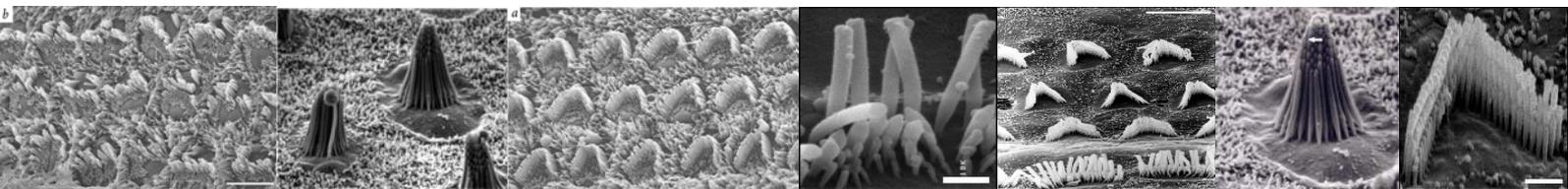




FACULDADE · DE · CIÊNCIAS UNIVERSIDADE · DE · LISBOA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

IDENTIFICAÇÃO DE FACTORES GENÉTICOS SUBJACENTES À SUSCEPTIBILIDADE À SURDEZ INDUZIDA PELO RUÍDO



Nádia Grangeon Cavaleiro de Sousa Correia

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2007



FACULDADE · DE · CIÊNCIAS | UNIVERSIDADE · DE · LISBOA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

IDENTIFICAÇÃO DE FACTORES GENÉTICOS SUBJACENTES À SUSCEPTIBILIDADE À SURDEZ INDUZIDA PELO RUÍDO

Nádia Grangeon Cavaleiro de Sousa Correia

O trabalho experimental conducente a esta dissertação foi realizado no Centro de Genética e Biologia Molecular, sob a orientação da Prof^ª. Doutora Graça Fialho, Investigadora do CGBM e Prof^ª. Auxiliar da FCUL, e do Prof. Doutor Pedro Silva, Prof. Auxiliar da FCUL, tendo dado origem a uma comunicação/publicação num encontro científico internacional e a uma comunicação/publicação num encontro científico nacional.

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2007

À minha avó Elsa e ao meu avô Luís!

Aos meus orientadores de mestrado,

Aos meus colegas de grupo,

Aos meus amigos,

À minha família,

Ao meu namorado,

Não encontro palavras suficientes para exprimir a minha gratidão pelo apoio que me
prestaram!

Porque “nenhum Homem é uma ilha”,

Muito Obrigada!

Índice Geral

| | |
|--|------|
| Índice Geral..... | V |
| Índice de Tabelas..... | VI |
| Índice de Figuras..... | VII |
| Siglas, Abreviaturas e Unidades..... | VIII |
| Agradecimentos..... | IX |
| Resumo..... | X |
| Abstract..... | XI |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. NOISE INDUCED HEARING LOSS – NIHL..... | 2 |
| 1.2. EFEITO DO RUÍDO SOBRE O APARELHO AUDITIVO..... | 2 |
| 1.3. SUSCEPTIBILIDADE À SURDEZ INDUZIDA PELO RUÍDO..... | 4 |
| 1.3.1. GENES CANDIDATOS..... | 6 |
| 1.3.1.1. CANAIS DE POTÁSSIO..... | 6 |
| 1.3.1.2. OTOCADERINA..... | 7 |
| 1.4. OBJECTIVO..... | 9 |
| 2. MÉTODOS..... | 10 |
| 2.1. Caracterização da amostra..... | 11 |
| 2.2. Selecção da amostra de estudo..... | 12 |
| 2.3. Selecção de SNPs (single-nucleotide polymorphisms) e genotipagem..... | 14 |
| 2.3.1. Extracção de DNA genómico..... | 15 |
| 2.3.1.1. Extracção de sangue..... | 15 |
| 2.3.1.2. Extracção de DNA..... | 16 |
| 2.3.1.3. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)..... | 16 |
| 2.3.1.4. Purificação e sequenciação de produtos de PCR..... | 18 |
| 2.4. Análise estatística..... | 19 |
| 3. RESULTADOS..... | 20 |
| 3.1. Caracterização da população em estudo..... | 21 |
| 3.2. Frequência de SNPs no gene KCNE1..... | 21 |
| 3.3. Frequência de SNPs no gene CDH23..... | 22 |
| 3.4. Análise de Haplótipos..... | 23 |
| 3.5. Análise de Regressão..... | 24 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 25 |
| 5. BIBLIOGRAFIA..... | 33 |
| 6. ANEXOS..... | 36 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – SNPs analisados no gene <i>KCNE1</i> [30];..... | 15 |
| Tabela 2 – SNPs analisados no gene <i>CDH23</i> [30]; | 15 |
| Tabela 3 – Sequências dos <i>primers</i> usados para cada fragmento do gene <i>CDH23</i> | 17 |
| Tabela 4 – Sequências dos <i>primers</i> usados para cada fragmento do gene <i>KCNE1</i> | 18 |
| Tabela 5 – Caracterização dos indivíduos resistentes e susceptíveis ao ruído..... | 21 |
| Tabela 6 – Diferenças nas frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do exão 50 do gene <i>CDH23</i> para o grupo susceptível <i>versus</i> grupo resistente..... | 23 |
| Tabela 7 – Análise de haplótipos dos SNPs que se encontram em LD..... | 24 |
| Tabela 8 – Diferenças nas frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do gene <i>KCNE1</i> para o grupo de indivíduos susceptíveis <i>versus</i> indivíduos resistentes ao ruído..... | 38 |
| Tabela 9 – Diferenças nas frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do exão 7 do gene <i>CDH23</i> para o grupo de indivíduos susceptíveis <i>versus</i> indivíduos resistentes ao ruído..... | 39 |
| Tabela 10 – Diferenças nas frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do exão 38 do gene <i>CDH23</i> para o grupo de indivíduos susceptíveis <i>versus</i> indivíduos resistentes ao ruído..... | 39 |
| Tabela 11 – H europa: Valores de heterozigotia para os SNPs do gene <i>CDH23</i> da população europeia [30]; H actual: valores de heterozigotia determinados neste estudo. | 40 |
| Tabela 12 – Resultados da regressão logística bivariada. | 42 |
| Tabela 13 – Resultados da regressão logística multivariada..... | 42 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Representação esquemática da via de reciclagem do íão potássio (setas) das células ciliadas dentro do órgão de Corti de volta para a endolinfa. | 7 |
| Figura 2 – Representação esquemática das interações entre a otocaderina, a miosina VIIa e a harmonina b, que mantêm a coesão entre estereocílios em crescimento. | 8 |
| Figura 3 – Electroforetogramas das variantes encontradas de novo no gene <i>KCNE1</i> | 37 |
| Figura 4 – Electroforetogramas dos genótipos encontrados para os SNPs do gene <i>CDH23</i> para os quais se obteve valores-p significativos. | 37 |
| Figura 5 – Alinhamento múltiplo de sequências proteicas de <i>KCNE1</i> de várias espécies, evidenciando a conservação dos resíduos de aminoácido [36]. | 41 |
| Figura 6 – Alinhamento múltiplo de sequências proteicas de <i>CDH23</i> de várias espécies, evidenciando a conservação dos resíduos de aminoácido. | 41 |

Siglas, Abreviaturas e Unidades

a.a. – Resíduo de aminoácido
AHL – *Age-related Hearing Loss* (perda auditiva relacionada com a idade)
bp – Pares de bases
°C – Grau Celsius
dB – Decibel
dB(A) – Decibel A (com ponderação do filtro A)
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – Desoxirribonucleótido
dp – Desvio-padrão
EC – Domínios extracelulares de caderina
EDTA – Etilodiaminotetracetato
g – Grama
h – Hora
H – Heterozigotia
HTL – *Hearing Threshold Level* (nível do limiar auditivo)
HTLA – *Hearing Threshold Level Associated with Age* (nível do limiar auditivo relacionado com a idade)
H₂Oup – Água ultrapura
Hz – Hertz
ISO – International Standard Organization
K⁺ – Ião potássio
Kb – Kilobase
ℓ – Litro
LD – Desequilíbrio de *Linkage*
LQTS – *Long QT Syndrome* (Síndrome do QT Longo)
Na⁺ – Ião sódio
N.D. – Não definido
NIHL – *Noise Induced Hearing Loss* (perda auditiva induzida pelo ruído)
NIOSH – National Institute for Occupational Safety and Health
NIPTS – *Noise Induced Permanent Threshold Shift* (alteração permanente dos limiares auditivos induzida pelo ruído)
OR – Odds Ratio
PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)
PTS – *Permanent Threshold Shift* (deslocamento permanente dos limiares auditivos)
SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*
TBE – Tris-Borato-EDTA
T_m – Temperatura de *melting*
U – Unidade de enzima de restrição
V – Volt

Agradecimentos

Este trabalho só foi possível graças à colaboração dos trabalhadores e responsáveis da *COELIMA*, em particular a Directora dos Recursos Humanos Dr.^a Emília Azevedo, bem como a equipa médica e de enfermagem do Posto de Medicina do Trabalho.

Também quero destacar o apoio dado à análise estatística pelas Prof.^{as} Antónia Turkman, Marília Antunes e Valeska Andreozzi, do Departamento de Estatística e Investigação Operacional da FCUL, bem como ao Prof. Manuel Carmo Gomes, do Departamento de Biologia Vegetal da FCUL.

Finalmente, a análise de haplótipos foi efectuada no laboratório da Dr.^a Astrid Vicente no INSARJ, com a colaboração da Dr.^a Marta Barreto e Catarina Correia.

A todos, os meus sinceros agradecimentos!

No presente trabalho procurou-se identificar factores genéticos de susceptibilidade à surdez induzida pelo ruído, na população portuguesa. Para esse efeito investigou-se a contribuição de alguns polimorfismos localizados em dois genes candidatos para a NIHL (*Noise Induced Hearing Loss*), através da análise de uma população de trabalhadores portugueses sujeitos a ruído na sua actividade profissional. Esta população foi dividida em indivíduos resistentes e indivíduos susceptíveis ao ruído, com base nos dados audiológicos, no número de anos de trabalho com exposição a ruído, no nível de ruído e na idade de cada trabalhador, com o objectivo de procurar diferenças estatisticamente significativas entre as frequências dos vários SNPs.

A escolha dos genes candidatos – *KCNE1* e *CDH23* – baseou-se em estudos similares cujas conclusões apontam para a influência de determinados polimorfismos na NIHL. Assim, comparou-se a frequência de cinco SNPs não sinónimos no gene *KCNE1* e de cinco SNPs não sinónimos, três SNPs intrónicos e um SNP sinónimo no gene *CDH23*, nos dois grupos populacionais definidos: indivíduos resistentes *versus* indivíduos susceptíveis à exposição a ruído.

A surdez induzida pelo ruído é uma doença complexa e multifactorial com grande heterogeneidade fenotípica e uma variabilidade inter-individual considerável. Se muito já é sabido sobre os factores ambientais, o conhecimento actual sobre os factores genéticos responsáveis pela NIHL é ainda escasso. A sua identificação terá consequências práticas que passam por uma melhor protecção dos trabalhadores geneticamente predispostos, pelo desenvolvimento de métodos de vigilância e prevenção relativamente à surdez ocupacional e de terapias adequadas, que terão um impacto determinante na saúde dos trabalhadores expostos.

Neste estudo piloto não foi possível encontrar uma clara associação genética entre variantes dos genes *CDH23* e *KCNE1* e a NIHL. No entanto, a associação observada para os SNPs do exão 50 do gene *CDH23*, quando analisados individualmente, constitui uma pista importante a ter em consideração em estudos posteriores com uma população mais alargada.

Palavras-chave: NIHL; *KCNE1*; *CDH23*; resistência ao ruído; susceptibilidade ao ruído; SNPs

The present study represents a first contribution for the identification of the genetic factors implied in the susceptibility to noise induced hearing loss. The relevance of some polymorphisms in two candidates genes for NIHL (Noise Induced Hearing Loss) was investigated through the analysis of a population of Portuguese workers exposed to noise in their professional activity. This population was grouped in noise-resistant and noise-susceptible individuals, on the basis of in the audiological data, the number of years of noise exposure at work, the level of noise and the age of each worker, to identify significant differences between the frequencies of the some SNPs.

The choice of the candidates genes - *KCNE1* and *CDH23* - was based on similar studies whose conclusions point out the influence of some polymorphisms in the NIHL. Thus, the frequency of five non-synonymous SNPs on gene *KCNE1* and five non-synonymous SNPs, three intronic and one synonymous SNP on gene *CDH23* were compared between the two defined population groups: noise-resistant versus noise-susceptible individuals.

Noise induced hearing loss is a complex and multifactorial disease with great phenotypic heterogeneity and considerable inter-individual variability. If much already is known about the environmental factors, the current knowledge on the genetic factors responsible for NIHL is still limited. Its identification will have practical consequences as one better protection of the genetically predisposed workers, as well as the development of methods of monitoring and prevention as concerns occupational deafness and the development of adequate therapies, which will have a crucial impact in the health and welfare of the exposed workers.

Through this pilot study on a population of Portuguese workers, it was not possible to identify a clear genetic association between variants of genes *CDH23* and *KCNE1* and NIHL. However, the association observed for the SNPs of *CDH23* exon 50, when individually analyzed, might represent a promising indication and should be taken into consideration in future studies with a larger population sample.

Keywords: NIHL; *KCNE1*; *CDH23*; noise-resistant; noise-susceptible; SNPs

1. INTRODUÇÃO

1.1. NOISE INDUCED HEARING LOSS – NIHL

O acrónimo “NIHL” (*Noise Induced Hearing Loss*) é normalmente empregue para designar perdas auditivas originadas exclusivamente pela exposição ao ruído, também denominadas de surdez sonotraumática, distinguindo-a assim das perdas de audição devido à idade (presbiacúsia) ou a outros factores [1].

A exposição ao ruído por motivos laborais ou de lazer é a causa mais frequente de surdez sensorineural adquirida na população adulta, a seguir à presbiacúsia [2;4]. O Instituto Americano para a Segurança e a Saúde no Trabalho (NIOSH) estima que mais de 30 milhões de trabalhadores (quase 1 em 10) estão expostos ao ruído no local de trabalho [2;5]. De acordo com o Livro Verde da União Europeia para a Futura Política relativa ao Ruído, cerca de 20% da população europeia, aproximadamente 80 milhões de pessoas, está exposta a níveis de pressão sonora inaceitáveis, originando distúrbios no sono, irritações e outros efeitos adversos na saúde [1]. Na Europa calcula-se que 35 milhões de pessoas estejam em risco de desenvolver NIHL, sendo este fenómeno também frequente noutros países industrializados, como os Estados Unidos e o Japão, e em países de rápido crescimento industrial, como a Índia e a China [5]. Em 2002 foram diagnosticados 6673 casos de perda de audição devido a ruído laboral na Alemanha, sendo a doença laboral mais frequente neste país [3].

A exposição ocupacional ao ruído é assim uma das principais causas de doença profissional, a qual abrange a nível nacional cerca de 25% dos trabalhadores com incapacidade devida a doenças profissionais. Estima-se que em Portugal existam cerca de 783.000 trabalhadores expostos a níveis de pressão sonora superiores a 85dB(A), representando aproximadamente 15,7% da população activa total, usando como referência o 2º trimestre de 2001 [1].

A actual sociedade é caracterizada por muitas profissões em que a informação necessita ser transmitida/recebida directamente através do telefone ou auscultadores. Para tais profissões, uma audição adequada é uma necessidade absoluta. Para além disso, a perda auditiva crónica tem uma influência significativa na qualidade de vida social e familiar. Devido ao grande número de pessoas afectadas, a perda de audição causada por ruído representa um problema de saúde mundial sério, apesar do ritmo continuado do progresso científico [3]. Desta forma, a pesquisa sobre NIHL foi classificada como prioritária por várias organizações [4].

1.2. EFEITO DO RUÍDO SOBRE O APARELHO AUDITIVO

Em 1998 o NIOSH recomendou que o nível de exposição ao ruído relativo a um dia de trabalho de 8 horas (ou a 40 horas semanais) – $L_{Ex,8h}$ – fosse reduzido de 90 para 85dB(A) e

que dispositivos de protecção auditiva fossem usados para sons de intensidade igual ou superior a 85dB(A) [5]. A maioria dos países adoptou o filtro de ponderação A, que traduz aproximadamente a resposta do ouvido humano, e o princípio igual da energia para avaliar e limitar a exposição ao ruído [1;2;6].

Em Portugal, o valor de 85dB(A) é designado na legislação nacional como valor do nível de acção, sendo considerado, tal como na maioria dos países industrializados, o nível a partir do qual existe um risco significativo de danos no sistema auditivo [1;2;3]. Estatisticamente, os níveis de exposição entre 80-85dB(A) têm apenas uma pequena influência na audição a longo prazo. No entanto, são capazes de induzir deslocamentos dos limiares auditivos nas altas frequências em indivíduos considerados mais vulneráveis aos efeitos do ruído [2;3]. Presentemente, existem já alguns estudos cujas orientações vão no sentido de se alterar o nível de acção em termos ocupacionais para 80dB(A), sendo ainda desconhecido o impacto económico de tal medida [1].

A surdez induzida pelo ruído é uma perda auditiva sensorineural – isto é, devida a danos no ouvido interno – que se desenvolve ao longo dos anos de exposição ao ruído [2;3]. Embora se suponha ser simétrica, o ouvido esquerdo é de algum modo mais vulnerável e desenvolve mais perda auditiva do que o direito. Uma possível explicação para este fenómeno é a lateralidade humana (a maioria dos indivíduos é destro) [2;4].

O deslocamento permanente dos limiares auditivos (PTS) traduz-se numa diminuição da capacidade auditiva que é mais evidente em determinadas frequências, sendo visível no audiograma uma queda típica em forma de U ou em V aos 4kHz (ou mais rigorosamente aos 4096Hz), podendo em alguns indivíduos situar-se nos 3 e 6kHz [1;2]. Esta ocorrência deve-se fundamentalmente ao facto de a maior parte do ruído industrial apresentar um espectro de frequências entre 1500 e 3500Hz [1]. A diminuição da capacidade auditiva estende-se progressivamente a frequências mais baixas, acabando por afectar a percepção da palavra [1].

O risco de sofrer danos irreversíveis no ouvido interno aumenta com a amplitude e duração do ruído. Os estudos feitos com grandes grupos de indivíduos expostos a ruído industrial demonstraram que há uma evidente relação dose-efeito, o que permite uma previsão estatística razoável da perda auditiva média esperada [3;7]. Os danos provocados no ouvido interno podem resultar em perda auditiva temporária ou permanente. Os estudos clínicos e experimentais mostraram que a exposição ao ruído resulta sobretudo em lesões nas células ciliadas, sendo as células ciliadas externas particularmente vulneráveis. A ruptura da função das células ciliadas externas após exposição ao ruído resulta numa propagação menos amplificada das ondas sonoras, o que conduz a uma diminuição da sensibilidade do ouvido interno [3].

A lesão cóclear pode também resultar da descompensação metabólica, cuja consequência pode ser a apoptose celular no ouvido interno. O ruído de intensidade muito elevada pode levar à necrose imediata das células do ouvido interno. À parte dos danos puramente mecânicos devido a hiperestimulação acústica, a libertação do potássio da endolinfa, causada pela lesão, pode conduzir à intoxicação e morte de outras células sensoriais e nervosas. Para além do trauma mecânico, o aumento na actividade causada pela estimulação excessiva pode resultar numa resposta metabólica ao stress. Desta forma existem duas estratégias de intervenção, isto é, a redução física da energia do som que alcança o ouvido e a alteração farmacológica da resposta celular ao stress [3].

1.3. SUSCEPTIBILIDADE À SURDEZ INDUZIDA PELO RUÍDO

A surdez sonotraumática é um distúrbio auditivo complexo, influenciado por factores ambientais e genéticos, donde o deslocamento dos limiares auditivos vai depender da interacção entre esses factores. Como tal, existe uma variabilidade inter-individual considerável [2;4;8].

A susceptibilidade ou vulnerabilidade individual ao ruído, assim como o grau de perda auditiva, variam grandemente entre diferentes pessoas [2;3], o que significa que após a mesma exposição ao ruído, algumas pessoas desenvolvem uma perda auditiva substancial, enquanto que outras desenvolvem pouca ou nenhuma. Uma outra definição de vulnerabilidade ao ruído diz que os indivíduos vulneráveis experimentam o trauma acústico abaixo dos níveis de exposição do ruído classificados como sendo perigosos para a audição [2].

Para além dos factores ambientais bem conhecidos que contribuem para a NIHL, tais como o nível contínuo de exposição ao ruído e os anos da exposição, existem outros que têm alguma influência. Estes incluem a exposição ao ruído impulsivo, que é mais prejudicial do que o ruído contínuo no nível equivalente; a existência e duração dos intervalos entre a exposição (as intermitências na exposição de ruído permitem a recuperação); as exposições não ocupacionais (música elevada, ferramentas ruidosas, armas de fogo) [2;3;8]; as exposições ocupacionais a determinados produtos químicos (solventes orgânicos, metais pesados e pesticidas); a co-exposição ao ruído e à vibração [8]; a ingestão de drogas ototóxicas (aminoglicósidos, quinino e outros), a temperatura e o consumo de tabaco [1;2;9].

O papel de diversos factores biológicos foi também estudado. Foi assim encontrada uma associação entre a NIHL e a pressão arterial elevada, o nível elevado de colesterol [8], o género (as mulheres são menos susceptíveis), a idade (efeito crescente da presbiacusia com a idade), e a cor dos olhos (os indivíduos de olhos azuis parecem ser mais susceptíveis à NIHL do que os indivíduos com níveis mais elevados de melanina nos olhos) [2].

Contrastando com o muito que se sabe sobre os factores ambientais, é ainda bastante limitado o conhecimento sobre os factores genéticos responsáveis pela NIHL [10]. Para prosseguir com estudos sobre a base genética da NIHL, é necessário que grandes populações de indivíduos susceptíveis e resistentes à surdez induzida pelo ruído sejam analisadas para polimorfismos em genes candidatos [2].

Uma recente directiva comunitária europeia expõe a necessidade de considerar a história familiar na NIHL, ou seja, o possível papel de factores genéticos. Desta forma, o uso alargado de bases de dados mais completas deverá ser encorajado. Na Europa há uma necessidade urgente de pesquisa e investimento económico no campo da surdez hereditária, incluindo a susceptibilidade à surdez induzida pelo ruído [10].

A identificação destes factores genéticos terá consequências importantes e práticas. Por exemplo, os trabalhadores geneticamente predispostos deverão ser mais protegidos em relação ao ruído, tendo em conta o que é exigido pela legislação actual, cuja referência é uma população normal de trabalhadores [7]. Uma avaliação correcta do papel dos factores genéticos e/ou ambientais que actuam em cada indivíduo poderá facilitar a identificação de trabalhadores em risco e contribuir para a implementação de medidas de prevenção e controlo adicionais [10].

Teoricamente, qualquer alelo que enfraqueça a estrutura ou funcionalidade do ouvido pode torná-lo mais susceptível a danos provocados pelo ruído [11]. Até à data, foram identificados, em diferentes estirpes de ratos, três *loci* que contribuem para a NIHL, dez *loci* que contribuem para a perda auditiva relacionada com a idade (*age-related hearing loss - AHL*) e seis *loci* que estão implicados em ambos os tipos de surdez [10].

Os dados experimentais obtidos em ratos têm sido confirmados em humanos. Yang *et al* [12] executaram um estudo epidemiológico em 194 trabalhadores chineses expostos a ruído laboral. Os indivíduos foram divididos em dois grupos (susceptíveis e resistentes ao ruído) de acordo com os dados audiométricos. Os resultados da análise genética parecem demonstrar que certos polimorfismos no gene da caderina 23 (*CDH23*) têm um papel importante na vulnerabilidade ao ruído. Os indivíduos com o genótipo CC no SNP rs1227049, TT no SNP rs3802711 e GG na posição terminal do exão 7 são mais susceptíveis à NIHL, segundo este estudo. Van Laer *et al* [4] levaram a cabo um estudo caso-controlo usando 35 SNPs seleccionados em dez genes candidatos, numa população de trabalhadores suecos expostos a ruído ocupacional. As frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas para três SNPs do gene *KCNE1*, as frequências alélicas para um SNP do gene *KCNQ1* e um SNP do gene *KCNQ4*, mostraram ser significativamente diferentes entre indivíduos resistentes e vulneráveis [4]. As associações observadas sugerem que os genes envolvidos na via de reciclagem de potássio na cóclea podem ter um papel importante na susceptibilidade à NIHL [10].

1.3.1. GENES CANDIDATOS

1.3.1.1. OS GENES *KCNE* E OS CANAIS DE POTÁSSIO

O gene *KCNE1* codifica uma proteína de 129 resíduos de aminoácido (minK ou KCNE1), uma subunidade β ou subunidade acessória cuja função é modular a actividade dos canais de K^+ dependentes de voltagem em vários órgãos, nomeadamente no coração e na cóclea. Para formar um canal de potássio funcional, esta proteína transmembranar é expressa conjuntamente com uma subunidade α , geralmente KCNQ1, codificada pelo gene *KCNQ1*. Estas proteínas, denominadas acessórias, com um único domínio transmembranar e incapazes de formar canais quando expressas sozinhas, são certamente importantes na definição das características dos canais nativos, em particular dos canais KCNQ1 [13]. No ouvido interno, os canais KCNE1/KCNQ1 estão presentes na membrana celular apical das células marginais, na estria vascular, onde desempenham a importante função de assegurar a homeostasia do ião K^+ . A perda da funcionalidade destes canais conduz a uma redução do potencial da endolinfa, o que pode originar perda auditiva [13;14]. As mutações em *KCNE1* são também responsáveis pelo prolongamento do potencial de acção no coração, o que conduz a um incremento do intervalo QT, visível em electrocardiograma, e a uma doença cardíaca conhecida como síndrome do QT longo (LQTS), associado ou não à perda de audição bilateral severa [15].

A associação com KCNE1 aumenta a dependência da voltagem e a amplitude da corrente de KCNQ1, retarda a cinética da activação e altera as propriedades farmacológicas do canal [13;15;16;17]. Inversamente, canais compostos apenas por KCNQ1 não podem executar uma ou outra função porque abrem e fecham demasiado depressa para manter o ritmo do coração e estão significativamente inactivos no potencial estacionário da membrana das células do ouvido interno [17]. Assim, a proteína KCNE1 é essencial para a correcta localização e função de KCNQ1 no ouvido interno [16].

Os canais de KCNQ1 têm um papel diferente na cóclea relativamente ao coração, dado que fazem parte do circuito de reciclagem de iões K^+ . A endolinfa contida na rampa média é um fluido extracelular ionicamente semelhante ao meio intracelular, tendo elevada concentração de K^+ (150mmol/l) e baixa concentração de Na^+ (4mmol/l), estabelecendo deste modo um potencial muito positivo de aproximadamente 80mV em relação a perilinfa [13;16]. Este potencial é crucial para a transdução de sinal das células ciliadas para o canal cóclear. Durante a estimulação auditiva, os iões K^+ movem-se da endolinfa para as células ciliadas externas. Depois os iões saem pela porção basal das células, possivelmente através dos canais compostos por KCNQ4, e migram através das células de suporte e dos fibrócitos até à estria vascular usando uma rede de junções comunicantes. Os canais de potássio nas células marginais da estria vascular são compostos pelas proteínas KCNQ1/KCNE1 e

permitem o retorno dos iões K^+ à endolinfa (Figura 1). Qualquer redução no gradiente de concentração de K^+ leva a uma redução do potencial da endolinfa, o que conduz a uma redução da sensibilidade ao estímulo auditivo. Nas células marginais do epitélio vestibular ocorre um processo semelhante, pelo que mutações em *KCNQ1* e *KCNE1* provocam surdez e distúrbios vestibulares [13]. A importância da via de reciclagem do potássio no ouvido interno é claramente ilustrada pelo facto de que mutações em genes envolvidos neste processo conduzem a surdez síndrômica (genes *GJB2*, *GJB3*, *KCNE1* e *KCNQ4*) ou não síndrômica (*GJB2*, *GJB3*, *GJB6* e *KCNQ4*) [13].

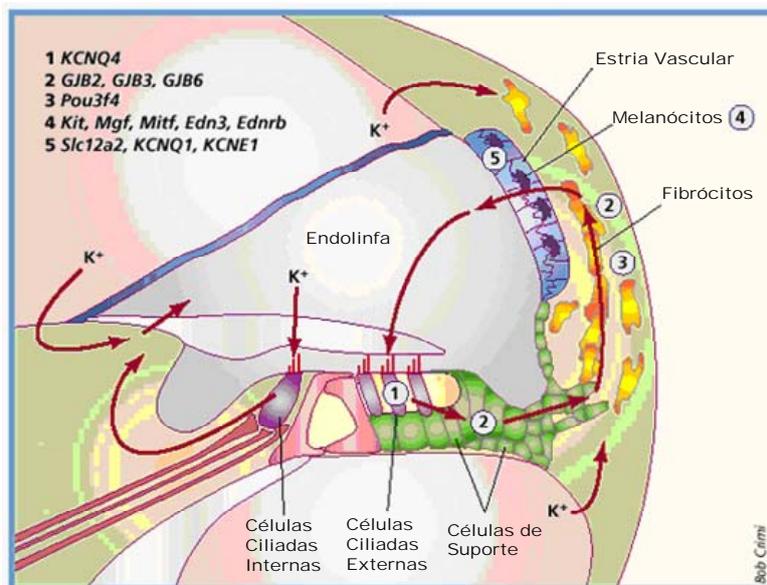


Figura 1 – Representação esquemática da via de reciclagem do ião potássio (setas) das células ciliadas dentro do órgão de Corti de volta para a endolinfa. Os números assinalam o local de expressão dos genes correspondentes. Imagem adaptada de http://www.nature.com/ng/journal/v27/n2/fig_tab/ng0201_143_F4.html

1.3.1.2. O GENE *CDH23* E A OTOCADERINA

As caderinas são proteínas dependentes de cálcio que permitem a adesão entre células do mesmo tipo, permitindo a formação de tecidos. Na cóclea, as otcaderinas estão localizadas nos estereocílios das células ciliadas externas, mantendo-os juntos [10]. O gene *CDH23* tem 69 exões e codifica a caderina 23 ou otcaderina, uma proteína com 3.354 resíduos de aminoácido, 27 repetições extracelulares (EC), um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático. A maioria das mutações no gene *CDH23* ocorre na região que codifica os 27 domínios extracelulares (EC) de caderina, a maioria dos quais contém os motivos característicos de ligação a iões cálcio (DXD, DRE e DXNDN) [18;19].

Os domínios EC têm como função a adesão, através da dimerização dependente de cálcio, tanto na orientação paralela como na antiparalela [20]. Os domínios intracelular e transmembranar da caderina 23 interagem, hipoteticamente, com o núcleo de actina dos estereocílios através de proteínas intermediárias como a harmonina b [11]. Pensa-se que a proteína miosina VIIa dirige a harmonina b para a sua localização nos estereocílios, onde esta

vai ancorar a caderina 23 ao núcleo de filamentos de actina dos estereocílios em crescimento (Figura 2). Desta forma, pensa-se que a interacção precoce entre as três proteínas acima mencionadas seja crítica para a formação do estereocílio como uma unidade coerente [21]. Estudos fisiológicos em ratinhos mutados no gene para a caderina 23 sugerem que a caderina e a harmonina serão efectivamente componentes das várias ligações entre estereocílios. Vários estudos sobre a expressão do gene da caderina 23 apontam para a sua concentração ao longo de todo o estereocílio durante o desenvolvimento embrionário [22] e para a sua localização na região apical dos estereocílios em animais adultos [20; 23; 24; 25].

Foi demonstrado que o gene de *Ahl* (*age-related hearing loss*) presente em algumas estirpes de ratos e relacionado com a perda auditiva devido à idade, é na verdade um alelo do gene *CDH23*. Este alelo apresenta uma transição G→A no nucleótido 753 que dá origem a um novo local de *splicing*, ocorrendo um *splicing in frame* do exão 7 [26]. O exão 7 codifica para 43 aminoácidos que fazem parte do 3º e 4º domínios EC, que é um potencial local de dimerização. Aquela mutação leva à disfunção das propriedades adesivas do domínio EC da caderina, sem afectar o domínio transmembranar ou citoplasmático [20, 26]. Os resultados de um estudo em ratos [27] mostram que os animais heterozigóticos para uma mutação na caderina 23 estão mais predispostos a sofrer perda auditiva devido à exposição ao ruído. Este estudo fornece evidências para a existência de genes modificadores do gene *CDH23* ou de um alelo hipomórfico. A redução ou a falta da otocaderina enfraquece a célula e poderá permitir que os estereocílios sejam mais facilmente danificados pelo ruído ou pelo envelhecimento [1;11]. Um estudo recente em humanos mostra que o SNP 753 G>A no exão 7 do gene *CDH23* está associado com o AHL e com a susceptibilidade a NIHL [12;28].

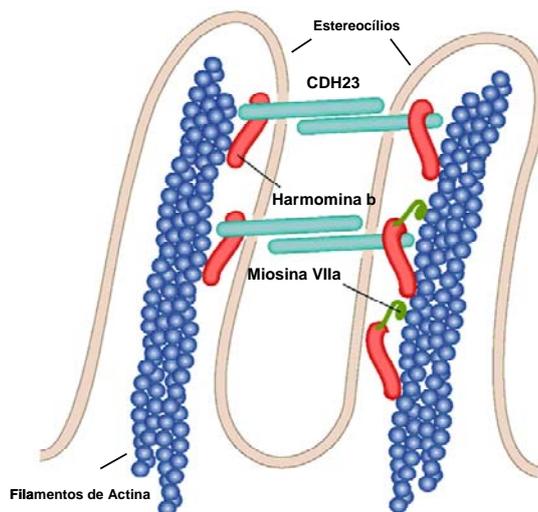


Figura 2 – Representação esquemática das interacções entre a otocaderina, a miosina VIIa e a harmonina b, que mantêm a coesão entre estereocílios em crescimento.

Adaptado de http://www.nature.com/embor/journal/v4/n3/fig_tab/embor775_f2.html

1.4. OBJECTIVO

Através deste trabalho pretendeu-se realizar um estudo piloto sobre factores genéticos implicados na susceptibilidade à surdez induzida pelo ruído, perspectivando a possível associação entre variantes de genes relevantes para o funcionamento do ouvido interno e a surdez induzida pelo ruído.

Tendo em vista este objectivo geral, pretende-se seleccionar e recolher uma amostra de indivíduos da população portuguesa expostos a ruído laboral nocivo; analisar os dados audiológicos e constituir dois grupos para estudo – indivíduos susceptíveis e resistentes ao ruído; genotipar polimorfismos os genes *KCNE1* e *CDH23*, preferencialmente em regiões codificantes; e comparar as frequências alélicas e genotípicas desses polimorfismos de forma a detectar diferenças significativas entre os indivíduos expostos e os não expostos ao ruído.

Os resultados obtidos neste estudo piloto poderão representar um incentivo para futuros estudos de susceptibilidade envolvendo outros genes ou outras populações e poderão contribuir para o desenvolvimento de métodos de vigilância e prevenção relativamente à exposição ao ruído e à surdez ocupacional.

2. MÉTODOS

2.1. Caracterização da amostra

Para este estudo piloto foi necessário seleccionar uma amostra populacional exposta a ruído ocupacional nocivo e constituir dois grupos para análise comparativa – o dos indivíduos susceptíveis e o dos indivíduos resistentes ao ruído. Para tal contou-se com a colaboração da empresa têxtil *COELIMA, Indústria Têxteis S.A.* Nesta fábrica os trabalhadores estão sujeitos a ruído entre 83 e 89dB(A), cujos níveis em cada posto de trabalho, determinados pela própria empresa, nos foram fornecidos. A *Coelima* foi escolhida devido à estabilidade dos seus trabalhadores, que começam a sua vida profissional desde que terminam os estudos e se mantêm na empresa durante muitos anos. Além disso, esta foi uma das primeiras empresas a implementar Serviços Sociais e a instalar um posto médico, pelo que possui dados actualizados sobre medições dos níveis de ruído e efectua testes audiológicos regulares aos seus trabalhadores.

No posto médico da *Coelima* foram entrevistados 184 trabalhadores de ambos os sexos, que, após preencherem uma declaração de consentimento informado, através da qual tomaram conhecimento do objectivo deste estudo, disponibilizaram material biológico para posterior extracção de DNA, necessário a este estudo. Para além disso, foi efectuado um inquérito para se obter informações sobre dados pessoais (nome, idade, contactos), sobre antecedentes clínicos que possam ter interferido com a audição (ocorrência de doenças do foro otológico, ingestão de drogas ototóxicas, ocorrência de infecções como rubéola, sarampo ou meningite, ocorrência de acidentes com traumatismo craniano ou outras observações relevantes), sobre a exposição actual ou anterior ao ruído a nível profissional (quantos anos, quantas horas por dia e o nível de ruído), sobre a exposição ao ruído não profissional (durante o serviço militar, a prática de desportos motorizados, a utilização de ferramentas ruidosas, o uso de auscultadores ou durante a frequência de discotecas e/ou concertos) e ainda sobre o uso de protecção individual auditiva (se usa, que tipo e quantas horas por dia). Adicionalmente, em colaboração com os médicos do serviço de medicina de trabalho da *Coelima*, foram recolhidos dados audiométricos actuais de todos os trabalhadores, foi feita uma avaliação clínica da perda auditiva, no caso de esta existir, e foi ainda analisada a história familiar do indivíduo, isto é, foi registada a ocorrência de algum tipo de doença familiar (incluindo a surdez) e, quando justificado, foi esquematizada a árvore genealógica. Toda esta informação visa excluir quaisquer causas ambientais além do ruído, ou hereditárias, que possam conduzir a perda de audição. A cada indivíduo e à sua documentação foi atribuído um código de forma a manter a confidencialidade da sua informação pessoal.

Além desta amostra, no início deste estudo contou-se com a colaboração de 13 motoristas e abastecedores da empresa *BP Portugal* de Matosinhos, Aveiras do Aeroporto de Lisboa, e de oito técnicos com várias funções da empresa *Vanpro - Assentos, Lda* do Parque

Industrial da Autoeuropa, todos sujeitos a ruído laboral. No entanto, devido à reduzida homogeneidade de condições de trabalho destes indivíduos, devido à falta de dados importantes sobre a sua história clínica e profissional, e, sobretudo, devido a não ter sido possível alargar estas amostras populacionais em tempo oportuno, estes trabalhadores não foram objecto de estudo. O seu DNA foi, contudo, empregue para a optimização das condições de genotipagem (ver 2.3) e para a confirmação do valor de heterozigotia dos polimorfismos nos genes candidatos.

No início do trabalho, foram ainda utilizadas amostras de DNA de cerca de 50 indivíduos da população audiológicamente normal para se obter uma estimativa dos valores de heterozigotia para os polimorfismos no gene *KCNE1* na população portuguesa.

2.2. Selecção da amostra de estudo

De entre os 184 trabalhadores da *Coelima* que aceitaram participar neste estudo, os indivíduos que apresentavam surdez condutiva (devida a alterações no desenvolvimento do ouvido externo ou médio) ou mista (simultaneamente sensorineural e condutiva) foram excluídos. Para a avaliação da perda auditiva devida à exposição ao ruído foram analisados, por observação do audiograma mais recente, os limiares auditivos a 4kHz no ouvido esquerdo dos restantes 169 trabalhadores. Tal como foi referido, o ouvido esquerdo é geralmente o mais afectado pela exposição ao ruído, pelo que se pode assumir que, usando os dados deste ouvido, até danos menos severos serão detectados [2;4]. Neste conjunto, os indivíduos expostos a ruído laboral há menos de um ano foram excluídos, assim como aqueles que apresentavam uma diferença superior a 40dB entre os limiares auditivos do ouvido direito e esquerdo a 4kHz [2]. Foram ainda retirados do estudo os indivíduos com historial de traumatismo craniano, de doenças do foro otológico, de casos de surdez familiar, de exposição a ruído potencialmente prejudicial durante períodos de lazer ou durante o serviço militar ou de exposição a qualquer outro factor causador de perda auditiva que não o ruído, a menos que o seu audiograma fosse normal e o indivíduo fosse considerado resistente ao ruído. Finalmente, foram excluídos indivíduos com algum grau de parentesco. O objectivo foi excluir qualquer factor que não o ruído e assegurar que as perdas auditivas registadas se devem apenas a este, para se poder inferir sobre as causas genéticas da susceptibilidade.

Após esta triagem a amostra ficou constituída por 130 indivíduos, os quais foram organizados quanto ao nível de exposição ao ruído. Uma vez que estiveram expostos a diferentes níveis de ruído ocupacional durante diferentes períodos de tempo, o nível médio de exposição de cada trabalhador tendo em conta o tempo total de exposição ($L_{Ex,8h}$) foi determinado usando a seguinte fórmula [2]:

$$L_{Ex,8h} = 10 \log \left(\frac{1}{\sum_{i=1}^N T_i} \sum_{i=1}^N T_i \cdot 10^{0,1 L_{Ex,8h}} \right) \quad (1)$$

em que:

N – número total de intervalos de tempo, locais de trabalho ou profissões diferentes;

L_{Exi} – nível de pressão sonora contínuo equivalente ponderado A normalizado para um dia de trabalho de 8 horas de cada intervalo de tempo, local de trabalho ou profissão diferentes [1;2];

T_i – duração do intervalo de tempo i , em anos

De seguida, procedeu-se à classificação dos indivíduos em susceptíveis ou resistentes ao ruído. O modelo proposto pela norma ISO 1999 (International Organization for Standardization, 1990) [7] para a previsão dos efeitos do ruído nos limiares auditivos assume que o nível dos limiares auditivos (*hearing threshold level* – HTL) em decibéis, associado com o ruído e a idade, é uma combinação do nível dos limiares auditivos associado à idade (*hearing threshold level associated with age* – HTLA), com o deslocamento permanente dos limiares auditivos devido ao ruído (*noise-induced permanent threshold shift* – NIPTS) [2;7]:

$$HTL = HTLA + NIPTS - (HTLA * NIPTS)/120 \quad (2)$$

sendo que HTLA varia com a idade e o género.

A base de dados *A* do ISO 1999 descreve os limiares auditivos para uma população otologicamente normal que foi cuidadosamente avaliada para excluir qualquer ocorrência de patologia audiológica conhecida e qualquer exposição imprópria ao ruído. Desta forma, esta base de dados descreve apenas a perda auditiva devido à idade, sendo que outros factores foram excluídos tanto quanto possível. A base de dados *E* do mesmo documento descreve o deslocamento permanente dos limiares auditivos devido ao ruído em relação ao nível de ruído e ao tempo de exposição [7;29]. O NIPTS é função da frequência audiométrica, do tempo de exposição e do nível de ruído normalizado para um dia de trabalho de 8 horas. Para intervalos de tempo de exposição entre 10 e 40 anos, o valor médio de NIPTS, $N_{0,50}$ é dado por [7]:

$$N_{0,50} = [u + v \log (\Theta / \Theta_o)] (L_{Ex,8h} - L_o)^2 \quad (3)$$

em que:

L_o – nível de pressão sonora definido em função da frequência (Tabela 2 em ISO 1999); para 4kHz é 75dB;

θ – tempo de exposição, em anos;

θ_0 – um ano;

u e v – são dados em função da frequência (Tabela 2 em ISO1999); para 4kHz u e $v=0.025$ dB;

Assumindo o modelo ISO 1999, que prevê a distribuição dos HTL numa população exposta a ruído e a dependência quantitativa dos HTL com a idade e a exposição ao ruído, calculou-se a diferença (Δ) entre o HTL de cada indivíduo (HTL_m), determinado a partir do respectivo audiograma, e o HTL médio de uma população da mesma idade e exposição sonora ($HTL_{0,50}$, Fórmula 3). Assume-se que esta diferença é uma medida do estado do sistema audiológico de cada indivíduo [2]:

$$\Delta_{stand} = 1,282(HTL_m - HTL_{0,50}) / (HTL_{0,10} - HTL_{0,50}) \quad HTL_m \geq HTL_{0,50}$$

$$\Delta_{stand} = 1,282(HTL_m - HTL_{0,50}) / (HTL_{0,50} - HTL_{0,90}) \quad HTL_m \geq HTL_{0,50} \quad (4)$$

Quanto mais positiva esta diferença, mais susceptível é o indivíduo em relação ao ruído, enquanto os valores mais negativos reflectem uma maior resistência ao ruído. Desta forma é possível obter uma escala do estado auditivo que combina informação sobre os limiares auditivos, exposição ao ruído e idade [2]. Após calculados os valores individuais de Δ , foram excluídos indivíduos com valor positivo muito próximo de zero, que seriam considerados susceptíveis, de forma a incluir apenas os indivíduos mais susceptíveis. Deste modo, foram incluídos neste estudo 54 indivíduos susceptíveis (22 mulheres e 32 homens) e 51 indivíduos resistentes (16 mulheres e 35 homens).

2.3. Selecção de SNPs (*single-nucleotide polymorphisms*) e genotipagem

Os SNPs utilizados foram seleccionados da lista disponível na base de dados NCBI [30]. Foi dada preferência a SNPs que resultam na substituição de um resíduo de aminoácido (SNPs não sinónimos), em detrimento de SNPs intrónicos ou de SNPs sinónimos, dado que os primeiros, por originarem uma alteração na estrutura primária da proteína, podem influenciar a sua funcionalidade de um modo que tenha consequências na resistência aos danos mecânicos causados pelo ruído ou na eficiência de recuperação do sistema auditivo após exposição ao mesmo. Da base de dados referida foram também retiradas informações acerca do valor de heterozigotia para cada SNP para a população europeia, assim como da identidade dos alelos ancestrais.

No que diz respeito ao gene *KCNE1*, existe apenas um exão codificante amplificável num pequeno fragmento, pelo que foram considerados os cinco SNPs codificantes não sinónimos descritos até à data. Cerca de 50 indivíduos duma população audiológicamente normal foram sequenciados, de forma a estimar os valores de heterozigotia desses SNPs na população portuguesa.

Em relação ao gene *CDH23*, existem 69 exões codificantes, dos quais 13 continham SNPs codificantes descritos à data de início deste trabalho. Posteriormente foram adicionados mais SNPs à base de dados [30]. Na escolha de SNPs a analisar foi dada prioridade àqueles com maior valor de heterozigotia, aos que foram referidos em trabalhos anteriores como estando associados à susceptibilidade ao ruído [4;12] e ainda àqueles que se encontravam num mesmo exão. Deste modo, foram seleccionados cinco exões do gene da otocaderina, abrangendo nove SNPs, que foram sequenciados em cerca de 20 indivíduos de forma a estimar os respectivos valores de heterozigotia. Face aos resultados obtidos com esta sequenciação prévia e devido à impossibilidade técnica/logística de efectuar a sequenciação dos cinco exões, foram seleccionados três exões do gene *CDH23* (exão 7, 38 e 50) para prosseguir o estudo, abrangendo cinco SNPs codificantes não sinónimos, três intrónicos e um sinónimo.

Tabela 1 – SNPs analisados no gene *KCNE1* [30]; N.D. – não definido;

| SNP id | Heterozigotia [30] | Efeito | Alelo ancestral | Alteração nucleotídica | Alteração do a.a. | Posição no codão | Posição do a.a. |
|------------|--------------------|--------------|-----------------|------------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| rs17857111 | N.D. | Não sinónimo | G | G>A | Arg [R]>His [H] | 2 | 32 |
| rs1805127 | 0.533 | Não sinónimo | N.D. | G>A | Gly [G]>Ser [S] | 1 | 38 |
| rs17173509 | 0.003 | Não sinónimo | G | G>C | Gly [G]>Ala [A] | 2 | 52 |
| rs1805128 | 0.050 | Não sinónimo | G | G>A | Asp [D]>Asn [N] | 1 | 85 |
| rs17853625 | N.D. | Não sinónimo | C | C>A | Cys [C]>STOP | 3 | 106 |

Tabela 2 – SNPs analisados no gene *CDH23* [30]; N.D. – não definido;

| Exão | SNP id | Heterozigotia [30] | Efeito | Alelo ancestral | Alteração nucleotídica | Alteração do a.a. | Posição no codão | Posição do a.a. |
|------|------------|--------------------|--------------|-----------------|------------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| 7 | rs736717 | 0.05 | Intrónico | G | G>A | - | - | - |
| 7 | 753 G>A | N.D. | Sinónimo | G | G>A | Pro [P]>Pro [P] | 3 | 251 |
| 38 | rs7917781 | 0.566 | Intrónico | T | T>C | - | - | - |
| 38 | rs41281330 | N.D. | Não sinónimo | N.D. | G>A | Val [V]>Met [M] | 1 | 1620 |
| 38 | rs17712523 | 0.407 | Não sinónimo | G | G>A | Val [V]>Ile [I] | 1 | 1675 |
| 50 | rs4747193 | N.D. | Intrónico | G | G>A | - | - | - |
| 50 | rs4747194 | 0.500 | Não sinónimo | G | G>A | Arg [R]>Gln [Q] | 2 | 2358 |
| 50 | rs9663920 | 0.000 | Não sinónimo | G | G>A | Asp [D]>Asn [N] | 1 | 2376 |
| 50 | rs4747195 | 0.500 | Não sinónimo | C | C>T | Pro [P]>Leu [L] | 2 | 2380 |

2.3.1. Extracção de DNA genómico

2.3.1.1. Extracção de sangue

O sangue foi extraído com uma picada no dedo indicador, médio ou anelar dos voluntários, com uma lanceta Accu-Check Safe-T-Pro Plus (Roche Diagnostics). As gotas de sangue obtidas de cada indivíduo foram colocadas num cartão próprio (FTA Classic Cards - Whatman Bioscience Ltd.), destinados à extracção de DNA e ao armazenamento de sangue. Cada cartão FTA foi identificado com o código do dador.

2.3.1.2. Extracção de DNA

Cortou-se 1cm² da mancha de sangue do cartão FTA em pequenos pedaços de 2mm² e adicionou-se 500µl de tampão DLB (1ml Tris/HCL 1M pH 7,4; 0,2ml NaCl 5M; 2ml EDTA 0,5M pH 8,0; 96,8ml H₂O), 50µl de SDS 10% e 5µl de proteinase K (20mg/ml). De seguida incubou-se 12h a 56°C. Seguiu-se a adição de 20µl de NaCl 5M e 575µl da mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e misturou-se por inversão. Após uma centrifugação de 3 minutos a 12.000rpm, recuperou-se a fase superior e descartou-se a inferior. Depois adicionou-se 575µl da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e voltou-se a centrifugar. Recuperou-se a fase superior à qual se juntou 1ml de etanol a 96% armazenado a -20°C. Após uma incubação de 1h a -20°C, centrifugou-se 15 minutos a 12.000rpm a 4°C. De seguida descartou-se o etanol e secou-se o precipitado. Por último adicionou-se 100µl de água ultra-pura e incubou-se a 56°C durante 12 a 16h. Este método permite obter uma concentração de DNA de 50ng/µl.

O sucesso do processo de extracção foi confirmado pela visualização do DNA extraído por electroforese em gel de agarose (Invitrogen) 1% (p/v) em TBE 0,5×, tendo sido usado o marcador de pesos moleculares 1Kb Plus (Invitrogen). O DNA foi corado com brometo de etídio e fotografado com o sistema fotográfico EDAS 290 (Kodak Digital Science). As fotografias foram tratadas com o *software* específico Kodak 1D.

2.3.1.3. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

O método seleccionado para genotipagem dos SNPs dos genes candidatos foi a sequenciação, pelo que foram seleccionados *primers* adequados para amplificar a região dos genes que abrange os SNPs em estudo. A técnica de sequenciação é um método expedito e bastante fiável para a detecção e identificação de alterações em sequências nucleotídicas, prestando-se bem à genotipagem de SNPs.

Primeiramente procedeu-se à optimização das condições de amplificação, nomeadamente da mistura de reacção, da temperatura de *melting* (T_m) e do tempo de extensão. As sequências dos *primers* para os exões da caderina foram retiradas do trabalho de Boltz *et al* [19] e as sequências de *primers* para o *KCNE1* foram retiradas do trabalho de Van Laer *et al* [4]. Os *primers* foram testados em relação à formação de dímeros ou de *hairpins* com *software* adequado (Oligonucleotide Analyser e Gene Runner), e foi ainda efectuada uma pesquisa na base de dados BLAST [30] para ser assegurado que não emparelhavam com mais nenhuma região do genoma humano. Quando necessário, foram efectuadas alterações na sequência dos *primers* originais, nomeadamente, procurou-se que a extremidade 3'OH fosse um resíduo de guanina ou citosina, dado que as ligações entre estas bases são mais fortes. Procurou-se também que os *primers* tivessem um conteúdo G+C semelhante. A temperatura

de *melting* teórica foi calculada pela fórmula (5) e a partir desta obteve-se a temperatura de emparelhamento (menos 3 a 5°C da Tm média dos dois *primers*):

$$T_m (^\circ\text{C}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G + C) \quad (5)$$

Apesar de calculada a temperatura teórica de emparelhamento, ainda se procedeu a uma optimização das condições de amplificação, tendo-se usado para isso um termociclador Biometra T Gradient (Whatman®), que faz um gradiente de temperaturas ao longo do bloco. Assim foi possível seleccionar a temperatura de emparelhamento à qual ocorre a máxima amplificação sem ocorrência de amplificação inespecífica (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Sequências dos *primers* usados para cada fragmento do gene *CDH23* e as respectivas Tm. ■ – *primer forward*; ■ – *primer reverse*; ■ – SNPs; ■ – sequência codificante.

| Exão | Sequência dos <i>Primers</i> 5'-3' | Dimensão | Tm | SNPs | Sequência amplificada |
|------|---|----------|----|--|---|
| 7 | CCTTCCCTGCTGGAGTGCAAGAGCA GCTGTGCCAGAACAACACTCATCACTGG | 441 | 55 | rs736717 753G>A | TCCTTTTACTAAGC CCTTCCCTGCTGGAGTG CAAGAGCATGGGTGTGTGTGTGCGTGTGCA TGTGTTTGCACCTTATGTGCT C CACGGTGCAG GTCTGTGTGTGTGTGTACATATGTGTGTGAG TGTCCCCACCATCACTCAACCTAAGGCTGTG TGTTCTCTCCGCTCTCTAAGGATCAAGACAA GACCAGGCCTCTGTCCACCCTGGCCAACTTG GCCATCATCATCACAGATGTCCAGGACATGG ACCCCATCTTCATCAACCTGCCTTACAGCAC CAACATCTACGAGCATTCTCCTCC C GTAAGA CTCCTGGCCCTTCCCTTCTCAGAAGTCCCTTC TCAGAGGGACTTCCTTCTGAGCTCCTGTTAG GGATGGGCCCTGTTAGTGGGCTGGGCTCCT CCTTGGCTCCTCCGAGTCCCTGTGCGTG GC AGTCATCACTGTTCTGGCACAG GAAACCC |
| 38 | GAGTCACATGGAGTGAGTTCAGC CTAGACTGCATCTTTGCTCCATCC | 425 | 55 | rs7917781 rs41281330 rs17712523 | GAGTCACATGGAGTGAGTTCAGC CCAGGAG AACAGCCATCTGGATCCACCT T GGTCCCTCT GGCCACCTGACCAAGGACGTGACCCACTCT TTTCCACAGGCCACCACGCAC C TGTACGTGA CCATTGTGGATGAGAATGATAACCGGCCCAT GTTCCAGCAGCCCCACTATGAGGTGTGTGCT GGATGAGGGCCAGACACGCTCAACACCAG CCTCATCACCATCCAGGCACTGGACCTGGAT GAGGGTCCCAACGGCACAGTCACTATGCC ATC C TCGCAGGCAACATCGTCAACACCTTCC GCATCGACAGACACATGGTCAGCAGCTGAT GGCAGGATCAAGACAAGGGGCGAAACCTAT CCAGGGATTGGCAAGGAGTTCAGTGACACT GGAGGG GGATGGAGCAAAGATGCAGTCTAG |
| 50 | CTCCTCATACTTTGGAGAGCTGC TGCAGGCATCAAGCTGCTCGTGG | 375 | 53 | rs4747193 rs4747194 rs9663920 rs4747195 | TTCTCCTCATACTTTGGAGAGCTGC CATGAA TGAGGAGTGGCCAAAATGGCAGTGGG A GCC TCTGTGCTTAGGGAAGTCAATGCCAACCC C GACAGTGGACTACGAGGAGGTGCACCTGGCT CAACTTTACCGTGAGGGCC T CA C ACAACGG GTCCC C GCCCGGGCAGCTGAGATCCCTGT CTACCTGAAATCGTGGACATCAATGCCAAC AACCCCATCTTTGACCAGCCCTCTACCAGG TGGGTGGCCAGGCCACAGGCTGGGTCCAGG ACCTGCGCCCATTCCTTGGGGTCTTTGGGCA TCTTCTCTCCACCCCTGCCAGCCTCTAAGC CCCTGGGAGTGGCCAGC CCACGAGCAGCT TGATGCCTGCATC |

Tabela 4 – Sequências dos *primers* usados para cada fragmento do gene *KCNE1* e as respectivas Tm. ■ – *primer forward*; ■ – *primer reverse*; ■ – SNPs; ■ – sequência codificante.

| Exão | Sequência dos <i>Primers</i> 5'-3' | Dimensão | Tm | SNPs | Sequência amplificada |
|------|--|----------|----|--|--|
| 4 | TGTGGCAGGAGACAGTTCAG TCGTCTCAGGAAGGTGTGTG | 330 | 59 | rs17857111 rs1805127 rs17173509 rs1805128 rs17853625 | CTGTGGCAGGAGACAGTTCAGCAGGGTGGC AACATGTCGGGCCTGGCCC■CAGGTCCCCC CGCAGC■GTGACGGCAAGCTGGAGGCCCTC TACGTCCTCATGGTACTGG■ATTCTTCGGCT TCTTACCCTGGGCATCATGCTGAGCTACAT CCGCTCCAAGAAGCTGGAGCACTCGAACGA CCCATTCAACGTCTACATCGAGTCC■ATGCC TGGCAAGAGAAGGACAAGGCCTATGTCCAG GCCCGGGTCTGGAGAGCTACAGGTCTGTG■ TATGTCGTTGAAAACCATCTGGCCATAGAAC AACCCAA■CACACACCTTCCTGAGACGA■ |

Após a optimização das condições de PCR, as sequências pretendidas foram amplificadas a partir dos DNAs da amostra em estudo. Em todas as reacções de PCR realizadas foi incluído um tubo de controlo negativo, em que não houve adição de DNA à mistura de reacção, para assegurar a inexistência de contaminação dos reagentes com DNA externo. O PCR foi realizado com 3µl de DNA molde num volume final de mistura de reacção de 50µl contendo água ultra-pura esterilizada, tampão de amplificação 1x, dNTPs (250µM), *primer forward* e *reverse* (0,8µM cada), MgCl₂ (1,5mM) e Taq polimerase (0,75U) (Invitrogen).

Para a realização dos PCRs foram utilizados os termocicladores Biometra T1 Thermocycler, Biometra T Gradient e Biometra Personal Cycler (Whatman®). Após um passo de desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, realizaram-se 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação, 30 segundos de temperatura de emparelhamento correspondente a cada par de *primers* (Tabelas 3 e 4) e 30 segundos de extensão a 72°C, e finalmente seguiu-se um passo de extensão de 5 minutos a 72°C. Após o PCR as amostras foram armazenadas a 4°C até à etapa de análise subsequente.

A confirmação da amplificação realizada e do tamanho dos fragmentos foi feita por visualização de 5µl de produtos de PCR através de electroforese em gel de agarose como descrito em 2.3.1.2, tendo sido usado o marcador de pesos moleculares 100bp (Invitrogen).

2.3.1.4. Purificação e sequenciação de produtos de PCR

Antes da sequenciação é necessário efectuar um passo de purificação de produtos de PCR, de forma a serem removidos *primers*, sais e nucleótidos não incorporados, para que não interfiram com os processos subsequentes. A purificação foi efectuada com o *kit* PCR JETQuick PCR Product Purification Spin Kit (Genomed), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o DNA é misturado com uma solução de adsorção e através da centrifugação em colunas, vai aderir à membrana de sílica da coluna. De seguida adiciona-se

a solução de lavagem que remove as impurezas, enquanto o DNA continua adsorvido. Segue-se um passo de eluição com água ultra-pura esterilizada.

Para confirmar a purificação dos produtos de PCR foi efectuada electroforese em gel de agarose como descrito no ponto 2.3.1.3.

Quando se verificou a correcta purificação do produto de PCR, ou seja, quando se obteve uma banda com o tamanho esperado, sem a presença de *primers*, procedeu-se à sua sequenciação. Esta foi realizada num sequenciador automático CEQ2000 (Beckman) para as amostras da população controlo, e num sequenciador automático ABI3700 (Applied Biosystems) para as amostras da população em estudo. Os resultados foram posteriormente tratados no *software* CEQ8000. Através da análise dos electroforetogramas as sequências foram corrigidas, as regiões iniciais e finais de baixa qualidade foram retiradas e as sequências *forward* e *reverse* foram alinhadas. Através da comparação com uma sequência padrão (*KCNE1* NT_011512.10, *CDH23* NT_008583, NCBI), os SNPs foram analisados e registados e foram detectadas outras eventuais alterações na sequência.

2.4. Análise estatística

Todos os SNPs foram testados individualmente em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg através de um teste χ^2 de qualidade de ajustamento. Para testar se há uma diferença estatisticamente significativa entre as frequências genotípicas ou alélicas *versus* susceptibilidade ou resistência ao ruído, foi realizado um teste χ^2 de Pearson e um teste de associação linear, respectivamente, usando o *software* SPSS15.0 [32]. Nos casos em que mais de 20% das frequências genotípicas absolutas esperadas tinham um valor inferior a 5 usou-se uma aproximação Monte Carlo do teste de χ^2 , através do *software* SPSS15.0 [32]. Nos casos em que apenas dois génotipos estavam representados, ou seja, nos casos de tabelas 2x2, as diferenças entre as frequências genotípicas nos dois grupos de indivíduos foram testadas através do teste exacto de Fischer, usando o *software* SPSS15.0 [32]. Para além disso, dado que a doença em estudo pode estar associada a uma combinação de alelos, procedeu-se à análise de haplótipos para ambos os genes. A estimativa das frequências dos haplótipos e o teste χ^2 de Pearson para averiguar as diferenças entre indivíduos resistentes e susceptíveis foi realizada através do *software* Haploview [39]. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças a que corresponderam valores-p inferiores a 0,05.

Para averiguar a associação entre a resistência/susceptibilidade à NIHL e os polimorfismos, controlando possíveis factores de confusão (idade, sexo e tempo de exposição no trabalho ao ruído), foi utilizado modelo logístico multivariado. A análise multivariada foi conduzida no *software* R 2.5.1 [49].

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização da população em estudo

Após agrupar a população sujeita a ruído que se disponibilizou a participar neste estudo, em indivíduos resistentes e indivíduos susceptíveis a NIHL, fez-se a caracterização de cada um dos grupos. Foi assim determinada a média, o desvio padrão, a mediana e os valores mínimos e máximos relativamente à idade, ao número de anos de exposição a ruído profissional e ao nível de exposição ao ruído (Tabela 5).

Tabela 5 – Caracterização dos indivíduos resistentes e susceptíveis ao ruído.

| | Total | Género | Parâmetro | Idade | Nº anos trabalho | L _{Ex,8h} (dB) |
|--------------|-------|--------------------------------------|-----------|-------|------------------|-------------------------|
| Resistentes | 51 | 15 Mulheres (29%) 36 Homens (71%) | Média | 40,31 | 21,39 | 86,29 |
| | | | Dp | 10,74 | 12,06 | 2,23 |
| | | | Mediana | 42 | 24 | 86 |
| | | | Min | 22 | 2 | 83 |
| | | | Máx | 69 | 41 | 89 |
| Susceptíveis | 54 | 22 Mulheres (41%) 32 Homens (59%) | Média | 44,44 | 26,72 | 86,58 |
| | | | Dp | 9,67 | 11,86 | 2,34 |
| | | | Mediana | 48 | 31 | 86,43 |
| | | | Min | 23 | 5 | 83 |
| | | | Máx | 57 | 44 | 89 |

Como se pode observar na tabela, os trabalhadores classificados como resistentes são em média cerca de quatro anos mais novos do que os classificados como susceptíveis e estiveram em média expostos a ruído durante menos cerca de cinco anos. Quanto ao nível médio de ruído a que estão expostos, não existe diferença significativa entre os dois grupos. Para além disso, constata-se que há uma maior percentagem de mulheres no grupo susceptível comparativamente ao grupo resistente. Por outro lado, as mulheres que participaram neste estudo são, em média, cerca de quatro anos mais velhas que os homens e geralmente começaram a trabalhar mais cedo na empresa, acumulando em média mais oito anos de trabalho sujeito a ruído do que os homens (dados não mostrados).

3.2. Frequências alélicas e genótípicas de SNPs no gene *KCNE1*

Em relação aos cinco SNPs seleccionados no gene *KCNE1*, apenas foi possível analisar estatisticamente o polimorfismo rs1805127, já que para os restantes SNPs (rs17857111, rs17173509, rs17853625) não foram encontrados indivíduos heterozigóticos na amostra de estudo ou foi encontrado apenas um (rs1805128). Não se observaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nas frequências genótípicas ou alélicas do SNP rs1805127 entre os indivíduos susceptíveis e os indivíduos resistentes (Anexo B, Tabela 9).

É de salientar que os valores de heterozigotia destes SNPs ($H_{rs17857111}=0$; $H_{rs1805127}=0,44$; $H_{rs17173509}=0$; $H_{rs1805128}=0,01$; $H_{rs17853625}=0$), determinados a partir de uma amostra

populacional de indivíduos audiológicamente normais não sujeitos a ruído, e de indivíduos expostos a ruído não incluídos neste estudo, são semelhantes aos valores referência [30], quando conhecidos, para a população europeia (Tabela 1).

No decurso desta última análise, foram encontradas em duas amostras distintas da população de indivíduos normais não sujeitos a ruído duas mutações não sinónimas, não descritas, no gene *KCNE1*: a variante 127G>A, que leva à alteração proteica E43K e a variante 139G>A, que conduz à alteração proteica V47I (Anexo A) [36]. Ambas as variantes foram encontradas em heterozigotia e o resíduo de aminoácido correspondente encontra-se na região extracitoplasmática, no caso da primeira, ou transmembranar, no caso da segunda, zonas bastante conservadas entre várias espécies (Anexo C). O efeito fenotípico destas variantes, nomeadamente a nível do intervalo QT, encontra-se por determinar, sendo que o indivíduo portador da mutação E43K apresenta um electrocardiograma normal (dados não mostrados).

3.3. Frequência de alélicas e genotípicas SNPs no gene *CDH23*

Em relação aos nove polimorfismos seleccionados neste gene, não se encontrou indivíduos heterozigóticos para alguns SNPs, pelo que a análise estatística foi efectuada apenas para um SNP no exão 7 (rs736717), dois SNPs no exão 38 (rs7917781 e rs17712523) e três no exão 50 (rs4747193, rs4747194 e rs4747195) (ver Tabela 6 e Anexo B). Obteve-se diferenças estatisticamente significativas nas frequências genotípicas dos indivíduos susceptíveis relativamente aos indivíduos resistentes apenas em três polimorfismos do exão 50: rs4747193 (SNP intrónico); rs4747194 e rs4747195 (SNPs não sinónimos) (Tabela 6). Os indivíduos resistentes têm uma maior percentagem de heterozigotia para qualquer um destes SNPs. Curiosamente, as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs rs4747194 e rs4747195 são idênticas, isto porque os indivíduos com o genótipo GG para rs4747194 possuem o genótipo CC no SNP rs4747195, os que são heterozigotas para o primeiro são-no para o segundo e os que são AA no primeiro, são TT no segundo. Estes SNPs estão pois claramente associados.

Ao observar os valores de heterozigotia obtidos para os indivíduos sujeitos a ruído que foram não foram incluídos na amostra em estudo, verifica-se que são semelhantes aos valores, quando descritos, para a população europeia, exceptuando-se dois SNPs do exão 38 (rs7917781 e rs17712523) (Tabela 2 e 11) [30].

No sentido de avaliar a conservação dos resíduos de aminoácido na região da proteína codificada pelo exão 50 foi efectuada um alinhamento múltiplo com as sequências proteicas de alguns mamíferos, além do Homem (Anexo C, Figura 6). Os resultados mostram que, nestas espécies, os resíduos de aminoácido alterados pelos SNPs rs 4747194 e rs 4747195 são

totalmente conservados, assim como as regiões adjacentes. Desta forma, tendo apenas em consideração o grau de conservação destes resíduos, poder-se-á por a hipótese de que os SNPs correspondentes originam alguma alteração na estrutura da proteína, que contribua para o grau de resistência ou susceptibilidade do indivíduo ao ruído.

Tabela 6 – Diferenças nas frequências alélicas e genóticas dos SNPs do exão 50 do gene *CDH23* para o grupo susceptível *versus* grupo resistente. Os valores-p significativos estão assinalados a negrito.

| Exão 50 | | Resistentes | | Susceptíveis | | N total | Freq.total | Valor-p |
|-----------|---------|-------------|-------|--------------|-------|---------|------------|---------|
| SNP id | Alelos | N | Freq. | N | Freq. | | | |
| rs4747193 | G | 32 | 31,4% | 30 | 27,8% | 62 | 29,5% | 0,569 |
| | A | 70 | 68,6% | 78 | 72,2% | | | |
| | N total | 102 | | 108 | | | | |
| rs4747194 | G | 75 | 73,5% | 83 | 76,9% | 158 | 75,2% | 0,578 |
| | A | 27 | 26,5% | 25 | 23,1% | | | |
| | N total | 102 | | 108 | | | | |
| rs9663920 | G | 102 | 100% | 108 | 100% | 210 | 100% | |
| | A | 0 | 0% | 0 | 0% | | | |
| | N total | 102 | | 108 | | | | |
| rs4747195 | C | 75 | 73,5% | 83 | 76,9% | 158 | 75,2% | 0,578 |
| | T | 27 | 26,5% | 25 | 23,1% | | | |
| | N total | 102 | | 108 | | | | |

| SNP id | Genótipos | Resistentes | | Susceptíveis | | N total | Freq.total | Valor-p |
|-----------|-----------|-------------|-------|--------------|-------|---------|------------|---------|
| | | N | Freq. | N | Freq. | | | |
| rs4747193 | GG | 3 | 5,9% | 8 | 14,8% | 11 | 10,5% | 0,022 |
| | GA | 26 | 51,0% | 14 | 25,9% | | | |
| | AA | 22 | 43,1% | 32 | 59,3% | | | |
| | N total | 51 | | 54 | | | | |
| rs4747194 | GG | 26 | 51,0% | 36 | 66,7% | 62 | 59,0% | 0,028 |
| | GA | 23 | 45,1% | 11 | 20,4% | | | |
| | AA | 2 | 3,9% | 7 | 13,0% | | | |
| | N total | 51 | | 54 | | | | |
| rs9663920 | GG | 51 | 100% | 54 | 100% | 105 | 100% | |
| | GA | 0 | 0% | 0 | 0% | | | |
| | AA | 0 | 0% | 0 | 0% | | | |
| | N total | 51 | | 54 | | | | |
| rs4747195 | CC | 26 | 51,0% | 36 | 66,7% | 62 | 59,0% | 0,028 |
| | CT | 23 | 45,1% | 11 | 20,4% | | | |
| | TT | 2 | 3,9% | 7 | 13,0% | | | |
| | N total | 51 | | 54 | | | | |

3.4. Análise de Haplótipos

Dado que a susceptibilidade à NIHL pode estar associada a uma combinação específica de alelos de SNPs, e não a um único alelo, foram construídos haplótipos para os genes em estudo. A análise da frequência de haplótipos e das diferenças entre o grupo susceptível e o grupo resistente ao ruído restringiu-se aos haplótipos que se encontravam em desequilíbrio de *linkage*, o que se verificou apenas para três SNPs do exão 50 do gene *CDH23* (Tabela 7). A análise demonstra que não existe uma diferença estatisticamente relevante na frequência dos

haplótipos estimados entre resistentes e susceptíveis à surdez induzida pelo ruído.

Tabela 7 – Análise de haplótipos dos SNPs que se encontram em LD

| Haplótipos | Haplotipo | Freq. | N Resistentes | N Susceptíveis | Valor-p |
|---------------------------------------|-----------|-------|---------------|----------------|---------|
| rs 4747193- rs 4747194- rs 4747195 | AGC | 0,71 | 70 | 78 | 0,78 |
| | GAT | 0,25 | 27 | 25 | |
| | GGC | 0,05 | 5 | 5 | |
| N Total | | | 102 | 108 | |

3.5. Análise de Regressão

Os resultados das análises de regressão logística bivariada são equivalentes aos dos testes de χ^2 de independência realizados, mas os modelos de regressão acrescentam a informação relativa à magnitude da associação.

Para a análise de regressão os polimorfismos foram agrupados segundo o genótipo mais frequente *versus* o conjunto dos dois genótipos menos frequentes. Além dos genótipos possíveis para cada SNP, consideraram-se também como possíveis variáveis explicativas, a idade contínua (em anos), a idade categorizada em dois grupos (≤ 45 anos e > 45 anos), o número de anos de trabalho com exposição ao ruído e o sexo, uma vez que são factores de risco para a NIHL. Verificou-se que somente as covariáveis idade contínua, idade categorizada e tempo de exposição ao ruído são significativas a um nível de 5% de significância. Já os polimorfismos rs4747193, rs4747194 e rs4747195 só se mostraram significativos a um nível próximo de 10% (Anexo C, Tabela 12).

A partir desta análise observa-se que a idade está fortemente associada à NIHL e que poderá estar a actuar como factor de confundimento, ou seja, a aparente associação entre um genótipo e a susceptibilidade/resistência a NIHL poderá ser influenciada pela relação entre a idade e a doença. Assim, considerou-se ser importante realizar uma análise multivariada para determinar a contribuição individual dos vários factores para a susceptibilidade à NIHL, controlando os possíveis factores de confundimento. Nesta análise multivariada optou-se por considerar a idade categorizada. O tempo de exposição ao ruído não foi incluído por estar linearmente associado à idade (dados não mostrados). Pelo facto de não existirem indivíduos suficientes para o cruzamento de todas as variáveis desta análise, particularmente para o SNP rs4747195, o modelo de análise multivariada foi estimado sem este polimorfismo.

Os resultados desta análise mostram que a única covariável associada à NIHL de forma estatisticamente significativa é a idade e que, na população em estudo, os indivíduos com idade superior a 45 anos têm um risco maior de serem susceptíveis à surdez induzida pelo ruído do que os indivíduos com 45 anos ou menos (OR = 4.23 [1.67; 10.74], Anexo C, Tabela 13).

4. DISCUSSÃO

Neste estudo piloto realizado no Grupo de Genética Humana do Centro de Genética e Biologia Molecular da FCUL, procurou-se identificar factores genéticos de susceptibilidade à surdez induzida pelo ruído. Nesse sentido, investigou-se a contribuição de vários polimorfismos em dois genes candidatos para a NIHL (*Noise Induced Hearing Loss*), através da análise de uma população de trabalhadores portugueses sujeitos a ruído na sua actividade profissional. Esta população foi agrupada em indivíduos resistentes e indivíduos susceptíveis ao ruído, com base nos dados audiológicos, no número de anos de trabalho com exposição a ruído, no nível de ruído e na idade de cada trabalhador, com o objectivo de procurar diferenças estatisticamente significativas entre as frequências dos vários SNPs em cada um dos grupos.

Após ter-se verificado que a amostra em estudo se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada um dos polimorfismos, comparou-se a frequência de cinco SNPs não sinónimos do gene *KCNE1* e de cinco SNPs não sinónimos, três SNPs intrónicos e um SNP sinónimo do gene *CDH23*, nos dois grupos populacionais definidos: indivíduos resistentes e indivíduos susceptíveis à exposição a ruído.

A escolha dos genes candidatos – *KCNE1* e *CDH23* – baseou-se em estudos similares cujas conclusões apontam para a influência de determinados polimorfismos na NIHL [4;12].

O gene *KCNE1* foi associado à susceptibilidade à NIHL através dos resultados obtidos para dois SNPs não sinónimos (rs1805127 e rs1805128) [4], que foram também considerados no presente estudo, havendo natural expectativa de encontrar idêntica associação nos trabalhadores portugueses. Quanto ao SNP rs1805127, observou-se uma elevada frequência de heterozigotas (52,4%) na população em estudo, assim como na população controlo (44%), o que torna este polimorfismo um bom candidato para estudos de associação. No entanto, ao contrário de Van Lear *et al* [4], que obtiveram um valor-p significativo em relação às frequências alélicas, não se observou na presente amostra qualquer associação entre este polimorfismo e a susceptibilidade à surdez induzida pelo ruído. Van Lear *et al* [4] demonstraram, através de estudos funcionais, que a substituição de um único resíduo de aminoácido (D85N), correspondente ao SNP rs1805128, pode conduzir a grandes alterações na densidade da corrente que atravessa estes canais de potássio, conduzindo a pequenas alterações nas propriedades biofísicas dos mesmos. Assim, a presença da variante *KCNE1*-p.85N poderá levar a um aumento da concentração de K^+ e como consequência, o aparelho auditivo acumulará danos induzidos pelo ruído mais facilmente, conduzindo eventualmente ao desenvolvimento de NIHL após alguns anos de exposição. Como na nossa amostra foi encontrado apenas um indivíduo heterozigótico para este SNP, não foi possível prosseguir com a análise. É de salientar que no estudo anteriormente referido, numa população cerca de duas vezes maior do que a da *Coelima*, foram encontrados apenas cinco indivíduos

heterozigóticos, curiosamente todos resistentes, ou seja, também se verificou uma reduzida frequência de heterozigotas. Provavelmente, a contribuição desta variante para a NIHL só será detectada numa população de maior dimensão. Apesar de ser considerada um polimorfismo e de estar descrita como tal na base de dados [30], a variante KCNE1 p.D85N poderá ser responsável por uma forma atenuada da doença cardíaca LQTS (Síndrome do QT Longo): o LQTS adquirido [4]. Os portadores deste tipo de mutações são clinicamente assintomáticos, até sofrerem alguma terapia farmacológica ou distúrbios electrolíticos, tornando-se susceptíveis à doença cardíaca. Demonstrou-se que indivíduos que possuem esta variante e, adicionalmente, outras mutações noutros genes que contribuem para o LQTS, têm um fenótipo mais severo. Como o electrocardiograma (ECG) não foi incluído nos exames pedidos aos trabalhadores da *Coelima*, não se pôde avaliar algum efeito no sistema cardíaco do indivíduo heterozigótico encontrado.

Durante a genotipagem deste gene nos indivíduos audiologicamente normais foram encontradas duas novas variantes: 127G>A, que leva à alteração proteica E43K, e 139G>A, que conduz à alteração proteica V47I. Relativamente à alteração de um resíduo de ácido glutâmico para um resíduo de lisina na posição 43 (E43K), esta foi encontrada num indivíduo que não apresentava prolongamento do intervalo QT no seu ECG, nem história de síncope, perda auditiva ou qualquer outro sintoma [36]. O resíduo de aminoácido Glu-43 está localizado perto da região transmembranar [14;35], uma posição bastante conservada entre vários vertebrados [36]. Foi descrita uma variante alélica nesta posição, E43N [37], que aparentemente tem efeitos funcionais, acentuando a importância do resíduo de ácido glutâmico. Dado que o ácido glutâmico é um aminoácido ácido e a lisina é um aminoácido básico, com pontos isoeléctricos bastante diferentes, a substituição do primeiro aminoácido pelo segundo na posição 43 altera provavelmente a conformação da proteína e, hipoteticamente, poderá alterar a sua função. Será necessário proceder a uma caracterização funcional e populacional para se poder concluir se esta variante é ou não responsável por alguma alteração fenotípica. Quanto à variante V47I, descoberta mais tardiamente, ocorre numa posição para a qual está descrita uma mutação autossómica recessiva (p.V47F) responsável pelo síndrome JLN (Jervell and Lange-Nielsen) caracterizado por prolongamento do intervalo QT e surdez bilateral severa [35]. Não foi possível obter o ECG deste indivíduo, mas uma vez que faz parte da população audiologicamente normal, exclui-se a hipótese de esta variante ter algum efeito deletério quanto à audição. A posição 47 nem sempre é ocupada pela valina. Este resíduo de aminoácido é encontrado no Homem, galo, chimpanzé, orangotango e macaca. Mas já em coelho, vaca, porco, rato e ratazana é a isoleucina, estruturalmente semelhante e com um ponto isoeléctrico similar, que ocupa a referida posição.

Com base nisto, é possível que a variante V47I seja um polimorfismo ainda não descrito no gene *KCNE1* humano.

O gene *CDH23* codifica para a otocaderina, uma proteína com função de adesão nas ligações entre estereocílios das células do ouvido interno [20]. Certas mutações neste gene predisõem o portador à perda auditiva devido à idade (AHL), mas também à surdez induzida pelo ruído. Tratando-se de um gene de grandes dimensões, com 69 exões e com vários polimorfismos descritos, foram seleccionados apenas alguns SNPs em alguns exões, dando prioridade àqueles que foram previamente associados à NIHL e aos que possuem mais do que dois SNPs. O exão 7 foi escolhido para análise devido à forma alélica 753 G>A, uma alteração sinónima na posição terminal deste exão, que se demonstrou ser um alelo de AHL e estar associado a NIHL [12;26;28]. Na população analisada não foi encontrado nenhum heterozigota para este polimorfismo. Presentemente não existem dados sobre a heterozigotia deste SNP na população europeia, mas aparentemente é pouco frequente na população portuguesa.

Tendo em conta a análise individual dos SNPs considerados neste estudo, os únicos resultados positivos quanto à associação de polimorfismos à susceptibilidade à surdez sonotraumática foram obtidos para três SNPs do exão 50, um intrónico (rs4747193) e dois não sinónimos (rs 4747194, rs 4747195). Estes últimos são responsáveis pelas alterações proteicas R2358Q e P2380L numa região bastante conservada que faz parte de um domínio extracelular de caderina. Através da ferramenta PolyPhen [38], que prevê o impacto putativo de uma substituição de um resíduo de aminoácido na estrutura e função de uma proteína, supõe-se que a variante CDH23-p.R2358Q terá um efeito benigno e a variante CDH23-p.P2380L terá um efeito possivelmente prejudicial, com base no alinhamento de múltiplas sequências.

Uma vez que a susceptibilidade ao ruído pode ser determinada por um conjunto específico de alelos, mais do que por um alelo individualmente, fez-se uma análise de haplótipos. Verificou-se que os SNPs que se encontram em desequilíbrio de *linkage* são os três polimorfismos analisados no exão 50 do gene *CDH23*; no entanto não se observam diferenças significativas na frequência dos haplótipos estimados entre indivíduos resistentes e susceptíveis.

Apesar de em outros estudos de referência [4,29] ter sido realizada uma análise estatística semelhante à até agora discutida, averiguando apenas a existência de diferenças estatisticamente relevantes nas frequências dos alelos e genótipos de cada polimorfismo individualmente, esta não permite estabelecer com segurança uma associação entre factores genéticos e a surdez induzida pelo ruído. Pelo facto de os efeitos dos polimorfismos no desfecho (surdez induzida pelo ruído) poderem não ser independentes deve proceder-se a uma

análise de forma conjunta da associação entre a surdez induzida pelo ruído e os polimorfismos (através da regressão multivariada). Por outro lado, ao realizar múltiplos testes de χ^2 aumenta-se a probabilidade de ocorrência de um erro do tipo I (isto é, rejeitar a hipótese nula de independência entre o factor de risco e a doença quando não deveria ser rejeitada, ou seja, obter um falso positivo). Deste modo procedeu-se a uma análise de regressão logística, onde todas as variáveis são consideradas ao mesmo tempo. Além dos genótipos possíveis para cada SNP, considerou-se também como variável a idade categorizada, a idade contínua, o número de anos de trabalho com exposição ao ruído e o sexo, uma vez que são factores de risco para a NIHL. Para categorizar a idade dividiu-se a população em indivíduos com idade superior a 45 anos ou com idade inferior ou igual a 45 anos, uma vez que, devido ao pequeno número de indivíduos, é desaconselhável dividir a população em maior número de faixas etárias. Estudos recentes apontam para que os genes implicados na presbiacusia estejam também associados à NIHL [11,20,28]. Uma vez que a perda auditiva devido ao envelhecimento começa a tornar-se socialmente incomodativa por volta dos 40/50 anos, a divisão da população com base nos 45 anos têm assim uma razão biológica.

Os resultados das regressões logísticas bivariadas são equivalentes aos dos testes de χ^2 de independência realizados. No entanto, verificou-se que somente os modelos usando como covariáveis a idade, a idade categorizada e o tempo de exposição ao ruído foram significativos a um nível de 5% de significância. Quando considerados como covariáveis os polimorfismos rs4747193, rs4747194 e rs4747195, os mesmos para os quais se obteve resultados significativos na análise individual, os resultados mostraram-se significativos apenas a um nível próximo de 10% (Anexos, Tabela 12). Desta análise retira-se a evidência de que a idade está claramente associada à surdez sonotraumática na população em estudo e de que poderá estar a actuar como factor de confundimento, ou seja, a aparente associação entre um genótipo e a susceptibilidade/resistência à NIHL poderá ser afectada pela relação entre a idade e a doença.

Este facto era de antever uma vez que a população da *Coelima* em estudo apresentou algumas discrepâncias em relação a outras populações caracterizadas em estudos anteriores. Na verdade era esperado que o grupo susceptível fosse constituído por trabalhadores mais novos e expostos há menos anos, uma vez que, sendo mais sensíveis, mais cedo manifestariam a vulnerabilidade ao ruído. No entanto os trabalhadores classificados como resistentes na amostra estudada são em média cerca de quatro anos mais novos do que os susceptíveis e estiveram em média expostos a ruído durante menos cerca de cinco anos. Estes resultados são contrários aos obtidos por Sliwinska-Kowalska *et al* [2] e estão em desacordo com a definição de vulnerabilidade ao ruído. É sabido que a idade é um factor de

susceptibilidade ao ruído, assim como o número de anos de trabalho, e o método escolhido para dicotomizar a amostra tenta excluir esses factores aquando da classificação dos trabalhadores, como verificado por Sliwinska-Kowalska *et al* [2]. No entanto, devido ao tamanho reduzido da amostra não foi possível analisar os 10% mais resistentes e os 10% mais susceptíveis da população original, como em estudos anteriores, e assim o processo de segregação da amostra não teve poder suficiente para anular o efeito de confundimento por parte da idade.

Outra diferença em relação ao que está descrito na literatura é o facto de haver maior percentagem de mulheres no grupo dos susceptíveis em relação aos resistentes. Normalmente, as mulheres são mais resistentes ao ruído e por isso esperar-se-ia que a maior parte das mulheres da amostra estivesse nesse grupo. Na amostra em estudo, as mulheres são em média cerca de quatro anos mais velhas que os homens e geralmente começaram a trabalhar mais cedo na empresa, acumulando em média mais oito anos de trabalho sujeito a ruído do que os homens. Mais uma vez, pode haver a interferência da idade e do número de anos de serviço na classificação dos indivíduos.

Neste contexto foi então realizada uma análise multivariada para determinar a contribuição individual dos vários factores para a susceptibilidade à NIHL, controlando possíveis factores de confundimento. Assim, considerou-se a idade categorizada, por ser a variável que apresentou na análise bivariada o valor-p mais significativo. O resultado do modelo multivariado não sugere associação entre surdez induzida pelo ruído e os polimorfismos considerados. Portanto a associação observada na análise anterior entre os polimorfismos rs4747193, rs4747194 e rs4747195 e a NIHL dilui-se quando se analisam todas as variáveis em conjunto. Como era expectável, a idade está associada à NIHL e, tendo em conta a população em estudo, os indivíduos com idade superior a 45 anos têm um risco superior de serem susceptíveis à surdez induzida pelo ruído quando comparados com os indivíduos com 45 anos ou menos (OR = 4.23 [1.67; 10.74]). Estes resultados indicam que nenhuma das 14 variantes tidas em consideração no estudo tem influência na susceptibilidade à surdez sonotraumática na população portuguesa sob investigação, ou que o seu efeito para este fenómeno é demasiado pequeno para ser detectado numa amostra desta dimensão. Uma outra hipótese é que o efeito destes SNPs seja apenas visível quando analisada a sua interacção com outras variantes noutros genes.

A dicotomização da amostra em indivíduos resistentes e indivíduos susceptíveis ao factor de risco em estudo foi talvez a etapa mais crucial do estudo. O método utilizado neste trabalho para esse fim baseou-se num estudo recente [2] que comparou vários métodos de classificação e elegeu o que se baseia na norma ISO 1999 [7] como o mais consistente para a

classificação em indivíduos resistentes e susceptíveis ao ruído, a ser usado em futuros testes genéticos sobre a susceptibilidade à surdez induzida pelo ruído. Assim, dado que a frequência de 4kHz é aceite internacionalmente como sendo a mais sensível ao trauma induzido pelo ruído, a classificação efectuada baseou-se na determinação do nível dos limiares auditivos a 4kHz. O método acima referido, assim como o utilizado no estudo de Van Lear *et al* [4], pressupõe que no grupo dos resistentes se seleccionem os 10% mais resistentes (com os melhores níveis de audição) e no grupo dos susceptíveis os 10% mais susceptíveis (com os piores níveis de audição). Convém referir que os trabalhos acima referidos partiram de uma população inicial de cerca de 1000 trabalhadores. Ora, no presente estudo piloto, dada a dimensão da amostra não foi possível utilizar este critério de selecção. No grupo dos resistentes incluíram-se todos os indivíduos cujo valor de Δ , ou seja, da diferença entre o seu nível auditivo e o nível médio de uma população da mesma idade e exposição sonora, fosse negativo. Em relação aos susceptíveis, em maior número, foram considerados os mais susceptíveis, concretamente, com valor de Δ igual ou superior a 0.5, para que fosse assim possível ter pelo menos 50 indivíduos em cada grupo. Outro critério de exclusão que não foi possível implementar na selecção da amostra de estudo foi o uso/não uso de protecção individual auditiva. Idealmente, só seriam considerados no grupo dos susceptíveis indivíduos que usassem regularmente protecção auditiva, de forma que fossem considerados susceptíveis aqueles indivíduos que, mesmo utilizando protecção auditiva regulamentada, experimentassem ainda os efeitos do ruído no sistema auditivo, por este ser de alguma forma mais vulnerável do que o de outros trabalhadores nas mesmas condições. No entanto, embora a protecção auditiva se tenha tornado obrigatória na Coelima há cerca de sete anos, muitos dos trabalhadores, principalmente os mais antigos, não usa regularmente a protecção, e muitos dos que usam agora, não a usaram em empregos anteriores.

Em suma, através deste estudo piloto sobre a identificação de factores genéticos subjacentes à surdez induzida pelo ruído numa população de trabalhadores portugueses, não foi possível encontrar uma clara associação genética entre variantes dos genes *CDH23* e *KCNE1* e a NIHL. No entanto estes dados preliminares apontam para alguns polimorfismo do gene *CDH23* para serem considerados em estudos posteriores mais alargados.

É de realçar que este é um estudo pioneiro em Portugal. A amostragem realizada foi a possível de obter e executar em um ano de trabalho mas, de futuro, contará com a colaboração de mais trabalhadores. Desta forma, apesar de os resultados obtidos deverem ser considerados com precaução, podem também ser considerados um ponto de partida para investigar outras populações. A associação observada para os SNPs do exão 50 do gene *CDH23*, quando analisados individualmente, constitui uma pista importante a ter em consideração em estudos

posteriores com uma população mais alargada em que seja possível diluir o factor de risco idade.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Arezes P, Miguel, AS. Percepção do Risco de Exposição Ocupacional ao Ruído. Tese de Doutoramento 2002.
- [2] Sliwinska-Kowalska M, Dudarewicz A, Kotylo P, Zamyslowska-Szmytke E, Pawlaczyk-luszczynska M, Gajda-Szadkowska A. Individual susceptibility to noise-induced hearing loss: choosing an optimal method of retrospective classification of workers into noise-susceptible and noise-resistant groups. *Int J Occup Med Environ Health* 2006; 19(4): 235-45.
- [3] Plontke S, Zenner Tübingen HP. Current aspects of hearing loss from occupational and leisure noise. In: Schultz-Coulon HJ, editors. *Environmental and Occupational Health Disorders*. Germany: Videel OHG 2004; 233-325.
- [4] Van Laer L, Carlsson PI, Ottschytch N, Bondeson ML, Konings A, Vandeveldel A. The contribution of genes involved in potassium recycling in the inner ear to noise induced hearing loss. *Hum Mutat* 2006; 27: 786-95.
- [5] McReynolds MC. Noise-induced hearing loss. *Air Med J* 2005; 24(2): 73-8.
- [6] Hellström PA, Dengerink H. The relevance of A-weighted sound pressure levels when predicting the risk for NIHL. In: Henderson D, Prasher D, Kopke R, Salvi R, Hamernik R, editors. *Noise Induced Hearing Loss: Basic Mechanisms, Prevention and Control* 2001. London: NRN Publications; 341-50.
- [7] ISO 1999. Acoustics - Determination of occupational noise exposure and estimation of noise-induced hearing impairment, *International Standard Organisation* 1991, Genève.
- [8] Toppila E Pyykkö I, Starck J, Kaksonen R, Ishizaki H. Individual risk factors in the development of noise-induced hearing loss. *Noise Health* 2000; 2(8): 59-70.
- [9] Nomura K, Nakao M, Morimoto T. Effect of smoking on hearing loss: Quality assessment and meta-analysis. *Prev Med* 2005;40(2): 138-44.
- [10] Bovo R, Ciorba A, Martini A. Genetic factors in noise induced hearing loss, *Audiol Med* 2007; 5: 25-32.
- [11] Davis RR, Kozel P, Erway LC. Genetic influences in individual susceptibility to noise: a review. *Noise Health* 2003;5:/19-28.
- [12] Yang M, Tan H, Zheng JR, Wang F, Jiang C, He M. Association of cadherin CDH23 gene polymorphisms with noise induced hearing loss in Chinese workers. *Wei Sheng Yan Jiu* 2006; 35: 19-22 (Article in press).
- [13] Robbins J. KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Ther* 2001; 90: 1-19.
- [14] Splawski I, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH, Keating MT. Genomic structure of three long QT syndrome genes: KVLQT1, HERG and KCNE1. *Genomics* 1998; 51: 86-97.
- [15] Vatta M, Towbin J. Mutations in KCNE1 in long QT syndrome (LQTS): Insights into mechanism of LQTS and drug sensitivity. *Heart Rhythm* 2006; 3(9): 1041-1042.
- [16] Warth R, Barhanin J. The multifaceted phenotype of the knockout mouse for the KCNE1 potassium channel gene. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2002; 282: R639-R648.
- [17] Chandrasekhar KD, Kobertz WR. KCNE1 Subunits Require Co-assembly with K⁺ Channels for Efficient Trafficking and Cell Surface Expression. *J Biol Chem* 2006; 281: 40015-40023.
- [18] Astuto LM, Bork JM, Weston MD. CDH23 mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 262-275.
- [19] Bolz H, von Brederlow B, Ramirez A. Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nat Genet* 2001; 27: 108-112.

- [20] Mchugh RK, Friedman RA. Genetics of hearing loss: allelism and modifier genes produce a phenotypic continuum. *Anatom Rec Part A* 2006; 288(4): 370-381.
- [21] Siemens J, Kazmierczak P, Reynolds A, Sticker M, Littlewood-Evans A, Muller U. The Usher syndrome proteins cadherin 23 and harmonin form a complex by means of PDZ-domain interactions *PNAS* 2002; 99(23): 14946-14951.
- [22] Boeda B, El-Amraoui A, Bahloul A. Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *EMBO J* 2002; 21: 6689-6699.
- [23] Siemens J, Lillo C, Dumont RA. Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia. *Nature* 2004; 428: 950-955.
- [24] Michel V, Goodyear RJ, Weil D. Cadherin 23 is a component of the transient lateral links in the developing hair bundles of cochlear sensory cells. *Dev Biol* 2005; 280: 281-294.
- [25] Rzadzinska AK, Derr A, Kachar B. Sustained cadherin 23 expression in young and adult cochlea of normal and hearingimpaired mice. *Hear Res* 2005; 208: 114-121.
- [26] Noben-Trauth K, Zheng QY, Johnson KR. Association of cadherin 23 with polygenic inheritance and genetic modification of sensorineural hearing loss. *Na. Genet* 2003; 35: 21-23.
- [27] 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; 5: 66-79.
- [28] Sliwiniska-Kowalska M, Pawelczyk M, Kowalski TJ. Genetic factors in susceptibility to age- and noise-related hearing loss. *Pol Merkur Lekarski* 2006; 21(124): 384-8 (Article in press).
- [29] Carlsson PI, Borg E, Grip L, Dahl N, Bondeson ML. Variability in noise susceptibility in a Swedish population: The role of 35delG mutation in the Connexin 26 (GJB2) gene. *Audiol Med* 2004; 2: 123-130.
- [31] BLAST - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. 25/10/2006; 13h.
- [30] dbSNP - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>. 25/10/2006; 14h.
- [32] www.spss.com. 02/08/07; 10h.
- [33] <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. 10/12/06; 15h.
- [34] <http://www.ensembl.org/index.html>. 25/10/2006; 10h.
- [35] Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000; 102: 1178-1185.
- [36] Correia N, Caria H, Fialho G. A novel variant E43K found in *KCNE1* gene. *Eur J Hum Genet* 2007 (suppl).
- [37] Abitbol I, Peretz A, Lerche C, Busch AE, Attali B. Stilbenes and fenamates rescue the loss of IKs channel function induced by an LQT5 mutation and other IsK mutants. *EMBO J* 1999; 18(15): 4137-4148.
- [38] <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/index.html>. 30/08/07; 11h.
- [39] <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>
- [40] <http://www.R-project.org/>

6. ANEXOS

Anexo A

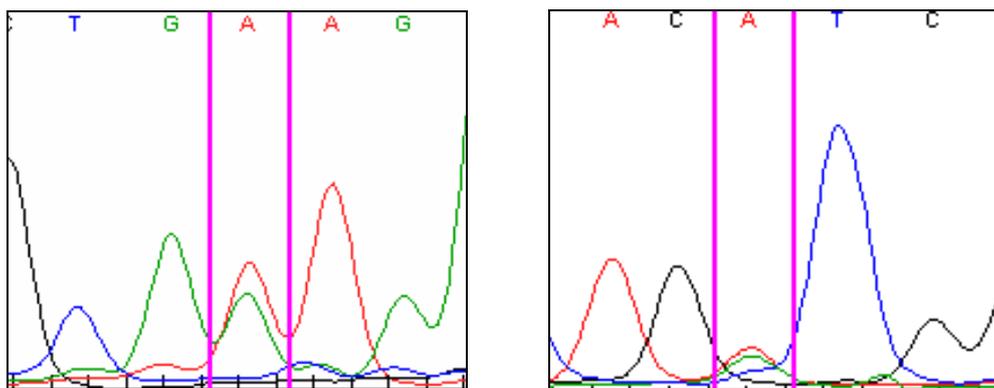


Figura 3 – Electroforetogramas das variantes encontradas de novo no gene *KCNE1*: à esquerda a alteração 127G>A em heterozigotia; à direita a alteração 139G>A em heterozigotia.

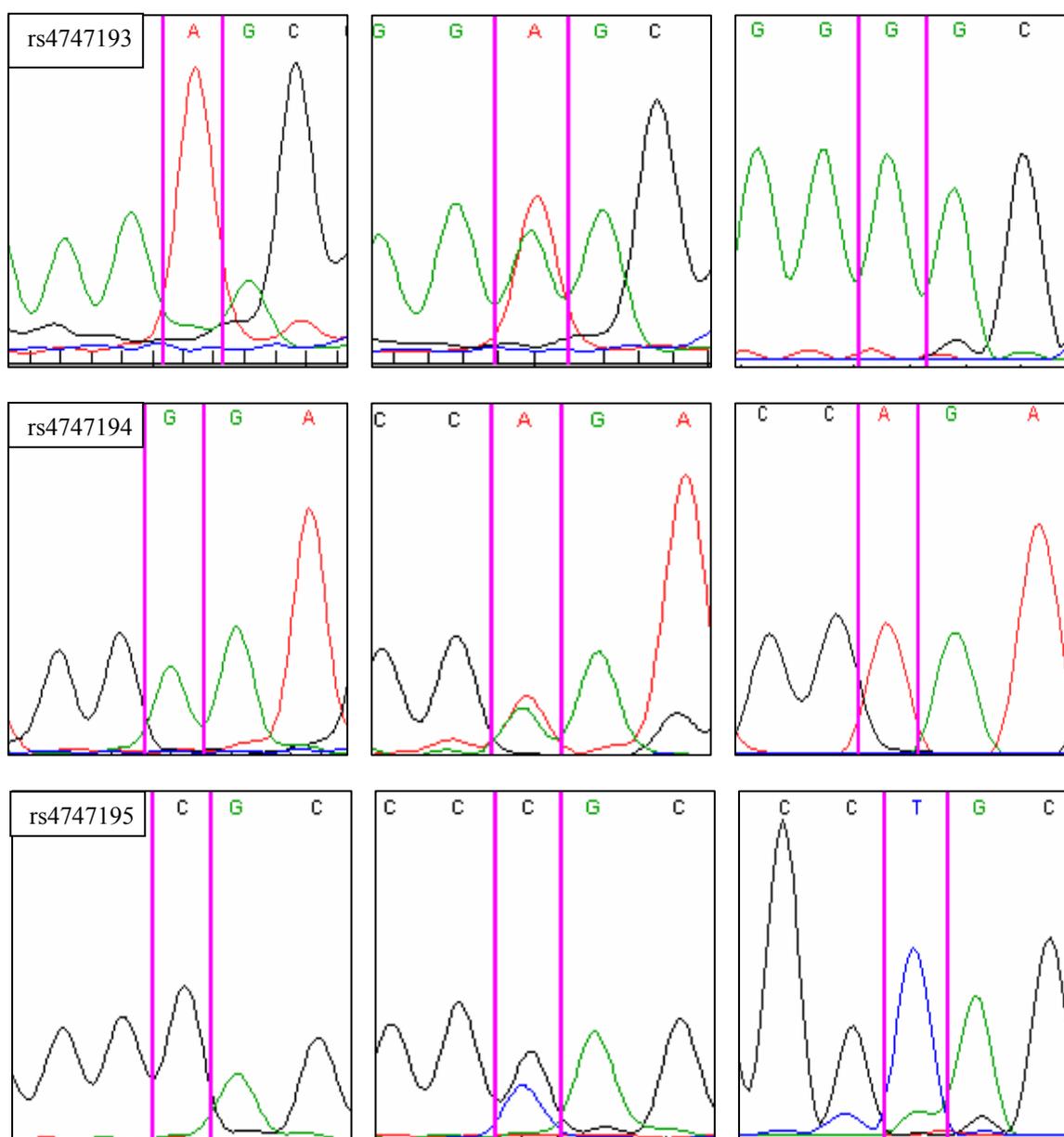


Figura 4 – Electroforetogramas dos genótipos encontrados para os SNPs do gene *CDH23* para os quais se obteve valores-p significativos na análise individual. Em cima rs4747193; ao centro rs4747194; em baixo rs4747195.

Anexo B

Tabela 8 – Diferenças nas frequências alélicas e genóticas dos SNPs do gene *KCNE1* para o grupo de indivíduos susceptíveis *versus* indivíduos resistentes ao ruído.

| <i>KCNE1</i> | | Resistentes | | Susceptíveis | | N total | Freq.total | Valor-p |
|--------------|---------|-------------|-------|--------------|-------|---------|------------|---------|
| SNP id | Alelos | N | Freq. | N | Freq. | | | |
| rs17857111 | G | 102 | 100% | 108 | 100% | 210 | 100% | |
| | A | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | |
| | N total | 102 | | 108 | | 210 | | |
| rs1805127 | G | 69 | 67,6% | 70 | 64,8% | 139 | 66,2% | 0,665 |
| | A | 33 | 32,4% | 38 | 35,2% | 71 | 33,8% | |
| | N total | 102 | | 108 | | 210 | | |
| rs17173509 | G | 102 | 100% | 108 | 100% | 210 | 100% | |
| | C | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | |
| | N total | 102 | | 108 | | 210 | | |
| rs1805128 | G | 101 | 99% | 108 | 100% | 209 | 99,5% | |
| | A | 1 | 1% | 0 | 0% | 1 | 0,5% | |
| | N total | 102 | | 108 | | 210 | | |
| rs17853625 | C | 102 | 100% | 108 | 100% | 210 | 100% | |
| | A | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | |
| | N total | 102 | | 108 | | 210 | | |

| | | Resistentes | | Susceptíveis | | N total | Freq.total | Valor-p |
|------------|-----------|-------------|-------|--------------|-------|---------|------------|---------|
| SNP id | Genótipos | N | Freq. | N | Freq. | | | |
| rs17857111 | GG | 51 | 100% | 54 | 100% | 105 | 100% | |
| | GA | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | |
| | AA | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | |
| | N total | 51 | | 54 | | 105 | | |
| rs1805127 | GG | 21 | 41,2% | 21 | 38,9% | 42 | 40,0% | 0,954 |
| | GA | 27 | 52,9% | 28 | 51,9% | 55 | 52,4% | |
| | AA | 3 | 5,9% | 5 | 9,3% | 8 | 7,6% | |
| | N total | 51 | | 54 | | 105 | | |
| rs17173509 | GG | 51 | 100% | 54 | 100% | 105 | 100% | |
| | GC | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | |
| | CC | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | |
| | N total | 51 | | 54 | | 105 | | |
| rs1805128 | GG | 50 | 98% | 54 | 100% | 104 | 99% | |
| | GA | 1 | 2% | 0 | 0% | 1 | 1% | |
| | AA | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | |
| | N total | 51 | | 54 | | 105 | | |
| rs17853625 | CC | 51 | 100% | 54 | 100% | 105 | 100% | |
| | CA | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | |
| | AA | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | |
| | N total | 51 | | 54 | | 105 | | |

Tabela 9 – Diferenças nas frequências alélicas e genótípicas dos SNPs do exão 7 do gene *CDH23* para o grupo de indivíduos susceptíveis *versus* indivíduos resistentes ao ruído. ^a Foi usado o teste exacto de Fischer

| Exão 7 | | Resistentes | | Susceptíveis | | N total | Freq.total | Valor-p |
|----------|---------|-------------|-------|--------------|-------|---------|------------|---------|
| SNP id | Alelos | N | Freq. | N | Freq. | | | |
| rs736717 | G | 96 | 96,0% | 98 | 94,2% | 194 | 95,1% | 0,557 |
| | A | 4 | 4,0% | 6 | 5,8% | 10 | 4,9% | |
| | N total | 100 | | 104 | | 204 | | |
| 753 G>A | G | 100 | 100% | 104 | 100% | 204 | 100% | |
| | A | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | |
| | N total | 100 | | 104 | | 204 | | |

| | | Resistentes | | Susceptíveis | | N total | Freq.total | Valor-p |
|----------|-----------|-------------|-------|--------------|-------|---------|------------|--------------------|
| SNP id | Genótipos | N | Freq. | N | Freq. | | | |
| rs736717 | GG | 46 | 92,0% | 46 | 88,5% | 92 | 90,2% | 0,741 ^a |
| | GA | 4 | 8,0% | 6 | 11,5% | 10 | 9,8% | |
| | AA | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | | |
| | N total | 50 | | 52 | | 102 | | |
| 753 G>A | GG | 50 | 100 % | 52 | 100% | 102 | 100% | |
| | GA | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | |
| | AA | 0 | 0% | | 0% | 0 | 0% | |
| | N total | 50 | | 52 | | 102 | | |

Tabela 10 – Diferenças nas frequências alélicas e genótípicas dos SNPs do exão 38 do gene *CDH23* para o grupo de indivíduos susceptíveis *versus* indivíduos resistentes ao ruído.

| Exão 38 | | Resistentes | | Susceptíveis | | N total | Freq.total | Valor-p |
|------------|---------|-------------|-------|--------------|-------|---------|------------|---------|
| SNP id | Alelos | N | Freq. | N | Freq. | | | |
| rs7917781 | C | 34 | 33,3% | 39 | 36,8% | 73 | 35,1% | 0,602 |
| | T | 68 | 66,7% | 67 | 63,2% | 135 | 64,9% | |
| | N total | 102 | | 106 | | 208 | | |
| rs41281330 | G | 102 | 100% | 106 | 100% | 208 | 100% | |
| | A | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | |
| | N total | 102 | | 106 | | 208 | | |
| rs17712523 | G | 86 | 84,3% | 82 | 77,4% | 168 | 80,8% | 0,204 |
| | A | 16 | 15,7% | 24 | 22,6% | 40 | 19,2% | |
| | N total | 102 | | 106 | | 208 | | |

| | | Resistentes | | Susceptíveis | | N total | Freq.total | Valor-p |
|------------|-----------|-------------|-------|--------------|-------|---------|------------|---------|
| SNP id | Genótipos | N | Freq. | N | Freq. | | | |
| rs7917781 | CC | 4 | 7,8% | 6 | 11,3% | 10 | 9,6% | 0,817 |
| | CT | 26 | 51,0% | 27 | 50,9% | 53 | 51,0% | |
| | TT | 21 | 41,2% | 20 | 37,7% | 41 | 39,4% | |
| | N total | 51 | | 53 | | 104 | | |
| rs41281330 | GG | 51 | 100% | 53 | 100% | 104 | 100% | |
| | GA | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | |
| | AA | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | |
| | N total | 51 | | 53 | | 104 | | |
| rs17712523 | GG | 35 | 68,6% | 33 | 62,3% | 68 | 65,4% | 0,235 |
| | GA | 16 | 31,4% | 16 | 30,2% | 32 | 30,8% | |
| | AA | 0 | 0,0% | 4 | 7,5% | 4 | 3,8% | |
| | N total | 51 | | 53 | | 104 | | |

Tabela 11 – H europa: Valores de heterozigotia para os SNPs do gene *CDH23* da população europeia [30]; H actual: valores de heterozigotia determinados neste estudo. N.D – não definido.

| | | H europa | H actual |
|---------|-------------|----------|----------|
| Exão 7 | rs736717 | 0.05 | 0,08 |
| | 753 G>A | N.D. | 0 |
| Exão 38 | rs 7917781 | 0,566 | 0,389 |
| | rs 41281330 | N.D. | 0,000 |
| | rs 17712523 | 0,407 | 0,278 |
| | rs 4747193 | N.D. | 0,500 |
| Exão 50 | rs 4747194 | 0,500 | 0,450 |
| | rs 9663920 | 0 | 0 |
| | rs 4747195 | 0,500 | 0,450 |

Anexo C

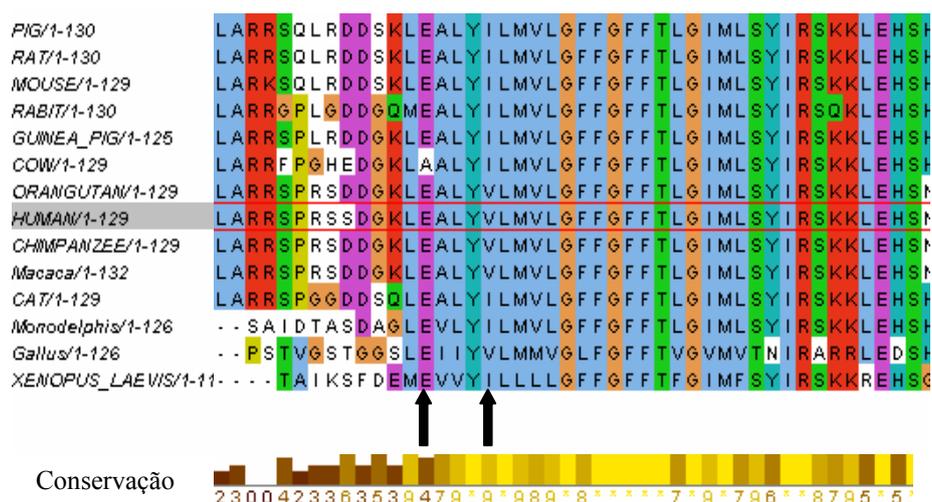


Figura 5 – Alinhamento múltiplo de seqüências proteicas de *KCNE1* de várias espécies, evidenciando a conservação dos resíduos de aminoácido [36]. O alinhamento foi realizado através do software ClustalW [33]. As setas assinalam os resíduos p.E43 e p.V47, respectivamente.

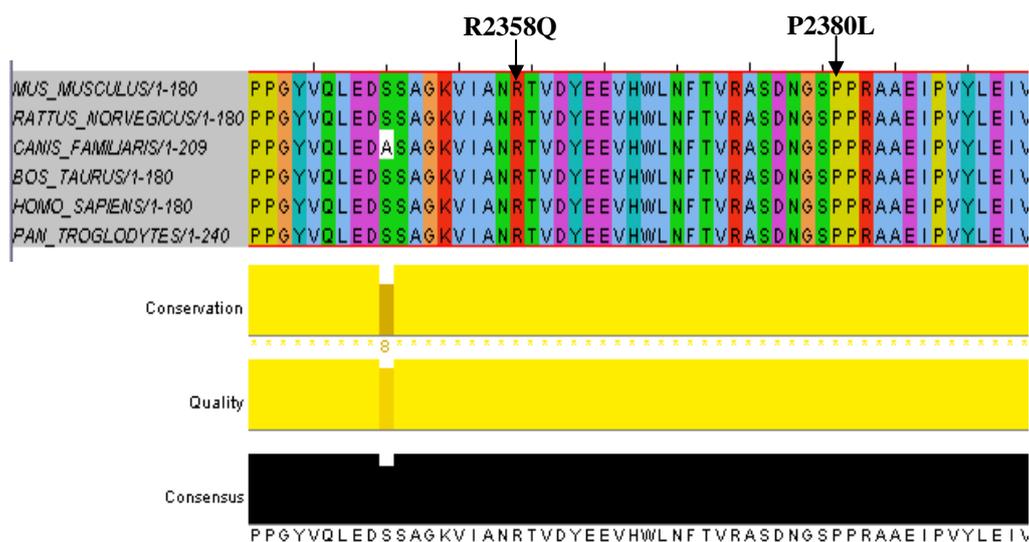


Figura 6 – Alinhamento múltiplo de seqüências proteicas de *CDH23* de várias espécies, evidenciando a conservação dos resíduos de aminoácido. O alinhamento foi realizado através do software ClustalW [33] a partir das seguintes seqüências [34]: rato (ENSMUSP00000072973), ratazana (ENSRNOP00000048338), cão (ENSCAFP00000021050), vaca (ENSBTAP00000028652), Homem (ENSP00000224721) e chimpanzé (ENSPTRP00000004516). As setas assinalam os resíduos de aminoácido correspondentes aos SNPs codificantes no exão 50 com valores-p significativos.

Anexo D

Tabela 12 – Resultados da regressão logística bivariada. OR – *Odds ratio*; Limite inf. e Limite sup. – Limites inferior e superior do intervalo de confiança de 95% para OR. A negrito estão assinalados os valores-p significativos ao nível de 5%.

| Covariável | Base de comparação | Coeficientes | OR | Limite Inf. | Limite Sup. | Valor-p |
|------------------------------------|--------------------|--------------|--------|-------------|-------------|--------------|
| rs1805127 KCNE1 | GA | -0.0437 | 0.9573 | 0.4449 | 2.0599 | 0.911 |
| rs736717 ex 7 | GG | 0.4055 | 0.6667 | 0.1764 | 2.5193 | 0.547 |
| rs 7917781 ex 38 | CT | 0.0015 | 0.9985 | 0.4628 | 2.1545 | 0.997 |
| rs 17712523 ex 38 | GG | -0.2820 | 0.7543 | 0.3351 | 1.6979 | 0.495 |
| rs 4747193 ex 50 | AA | 0.6509 | 1.9174 | 0.8827 | 4.1648 | 0.098 |
| rs 4747194 ex 50 | GG | 0.6539 | 1.9231 | 0.8742 | 4.2304 | 0.102 |
| rs 4747195 ex 50 | CC | 0.6539 | 1.9231 | 0.8742 | 4.2304 | 0.102 |
| Idade categorizada | >45 | 1.2993 | 3.6667 | 1.6374 | 8.2110 | 0.001 |
| Idade contínua (anos) | | 0.0399 | 1.0407 | 1.0012 | 1.0817 | 0.039 |
| Tempo de exposição ao ruído (anos) | | 0.0371 | 1.0378 | 1.0043 | 1.0723 | 0.024 |
| Sexo | M | 0.4081 | 0.6649 | 0.2979 | 1.4840 | 0.317 |

Tabela 13 – Resultados da regressão logística multivariada. OR – *Odds ratio*; Limite inf. e Limite sup. – Limites inferior e superior do intervalo de confiança de 95% para OR. A negrito está assinalado o valor-p significativo ao nível de 5%.

| Covariável | Base de comparação | Coeficientes | OR | Limite Inf. | Limite Sup. | Valor-p |
|--------------------|--------------------|--------------|--------|-------------|-------------|---------------|
| rs1805127 KCNE1 | GA | -0.4095 | 0.6640 | 0.2725 | 1.6180 | 0.3675 |
| rs736717 ex 7 | GG | -1.1819 | 0.3067 | 0.0673 | 1.3976 | 0.1267 |
| rs 7917781 ex 38 | CT | 0.0340 | 1.0346 | 0.4050 | 2.6429 | 0.9433 |
| rs 17712523 ex 38 | GG | -0.0135 | 0.9866 | 0.3589 | 2.7120 | 0.9792 |
| rs 4747193 ex 50 | AA | -0.1773 | 0.8375 | 0.1496 | 4.6905 | 0.8402 |
| rs 4747194 ex 50 | GG | 0.6622 | 1.9390 | 0.3255 | 11.5524 | 0.4671 |
| Idade categorizada | >45 | 1.4436 | 4.2360 | 1.6715 | 10.7350 | 0.0023 |
| Sexo | M | -0.3106 | 0.7330 | 0.2810 | 1.9123 | 0.5255 |