislocation.

b) Indicate what methods will be used to insure that the animal is dead prior to collecting tissues or carcass disposal:

Mice are euthanized by exposure to at least 6 mins of CO₂. In adult mice and rats, unconsciousness occurs within 10 seconds and death occurs within 1-2 minutes of exposure to 100% CO₂. Presumed death after exposure to carbon dioxide must be confirmed based on careful assessment of the animal for unambiguous signs of death, such as cardiac arrest or fixed, dilated pupils. Cervical dislocation will be used as secondary form of euthanasia to ensure euthanasia after CO₂ asphyxiation.

17. Non-animal models: Please indicate whether non-animal models have been developed in your area of research, and if so, describe why they cannot be used to meet your goals.

There are no non-animal methods to study the genetics of vestibular function in mammals. The study of the genetics of hearing and balance disorders in humans, on a genome-wide scale is prohibitively time consuming and costly. The mouse inner ear is functionally and genetically very similar to humans and is the gold standard for the study of the molecular biology and genetics of inner ear structure and function.

18. Supporting literature: Federal law (Animal Welfare Act, 7 USC 2131 et.seq.) requires that you provide the names of two or more databases searched for alternatives to animals, alternatives to painful procedures and unnecessary duplication of experiments. By providing this information, you are justifying the use of the animal model you have selected, supporting your justification for the use of animals for your project and ensuring that no alternatives exist to procedures that cause pain or distress and that these studies have not been previously conducted. The information is to include: the **databases** searched, the **date of the search** and **years covered** by the search, and the **key words or search strategy** used (please see instructions).

Databases	Date of Search	Years Covered	Key words or search strategy
Pubmed	June 2013	1996-2013	GWAS for NIHL
Google Scholar	June 2013	1996-2013	Animal alternatives

19. Experts: Please list one or more experts whom the IACUC may contact who are familiar with the experimental procedures you are using and might render an opinion regarding the appropriate use of animals for these studies. USC faculty would be appropriate.

Dr Neil Segil, EVP Research at the House Research Institute

Principal Investigator Assurance: I agree to abide by the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, the USDA Animal Welfare Regulations (CFR 1985) and *Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals* (1996). I have reviewed and agree to abide by all institutional policies governing the use of vertebrate animals for research, testing, teaching or demonstration purposes at USC. I certify that the proposed studies do not represent unnecessary duplication of experiments. I also certify that in the event that animals in this study experience pain or distress which cannot be adequately relieved, I will euthanize those animals immediately based on recommendations of the Animal Resources veterinary staff or IACUC.

8 REFERÊNCIAS

1. Stucken EZ, Hong RS. Noise-induced hearing loss: an occupational medicine perspective. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014 Oct;22(5):388–93.
2. Dobie RA. The burdens of age-related and occupational noise-induced hearing loss in the United States. *Ear Hear.* 2008 Aug;29(4):565–77.
3. Sliwinska-Kowalska M, Pawelczyk M. Contribution of genetic factors to noise-induced hearing loss: a human studies review. *Mutat Res.* 2013;752(1):61–5.
4. Heinonen-Guzejev M, Vuorinen HS, Mussalo-Rauhamaa H, Heikkilä K, Koskenvuo M, Kaprio J. Genetic component of noise sensitivity. *Twin Res Hum Genet Off J Int Soc Twin Stud.* 2005 Jun;8(3):245–9.
5. Shearer AE, Smith RJH. Genetics: advances in genetic testing for deafness. *Curr Opin Pediatr.* 2012 Dec;24(6):679–86.
6. Reed T, Christian JC, Page WH. Self-reported health history survey (Q8) and genetic analyses in the NAS-NRC aging twin panel cohort. In: *AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS.* UNIV CHICAGO PRESS 5720 SOUTH WOODLAWN AVE, CHICAGO, IL 60637-1603 USA; 2000. p. 215.
7. Hirose K, Liberman MC. Lateral wall histopathology and endocochlear potential in the noise-damaged mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2003 Sep;4(3):339–52.
8. Erway LC, Shiau YW, Davis RR, Krieg EF. Genetics of age-related hearing loss in mice. III. Susceptibility of inbred and F1 hybrid strains to noise-induced hearing loss. *Hear Res.* 1996 Apr;93(1–2):181–7.
9. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Flood DG, Reaume AG, Hoffman EK, et al. Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (Sod1) increases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Audiol Neurootol.* 1999;4(5):237–46.
10. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Lear PM, Ho YS. Targeted mutation of the gene for cellular glutathione peroxidase (Gpx1) increases noise-induced

-
- hearing loss in mice. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2000 Nov;1(3):243–54.
11. Kozel PJ, Davis RR, Krieg EF, Shull GE, Erway LC. Deficiency in plasma membrane calcium ATPase isoform 2 increases susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear Res*. 2002 Feb;164(1–2):231–9.
 12. Holme RH, Steel KP. Progressive hearing loss and increased susceptibility to noise-induced hearing loss in mice carrying a *Cdh23* but not a *Myo7a* mutation. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2004 Mar;5(1):66–79.
 13. Kang EY, Han B, Furlotte N, Joo JWJ, Shih D, Davis RC, et al. Meta-analysis identifies gene-by-environment interactions as demonstrated in a study of 4,965 mice. *PLoS Genet*. 2014 Jan;10(1):e1004022.
 14. Civelek M, Lusk AJ. Systems genetics approaches to understand complex traits. *Nat Rev Genet*. 2014 Jan;15(1):34–48.
 15. Bennett BJ, Farber CR, Orozco L, Kang HM, Ghazalpour A, Siemers N, et al. A high-resolution association mapping panel for the dissection of complex traits in mice. *Genome Res*. 2010 Feb;20(2):281–90.
 16. Farber CR, Bennett BJ, Orozco L, Zou W, Lira A, Kostem E, et al. Mouse genome-wide association and systems genetics identify *Asxl2* as a regulator of bone mineral density and osteoclastogenesis. *PLoS Genet*. 2011 Apr;7(4):e1002038.
 17. Park CC, Gale GD, de Jong S, Ghazalpour A, Bennett BJ, Farber CR, et al. Gene networks associated with conditional fear in mice identified using a systems genetics approach. *BMC Syst Biol*. 2011 Mar;5:43.
 18. Smolock EM, Ilyushkina IA, Ghazalpour A, Gerloff J, Murashev AN, Lusk AJ, et al. Genetic locus on mouse chromosome 7 controls elevated heart rate. *Physiol Genomics*. 2012 Jul;44(13):689–98.
 19. Davis RC, van Nas A, Bennett B, Orozco L, Pan C, Rau CD, et al. Genome-wide association mapping of blood cell traits in mice. *Mamm Genome*. 2013 Apr;24(3–4):105–18.

20. Bennett BJ, Wang SS, Wang X, Wu X, Lusis AJ. Genetic regulation of atherosclerotic plaque size and morphology in the innominate artery of hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Mar;29(3):348–55.
21. Parks BW, Nam E, Org E, Kostem E, Norheim F, Hui ST, et al. Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice. *Cell Metab.* 2013 Jan;17(1):141–52.
22. Orozco LD, Morselli M, Rubbi L, Guo W, Go J, Shi H, et al. Epigenome-wide association of liver methylation patterns and complex metabolic traits in mice. *Cell Metab.* 2015 Jun;21(6):905–17.
23. Ohmen J, Kang EY, Li X, Joo JW, Hormozdiari F, Zheng QY, et al. Genome-wide association study for age-related hearing loss (AHL) in the mouse: a meta-analysis. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2014 Jun;15(3):335–52.
24. Parks BW, Sallam T, Mehrabian M, Psychogios N, Hui ST, Norheim F, et al. Genetic architecture of insulin resistance in the mouse. *Cell Metab.* 2015 Feb;21(2):334–47.
25. Rau CD, Parks B, Wang Y, Eskin E, Simecek P, Churchill GA, et al. High-Density Genotypes of Inbred Mouse Strains: Improved Power and Precision of Association Mapping. *G3 (Bethesda).* 2015 Jul;5(10):2021–6.
26. Zheng QY, Johnson KR, Erway LC. Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hear Res.* 1999 Apr;130(1–2):94–107.
27. Liberman MC. Noise-induced and age-related hearing loss: new perspectives and potential therapies. *F1000Research.* 2017;6:927.
28. Shi L, Chang Y, Li X, Aiken S, Liu L, Wang J. Cochlear Synaptopathy and Noise-Induced Hidden Hearing Loss. *Neural Plast.* 2016;2016:6143164.
29. Liberman MC, Kujawa SG. Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms. *Hear Res.* 2017 Jun;349:138–47.
30. Kujawa SG, Liberman MC. Synaptopathy in the noise-exposed and aging

-
- cochlea: Primary neural degeneration in acquired sensorineural hearing loss. *Hear Res.* 2015 Dec;330(Pt B):191–9.
31. Kobel M, Le Prell CG, Liu J, Hawks JW, Bao J. Noise-induced cochlear synaptopathy: Past findings and future studies. *Hear Res.* 2017 Jun;349:148–54.
32. Liberman MC, Epstein MJ, Cleveland SS, Wang H, Maison SF. Toward a Differential Diagnosis of Hidden Hearing Loss in Humans. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162726.
33. SCHUKNECHT HF. FURTHER OBSERVATIONS ON THE PATHOLOGY OF PRESBYCUSIS. *Arch Otolaryngol.* 1964 Oct;80:369–82.
34. Sergeyenko Y, Lall K, Liberman MC, Kujawa SG. Age-related cochlear synaptopathy: an early-onset contributor to auditory functional decline. *J Neurosci.* 2013 Aug;33(34):13686–94.
35. Comitê Nacional de Ruído e Conservação Auditiva. Perda auditiva induzida por ruído relacionada ao trabalho. Boletim, n. 1, 29 jun. 1994. Revisto em 14 nov. 1999, São Paulo. In.
36. ACOEM evidence-based statement: noise-induced hearing loss. *J Occup Environ Med.* 2003 Jun;45(6):579–81.
37. Nudelman, A.A. et al. Perda Auditiva Induzida pelo Ruído Relacionada ao Trabalho; In: Lavinsky, L. Tratamento em Otologia. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.
38. Gratton MA, Eleftheriadou A, Garcia J, Verduzco E, Martin GK, Lonsbury-Martin BL, et al. Noise-induced changes in gene expression in the cochleae of mice differing in their susceptibility to noise damage. *Hear Res.* 2011 Jul;277(1–2):211–26.
39. McShane DP, Hyde ML, Alberti PW. Tinnitus prevalence in industrial hearing loss compensation claimants. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1988 Oct;13(5):323–30.

-
40. IBAÑEZ, R. N.; SCHNEIDER, I. O.; SELIGMAN, J. Anamnese dos trabalhadores expostos ao ruído. In: NUDELMANN, A. A. et al. *Perda Auditiva Induzida pelo Ruído: volume II*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
 41. Ohlemiller KK. Contributions of mouse models to understanding of age- and noise-related hearing loss. *Brain Res*. 2006 May;1091(1):89–102.
 42. Li HS. Influence of genotype and age on acute acoustic trauma and recovery in CBA/Ca and C57BL/6J mice. *Acta Otolaryngol*. 1992 Nov;112(6):956–67.
 43. Davis RR, Newlander JK, Ling X, Cortopassi GA, Krieg EF, Erway LC. Genetic basis for susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear Res*. 2001 May;155(1–2):82–90.
 44. Hultcrantz M, Li HS. Inner ear morphology in CBA/Ca and C57BL/6J mice in relationship to noise, age and phenotype. *Eur Arch oto-rhino-laryngology Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngological Soc Affil with Ger Soc Oto-Rhino-Laryngology - Head Neck Surg*. 1993;250(5):257–64.
 45. Li HS, Borg E. Auditory degeneration after acoustic trauma in two genotypes of mice. *Hear Res*. 1993 Jun;68(1):19–27.
 46. Li HS, Hultcrantz M, Borg E. Influence of age on noise-induced permanent threshold shifts in CBA/Ca and C57BL/6J mice. *Audiology*. 1993;32(3):195–204.
 47. Noben-Trauth K, Zheng QY, Johnson KR. Association of cadherin 23 with polygenic inheritance and genetic modification of sensorineural hearing loss. *Nat Genet*. 2003 Sep;35(1):21–3.
 48. White CH, Ohmen JD, Sheth S, Zebboudj AF, McHugh RK, Hoffman LF, et al. Genome-wide screening for genetic loci associated with noise-induced hearing loss. *Mamm Genome*. 2009 Apr;20(4):207–13.
 49. Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. *J Neurosci*. 2009 Nov;29(45):14077–85.

-
50. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007 Jun;447(7145):661–78.
 51. Pawelczyk M, Van Laer L, Fransen E, Rajkowska E, Konings A, Carlsson P-I, et al. Analysis of gene polymorphisms associated with K ion circulation in the inner ear of patients susceptible and resistant to noise-induced hearing loss. *Ann Hum Genet*. 2009 Jul;73(Pt 4):411–21.
 52. Konings A, Van Laer L, Wiktorek-Smagur A, Rajkowska E, Pawelczyk M, Carlsson PI, et al. Candidate gene association study for noise-induced hearing loss in two independent noise-exposed populations. *Ann Hum Genet*. 2009 Mar;73(2):215–24.
 53. Yang M, Tan H, Yang Q, Wang F, Yao H, Wei Q, et al. Association of hsp70 polymorphisms with risk of noise-induced hearing loss in Chinese automobile workers. *Cell Stress Chaperones*. 2006;11(3):233–9.
 54. Rabinowitz PM, Pierce Wise JS, Hur Mobo B, Antonucci PG, Powell C, Slade M. Antioxidant status and hearing function in noise-exposed workers. *Hear Res*. 2002 Nov;173(1–2):164–71.
 55. Fortunato G, Marciano E, Zarrilli F, Mazzaccara C, Intrieri M, Calcagno G, et al. Paraoxonase and superoxide dismutase gene polymorphisms and noise-induced hearing loss. *Clin Chem*. 2004 Nov;50(11):2012–8.
 56. Carlsson P-I, Van Laer L, Borg E, Bondeson M-L, Thys M, Fransen E, et al. The influence of genetic variation in oxidative stress genes on human noise susceptibility. *Hear Res*. 2005 Apr;202(1–2):87–96.
 57. Wangemann P. K⁺ cycling and the endocochlear potential. *Hear Res*. 2002 Mar;165(1–2):1–9.
 58. Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J, et al. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet*. 1997 Feb;15(2):186–9.
 59. Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lütjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, et

-
- al. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*. 1999 Feb;96(3):437–46.
60. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 1980 May;32(3):314–31.
61. Mitchell AA, Cutler DJ, Chakravarti A. Undetected genotyping errors cause apparent overtransmission of common alleles in the transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet*. 2003 Mar;72(3):598–610.
62. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996 Sep;273(5281):1516–7.
63. Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science*. 1996 Oct;274(5287):536–9.
64. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb;409(6822):860–921.
65. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001 Feb;409(6822):928–33.
66. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005 Oct;437(7063):1299–320.
67. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med*. 2002;4(2):45–61.
68. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet*. 2003 Feb;33(2):177–82.
69. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007 Oct;449(7164):851–61.

-
70. Visscher PM, Hill WG, Wray NR. Heritability in the genomics era--concepts and misconceptions. *Nat Rev Genet.* 2008 Apr;9(4):255–66.
 71. Cupples LA, Arruda HT, Benjamin EJ, D'Agostino RBS, Demissie S, DeStefano AL, et al. The Framingham Heart Study 100K SNP genome-wide association study resource: overview of 17 phenotype working group reports. *BMC Med Genet.* 2007;8 Suppl 1(Suppl 1):S1.
 72. Clayton DG, Walker NM, Smyth DJ, Pask R, Cooper JD, Maier LM, et al. Population structure, differential bias and genomic control in a large-scale, case-control association study. *Nat Genet.* 2005 Nov;37(11):1243–6.
 73. Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet.* 2006 Oct;7(10):781–91.
 74. Kazeem GR, Farrall M. Integrating case-control and TDT studies. *Ann Hum Genet.* 2005 May;69(Pt 3):329–35.
 75. Silver, LM. *Mouse Genetics: Concepts and Applications.* Oxford Univ. Press; 1995.
 76. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest.* 2008 May;118(5):1590–605.
 77. Burke DT, Kozloff KM, Chen S, West JL, Wilkowski JM, Goldstein SA, et al. Dissection of complex adult traits in a mouse synthetic population. *Genome Res.* 2012 Aug;22(8):1549–57.
 78. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009 Oct;461(7265):747–53.
 79. Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, et al. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature.* 2011 Jun;474(7351):337–42.
 80. Gunderson KL, Steemers FJ, Lee G, Mendoza LG, Chee MS. A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat Genet.* 2005

- May;37(5):549–54.
81. Matsuzaki H, Dong S, Loi H, Di X, Liu G, Hubbell E, et al. Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays. *Nat Methods*. 2004 Nov;1(2):109–11.
 82. Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, White MA, Wong K, Yalcin B, et al. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature*. 2011 Sep;477(7364):289–94.
 83. Yang H, Ding Y, Hutchins LN, Szatkiewicz J, Bell TA, Paigen BJ, et al. A customized and versatile high-density genotyping array for the mouse. *Nat Methods*. 2009 Sep;6(9):663–6.
 84. Frazer KA, Eskin E, Kang HM, Bogue MA, Hinds DA, Beilharz EJ, et al. A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. *Nature*. 2007 Aug;448(7157):1050–3.
 85. Churchill GA, Airey DC, Allayee H, Angel JM, Attie AD, Beatty J, et al. The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits. *Nat Genet*. 2004 Nov;36(11):1133–7.
 86. Zhang W, Korstanje R, Thaisz J, Staedtler F, Harttman N, Xu L, et al. Genome-wide association mapping of quantitative traits in outbred mice. *G3 (Bethesda)*. 2012 Feb;2(2):167–74.
 87. Aylor DL, Valdar W, Foulds-Mathes W, Buus RJ, Verdugo RA, Baric RS, et al. Genetic analysis of complex traits in the emerging Collaborative Cross. *Genome Res*. 2011 Aug;21(8):1213–22.
 88. Bogue MA, Grubb SC, Maddatu TP, Bult CJ. Mouse Phenome Database (MPD). *Nucleic Acids Res*. 2007 Jan;35(Database issue):D643-9.
 89. Payseur BA, Place M. Prospects for association mapping in classical inbred mouse strains. *Genetics*. 2007 Apr;175(4):1999–2008.
 90. Kang HM, Zaitlen NA, Wade CM, Kirby A, Heckerman D, Daly MJ, et al. Efficient control of population structure in model organism association mapping.

-
- Genetics. 2008 Mar;178(3):1709–23.
91. Philip VM, Sokoloff G, Ackert-Bicknell CL, Striz M, Branstetter L, Beckmann MA, et al. Genetic analysis in the Collaborative Cross breeding population. *Genome Res.* 2011 Aug;21(8):1223–38.
 92. Threadgill DW, Churchill GA. Ten years of the Collaborative Cross. *Genetics.* 2012 Feb;190(2):291–4.
 93. The genome architecture of the Collaborative Cross mouse genetic reference population. *Genetics.* 2012 Feb;190(2):389–401.
 94. Kelada SNP, Aylor DL, Peck BCE, Ryan JF, Tavarez U, Buus RJ, et al. Genetic analysis of hematological parameters in incipient lines of the collaborative cross. *G3 (Bethesda).* 2012 Feb;2(2):157–65.
 95. Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Burnett S, Klenerman P, Cookson WO, et al. Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice. *Nat Genet.* 2006 Aug;38(8):879–87.
 96. Svenson KL, Gatti DM, Valdar W, Welsh CE, Cheng R, Chesler EJ, et al. High-resolution genetic mapping using the Mouse Diversity outbred population. *Genetics.* 2012 Feb;190(2):437–47.
 97. Marchini J, Howie B, Myers S, McVean G, Donnelly P. A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat Genet.* 2007 Jul;39(7):906–13.
 98. Li Y, Tesson BM, Churchill GA, Jansen RC. Critical reasoning on causal inference in genome-wide linkage and association studies. *Trends Genet.* 2010 Dec;26(12):493–8.
 99. Long AD, Mullaney SL, Mackay TF, Langley CH. Genetic interactions between naturally occurring alleles at quantitative trait loci and mutant alleles at candidate loci affecting bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 1996 Dec;144(4):1497–510.
 100. Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M, Todd JA. Rare variants of IFIH1,

-
- a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science*. 2009 Apr;324(5925):387–9.
101. Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, Stevens C, Sharma Y, Zhang CK, et al. Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2011 Oct;43(11):1066–73.
 102. Yalcin B, Willis-Owen SAG, Fullerton J, Meesaq A, Deacon RM, Rawlins JNP, et al. Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that *Rgs2* modulates anxiety in mice. *Nat Genet*. 2004 Nov;36(11):1197–202.
 103. Su Z, Ishimori N, Chen Y, Leiter EH, Churchill GA, Paigen B, et al. Four additional mouse crosses improve the lipid QTL landscape and identify *Lipg* as a QTL gene. *J Lipid Res*. 2009 Oct;50(10):2083–94.
 104. Alberts B, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. New York: Garland Science; 2008.
 105. Capecchi MR. Targeted gene replacement. *Sci Am*. 1994 Mar;270(3):52–9.
 106. Mackay TFC. Complementing complexity. Vol. 36, *Nature genetics*. United States; 2004. p. 1145–7.
 107. Wilkie AOM. Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 Apr;16(2):187–203.
 108. Davis RC, Jin A, Rosales M, Yu S, Xia X, Ranola K, et al. A genome-wide set of congenic mouse strains derived from CAST/Ei on a C57BL/6 background. *Genomics*. 2007 Sep;90(3):306–13.
 109. Schadt EE, Lamb J, Yang X, Zhu J, Edwards S, Guhathakurta D, et al. An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. *Nat Genet*. 2005 Jul;37(7):710–7.
 110. Cooper GM, Shendure J. Needles in stacks of needles: finding disease-causal variants in a wealth of genomic data. *Nat Rev Genet*. 2011 Aug;12(9):628–40.

-
111. Verdugo RA, Farber CR, Warden CH, Medrano JF. Serious limitations of the QTL/microarray approach for QTL gene discovery. *BMC Biol.* 2010 Jul;8:96.
 112. Musunuru K, Strong A, Frank-Kamenetsky M, Lee NE, Ahfeldt T, Sachs K V, et al. From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature.* 2010 Aug;466(7307):714–9.
 113. Ayroles JF, Carbone MA, Stone EA, Jordan KW, Lyman RF, Magwire MM, et al. Systems genetics of complex traits in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet.* 2009 Mar;41(3):299–307.
 114. Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. *Introduction to Quantitative Genetics* 4th edn (Longman, 1996).
 115. Huang W, Richards S, Carbone MA, Zhu D, Anholt RRH, Ayroles JF, et al. Epistasis dominates the genetic architecture of *Drosophila* quantitative traits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Sep;109(39):15553–9.
 116. Burns, J. in *Towards a Theoretical Biology* Vol. 3 (ed. Waddington, C. H.) 47–51 (Edinburgh Univ. Press, 1970).
 117. Waddington, C. H. *The Strategy of the Genes* 262 (Allen & Unwin, 1957).
 118. Passador-Gurgel G, Hsieh W-P, Hunt P, Deighton N, Gibson G. Quantitative trait transcripts for nicotine resistance in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet.* 2007 Feb;39(2):264–8.
 119. Petretto E, Sarwar R, Grieve I, Lu H, Kumaran MK, Muckett PJ, et al. Integrated genomic approaches implicate osteoglycin (Ogn) in the regulation of left ventricular mass. *Nat Genet.* 2008 May;40(5):546–52.
 120. Ehrenreich IM, Bloom J, Torabi N, Wang X, Jia Y, Kruglyak L. Genetic architecture of highly complex chemical resistance traits across four yeast strains. *PLoS Genet.* 2012;8(3):e1002570.
 121. Brem RB, Yvert G, Clinton R, Kruglyak L. Genetic dissection of transcriptional regulation in budding yeast. *Science.* 2002 Apr;296(5568):752–5.

-
122. Brem RB, Kruglyak L. The landscape of genetic complexity across 5,700 gene expression traits in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb;102(5):1572–7.
 123. Lappalainen T, Sammeth M, Friedländer MR, 't Hoen PAC, Monlong J, Rivas MA, et al. Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans. *Nature*. 2013 Sep;501(7468):506–11.
 124. van Nas A, Ingram-Drake L, Sinsheimer JS, Wang SS, Schadt EE, Drake T, et al. Expression quantitative trait loci: replication, tissue- and sex-specificity in mice. *Genetics*. 2010 Jul;185(3):1059–68.
 125. Breitling R, Li Y, Tesson BM, Fu J, Wu C, Wiltshire T, et al. Genetical genomics: spotlight on QTL hotspots. *PLoS Genet*. 2008 Oct;4(10):e1000232.
 126. Orozco LD, Bennett BJ, Farber CR, Ghazalpour A, Pan C, Che N, et al. Unraveling inflammatory responses using systems genetics and gene-environment interactions in macrophages. *Cell*. 2012 Oct;151(3):658–70.
 127. Romanoski CE, Lee S, Kim MJ, Ingram-Drake L, Plaisier CL, Yordanova R, et al. Systems genetics analysis of gene-by-environment interactions in human cells. *Am J Hum Genet*. 2010 Mar;86(3):399–410.
 128. Schaub MA, Boyle AP, Kundaje A, Batzoglou S, Snyder M. Linking disease associations with regulatory information in the human genome. *Genome Res*. 2012 Sep;22(9):1748–59.
 129. Civelek M, Hagopian R, Pan C, Che N, Yang W, Kayne PS, et al. Genetic regulation of human adipose microRNA expression and its consequences for metabolic traits. *Hum Mol Genet*. 2013 Aug;22(15):3023–37.
 130. Kumar V, Westra H-J, Karjalainen J, Zhernakova D V, Esko T, Hrdlickova B, et al. Human disease-associated genetic variation impacts large intergenic non-coding RNA expression. *PLoS Genet*. 2013;9(1):e1003201.
 131. Flint J, Mackay TFC. Genetic architecture of quantitative traits in mice, flies, and humans. *Genome Res*. 2009 May;19(5):723–33.
 132. Naya FJ, Black BL, Wu H, Bassel-Duby R, Richardson JA, Hill JA, et al.

-
- Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. *Nat Med*. 2002 Nov;8(11):1303–9.
133. Weiss JN, Karma A, MacLellan WR, Deng M, Rau CD, Rees CM, et al. “Good enough solutions” and the genetics of complex diseases. *Circ Res*. 2012 Aug;111(4):493–504.
134. Wu C, Kraft P, Zhai K, Chang J, Wang Z, Li Y, et al. Genome-wide association analyses of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese identify multiple susceptibility loci and gene-environment interactions. *Nat Genet*. 2012 Oct;44(10):1090–7.
135. Ghazalpour A, Bennett B, Petyuk VA, Orozco L, Hagopian R, Mungrue IN, et al. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genet*. 2011 Jun;7(6):e1001393.
136. Zuk O, Hechter E, Sunyaev SR, Lander ES. The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan;109(4):1193–8.
137. Prabhu S, Pe’er I. Ultrafast genome-wide scan for SNP-SNP interactions in common complex disease. *Genome Res*. 2012 Nov;22(11):2230–40.
138. Hill WG, Goddard ME, Visscher PM. Data and theory point to mainly additive genetic variance for complex traits. *PLoS Genet*. 2008 Feb;4(2):e1000008.
139. Bloom JS, Ehrenreich IM, Loo WT, Lite T-LV, Kruglyak L. Finding the sources of missing heritability in a yeast cross. *Nature*. 2013 Feb;494(7436):234–7.
140. Smith EN, Kruglyak L. Gene-environment interaction in yeast gene expression. *PLoS Biol*. 2008 Apr;6(4):e83.
141. Smirnov DA, Morley M, Shin E, Spielman RS, Cheung VG. Genetic analysis of radiation-induced changes in human gene expression. *Nature*. 2009 May;459(7246):587–91.
142. Pearl, J. *Causality* (Cambridge Univ. Press, 2009).

-
143. Schwartz SM, Schwartz HT, Horvath S, Schadt E, Lee S-I. A systematic approach to multifactorial cardiovascular disease: causal analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Dec;32(12):2821–35.
 144. Marbach D, Costello JC, Küffner R, Vega NM, Prill RJ, Camacho DM, et al. Wisdom of crowds for robust gene network inference. *Nat Methods.* 2012 Jul;9(8):796–804.
 145. Huan T, Zhang B, Wang Z, Joehanes R, Zhu J, Johnson AD, et al. A systems biology framework identifies molecular underpinnings of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Jun;33(6):1427–34.
 146. Zhang B, Gaiteri C, Bodea L-G, Wang Z, McElwee J, Podtelezchnikov AA, et al. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell.* 2013 Apr;153(3):707–20.
 147. Hageman RS, Leduc MS, Korstanje R, Paigen B, Churchill GA. A Bayesian framework for inference of the genotype-phenotype map for segregating populations. *Genetics.* 2011 Apr;187(4):1163–70.
 148. Neto EC, Broman AT, Keller MP, Attie AD, Zhang B, Zhu J, et al. Modeling causality for pairs of phenotypes in system genetics. *Genetics.* 2013 Mar;193(3):1003–13.
 149. Blair RH, Kliebenstein DJ, Churchill GA. What can causal networks tell us about metabolic pathways? *PLoS Comput Biol.* 2012;8(4):e1002458.
 150. Chaibub Neto E, Ferrara CT, Attie AD, Yandell BS. Inferring causal phenotype networks from segregating populations. *Genetics.* 2008 Jun;179(2):1089–100.
 151. Li R, Tsaih S-W, Shockley K, Stylianou IM, Wergedal J, Paigen B, et al. Structural model analysis of multiple quantitative traits. *PLoS Genet.* 2006 Jul;2(7):e114.
 152. Friedman RA, Van Laer L, Huentelman MJ, Sheth SS, Van Eyken E, Corneveaux JJ, et al. GRM7 variants confer susceptibility to age-related hearing impairment. *Hum Mol Genet.* 2009 Feb;18(4):785–96.

-
153. Schrauwen I, Ealy M, Huentelman MJ, Thys M, Homer N, Vanderstraeten K, et al. A genome-wide analysis identifies genetic variants in the RELN gene associated with otosclerosis. *Am J Hum Genet.* 2009 Mar;84(3):328–38.
 154. Van Laer L, Huyghe JR, Hannula S, Van Eyken E, Stephan DA, Mäki-Torkko E, et al. A genome-wide association study for age-related hearing impairment in the Saami. *Eur J Hum Genet.* 2010 Jun;18(6):685–93.
 155. Girotto G, Pirastu N, Sorice R, Biino G, Campbell H, d'Adamo AP, et al. Hearing function and thresholds: a genome-wide association study in European isolated populations identifies new loci and pathways. *J Med Genet.* 2011 Jun;48(6):369–74.
 156. Newman DL, Fisher LM, Ohmen J, Parody R, Fong C-T, Frisina ST, et al. GRM7 variants associated with age-related hearing loss based on auditory perception. *Hear Res.* 2012 Dec;294(1–2):125–32.
 157. Girotto G, Vuckovic D, Buniello A, Lorente-Cánovas B, Lewis M, Gasparini P, et al. Expression and replication studies to identify new candidate genes involved in normal hearing function. *PLoS One.* 2014;9(1):e85352.
 158. Lippert C, Listgarten J, Liu Y, Kadie CM, Davidson RI, Heckerman D. FaST linear mixed models for genome-wide association studies. *Nat Methods.* 2011 Sep;8(10):833–5.
 159. Flaherty JP, Fairfield HE, Spruce CA, McCarty CM, Bergstrom DE. Molecular characterization of an allelic series of mutations in the mouse Nox3 gene. *Mamm Genome.* 2011 Apr;22(3–4):156–69.
 160. Mills JH. Threshold shifts produced by exposure to noise in chinchillas with noise-induced hearing losses. *J Speech Hear Res.* 1973 Dec;16(4):700–8.
 161. Clark WW. Recent studies of temporary threshold shift (TTS) and permanent threshold shift (PTS) in animals. *J Acoust Soc Am.* 1991 Jul;90(1):155–63.
 162. Müller M, von Hünenbein K, Hoidis S, Smolders JWT. A physiological place-frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse. *Hear Res.* 2005 Apr;202(1–

- 2):63–73.
163. Lin C-Y, Wu J-L, Shih T-S, Tsai P-J, Sun Y-M, Guo YL. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms as susceptibility factors for noise-induced temporary threshold shift. *Hear Res.* 2009 Nov;257(1–2):8–15.
 164. Yariz KO, Duman D, Zazo Seco C, Dallman J, Huang M, Peters TA, et al. Mutations in OTOGL, encoding the inner ear protein otogelin-like, cause moderate sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet.* 2012 Nov;91(5):872–82.
 165. Lavinsky J, Crow AL, Pan C, Wang J, Aaron KA, Ho MK, et al. Genome-wide association study identifies *nox3* as a critical gene for susceptibility to noise-induced hearing loss. *PLoS Genet.* 2015 Apr;11(4):e1005094.
 166. Flint J, Eskin E. Genome-wide association studies in mice. *Nat Rev Genet.* 2012 Nov;13(11):807–17.
 167. Ghazalpour A, Rau CD, Farber CR, Bennett BJ, Orozco LD, van Nas A, et al. Hybrid mouse diversity panel: a panel of inbred mouse strains suitable for analysis of complex genetic traits. *Mamm Genome.* 2012 Oct;23(9–10):680–92.
 168. Vyse TJ, Kotzin BL. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:261–92.
 169. Vazquez-Torres A, Vallance BA, Bergman MA, Finlay BB, Cookson BT, Jones-Carson J, et al. Toll-like receptor 4 dependence of innate and adaptive immunity to *Salmonella*: importance of the Kupffer cell network. *J Immunol.* 2004 May;172(10):6202–8.
 170. Konings A, Van Laer L, Van Camp G. Genetic studies on noise-induced hearing loss: a review. *Ear Hear.* 2009 Apr;30(2):151–9.
 171. Willott JF, Erway LC. Genetics of age-related hearing loss in mice. IV. Cochlear pathology and hearing loss in 25 BXD recombinant inbred mouse strains. *Hear Res.* 1998 May;119(1–2):27–36.

-
172. Mills JH, Schmiedt RA, Schulte BA, Dubno JR. Age-related hearing loss: A loss of voltage, not hair cells. In: *Seminars in Hearing*. Copyright© 2006 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ...; 2006. p. 228–36.
 173. Dubno JR, Eckert MA, Lee F-S, Matthews LJ, Schmiedt RA. Classifying human audiometric phenotypes of age-related hearing loss from animal models. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2013 Oct;14(5):687–701.
 174. Mills JH, Schmiedt RA, Kulish LF. Age-related changes in auditory potentials of Mongolian gerbil. *Hear Res*. 1990 Jul;46(3):201–10.
 175. Schmiedt RA. Effects of aging on potassium homeostasis and the endocochlear potential in the gerbil cochlea. *Hear Res*. 1996 Dec;102(1–2):125–32.
 176. Dallos P, Harris D. Properties of auditory nerve responses in absence of outer hair cells. *J Neurophysiol*. 1978 Mar;41(2):365–83.
 177. Schmiedt RA. Acoustic injury and the physiology of hearing. *J Acoust Soc Am*. 1984 Nov;76(5):1293–317.
 178. Li J, Verkman AS. Impaired hearing in mice lacking aquaporin-4 water channels. *J Biol Chem*. 2001 Aug;276(33):31233–7.
 179. Li S, Price SM, Cahill H, Ryugo DK, Shen MM, Xiang M. Hearing loss caused by progressive degeneration of cochlear hair cells in mice deficient for the *Barhl1* homeobox gene. *Development*. 2002 Jul;129(14):3523–32.
 180. Beisel KW, Nelson NC, Delimont DC, Fritsch B. Longitudinal gradients of KCNQ4 expression in spiral ganglion and cochlear hair cells correlate with progressive hearing loss in *DFNA2*. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000 Oct;82(1–2):137–49.
 181. Fariñas I, Jones KR, Tessarollo L, Vigers AJ, Huang E, Kirstein M, et al. Spatial shaping of cochlear innervation by temporally regulated neurotrophin expression. *J Neurosci*. 2001 Aug;21(16):6170–80.
 182. Dallos P. The active cochlea. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1992; 12:4575–

-
4585. Hear Res. Author manuscript; available in PMC 2017 February 01.
183. Schmiedt RA, Zwislocki JJ, Hamernik RP. Effects of hair cell lesions on responses of cochlear nerve fibers. I. Lesions, tuning curves, two-tone inhibition, and responses to trapezoidal-wave patterns. *J Neurophysiol.* 1980 May;43(5):1367–89.
184. Hamernik RP, Henderson D, Salvi R. New perspectives on noise-induced hearing loss. Lippincott Williams & Wilkins; 1982.
185. Canlon B, Borg E, Flock Å. Protection against noise trauma by pre-exposure to a low level acoustic stimulus. *Hear Res.* 1988;34(2):197–200.
186. Zheng XY, Henderson D, McFadden SL, Hu BH. The role of the cochlear efferent system in acquired resistance to noise-induced hearing loss. *Hear Res.* 1997 Feb;104(1–2):191–203.
187. Ohlemiller KK, Rybak Rice ME, Rellinger EA, Ortmann AJ. Divergence of noise vulnerability in cochleae of young CBA/J and CBA/CAJ mice. *Hear Res.* 2011 Feb;272(1–2):13–20.
188. Henry KR. Hyperthermia exacerbates and hypothermia protects from noise-induced threshold elevation of the cochlear nerve envelope response in the C57BL/6J mouse. *Hear Res.* 2003 May;179(1–2):88–96.
189. Johnson KR, Longo-Guess C, Gagnon LH, Yu H, Zheng QY. A locus on distal chromosome 11 (ahl8) and its interaction with Cdh23 ahl underlie the early onset, age-related hearing loss of DBA/2J mice. *Genomics.* 2008 Oct;92(4):219–25.
190. Ruben RJ. Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses. *Acta Otolaryngol.* 1967;Suppl 220:1-44.
191. Mann ZF, Kelley MW. Development of tonotopy in the auditory periphery. *Hear Res.* 2011 Jun;276(1–2):2–15.
192. Davis RL. Gradients of neurotrophins, ion channels, and tuning in the cochlea. *Neurosci a Rev J bringing Neurobiol Neurol psychiatry.* 2003 Oct;9(5):311–6.

-
193. Son EJ, Wu L, Yoon H, Kim S, Choi JY, Bok J. Developmental gene expression profiling along the tonotopic axis of the mouse cochlea. *PLoS One*. 2012;7(7):e40735.
 194. Bonnet C, Louha M, Loundon N, Michalski N, Verpy E, Smaghe L, et al. Biallelic nonsense mutations in the otogelin-like gene (OTOGL) in a child affected by mild to moderate hearing impairment. *Gene*. 2013 Sep;527(2):537–40.
 195. Ishibashi K, Suzuki M, Sasaki S, Imai M. Identification of a new multigene four-transmembrane family (MS4A) related to CD20, HTm4 and beta subunit of the high-affinity IgE receptor. *Gene*. 2001 Feb;264(1):87–93.
 196. Mamczur P, Sok AJ, Rzechonek A, Rakus D. Cell cycle-dependent expression and subcellular localization of fructose 1,6-bisphosphatase. *Histochem Cell Biol*. 2012 Jan;137(1):121–36.
 197. Bánfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause K-H. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem*. 2004 Oct;279(44):46065–72.
 198. Buchner DA, Nadeau JH. Contrasting genetic architectures in different mouse reference populations used for studying complex traits. *Genome Res*. 2015 Jun;25(6):775–91.
 199. Dulon D, Papal S, Patni P, Cortese M, Vincent PF, Tertrais M, et al. Clarin-1 gene transfer rescues auditory synaptopathy in model of Usher syndrome. *J Clin Invest*. 2018 Aug;128(8):3382–401.
 200. Michalski N, Goutman JD, Auclair SM, Boutet de Monvel J, Tertrais M, Emptoz A, et al. Otoferlin acts as a Ca(2+) sensor for vesicle fusion and vesicle pool replenishment at auditory hair cell ribbon synapses. *Elife*. 2017 Nov;6.
 201. Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci*. 1994 Sep;14(9):5559–69.

-
202. Nouvian R, Beutner D, Parsons TD, Moser T. Structure and function of the hair cell ribbon synapse. *J Membr Biol.* 2006;209(2–3):153–65.
 203. Puel JL, Saffiedine S, Gervais d’Aldin C, Eybalin M, Pujol R. Synaptic regeneration and functional recovery after excitotoxic injury in the guinea pig cochlea. *C R Acad Sci III.* 1995 Jan;318(1):67–75.
 204. Xu Y, Cao B, Chen Y, Ou R, Wei Q, Yang J, et al. SLC1A2 rs3794087 are associated with susceptibility to Parkinson’s disease, but not essential tremor, amyotrophic lateral sclerosis or multiple system atrophy in a Chinese population. *J Neurol Sci.* 2016 Jun;365:96–100.
 205. Puel JL, Ruel J, Gervais d’Aldin C, Pujol R. Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss. *Neuroreport.* 1998 Jun;9(9):2109–14.
 206. Ruel J, Wang J, Rebillard G, Eybalin M, Lloyd R, Pujol R, et al. Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hear Res.* 2007 May;227(1–2):19–27.
 207. Gjørland MD, Nielsen J, Pankratova S, Li S, Korshunova I, Bock E, et al. Neuroligin-1 induces neurite outgrowth through interaction with neurexin-1 β and activation of fibroblast growth factor receptor-1. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2012 Oct;26(10):4174–86.
 208. Wang S, Ibrahim LA, Kim YJ, Gibson DA, Leung HC, Yuan W, et al. Slit/Robo signaling mediates spatial positioning of spiral ganglion neurons during development of cochlear innervation. *J Neurosci.* 2013 Jul;33(30):12242–54.
 209. Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, Jagla W, et al. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev.* 2004 Mar;18(5):486–91.
 210. Thomas D. Methods for investigating gene-environment interactions in candidate pathway and genome-wide association studies. *Annu Rev Public Health.* 2010;31:21–36.

211. Thomas D. Gene–environment-wide association studies: emerging approaches. *Nat Rev Genet.* 2010;11(4):259–72.
212. Vázquez AE, Jimenez AM, Martin GK, Luebke AE, Lonsbury-Martin BL. Evaluating cochlear function and the effects of noise exposure in the B6.CAST+Ahl mouse with distortion product otoacoustic emissions. *Hear Res.* 2004 Aug;194(1–2):87–96.
213. Li HS. Genetic influences on susceptibility of the auditory system to aging and environmental factors. *Scand Audiol Suppl.* 1992;36:1–39.
214. Harding GW, Bohne BA, Vos JD. The effect of an age-related hearing loss gene (Ahl) on noise-induced hearing loss and cochlear damage from low-frequency noise. *Hear Res.* 2005 Jun;204(1–2):90–100.
215. Ganss B, Teo W, Chen H, Poon T. Krox-26 is a novel C2H2 zinc finger transcription factor expressed in developing dental and osteogenic tissues. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2–3):161–6.
216. Zhang X, Firestein S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci.* 2002 Feb;5(2):124–33.