

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas



**Estudo de Associação do Genoma Inteiro em camundongos
para descoberta de genes através de Emissões Otoacústicas
por Produtos de Distorção em Amplitude Supraliminar
antes e após a exposição ao ruído**

GUILHERME KASPERBAUER

Orientador: Prof. PhD. Joel Lavinsky

Dissertação de Mestrado

2020

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas



**Estudo de Associação do Genoma Inteiro em camundongos
para descoberta de genes através de Emissões Otoacústicas
por Produtos de Distorção em Amplitude Supraliminar
antes e após a exposição ao ruído**

GUILHERME KASPERBAUER

Orientador: Prof. PhD. Joel Lavinsky

Dissertação de Mestrado

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Kasperbauer, Guilherme

Estudo de Associação do Genoma Inteiro em camundongos para descoberta de genes através de Emissões Otoacústicas por Produtos de Distorção em Amplitude Supraliminar antes e após a exposição ao ruído / Guilherme Kasperbauer. -- 2020.

113 f.

Orientador: Joel Lavinsky.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Perda auditiva induzida por ruído. 2. GWAS. 3. HMDP. 4. Emissões otoacústicas por produtos de distorção. I. Lavinsky, Joel, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Manifesto minha sincera gratidão ao meu orientador, Professor PhD Joel Lavinsky, que durante a trajetória na Otorrinolaringologia inspirou-me a seguir o caminho acadêmico. Além de professor por vocação, cirurgião habilidoso e exemplo de ser humano íntegro e ético.

Ao Professor Dr José Faibes Lubianca Neto por ter permitido iniciar o Mestrado durante a Residência Médica em Otorrinolaringologia.

Aos meus pais que me acompanharam durante esse período, proporcionando todo suporte para que desenvolvesse meus estudos. Pelo exemplo de dedicação aos filhos e perseverança.

À CAPES que proporcionou o desenvolvimento de minha pesquisa como bolsista.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 PERDA AUDITIVA INDUZIDA POR RUÍDO	15
2.1.1 Epidemiologia.....	15
2.1.2 Fisiopatologia.....	15
2.1.3 Quadro clínico.....	18
2.1.4 Diagnóstico.....	20
2.1.5 Tratamento.....	23
2.2 A GENÉTICA DA PERDA AUDITIVA INDUZIDA POR RUÍDO	23
2.2.1 Descoberta de Genes da PAIR em Humanos.....	23
2.2.1.1 Estudos de Associação do Genoma Inteiro.....	25
2.2.1.2 Genes de Estresse Oxidativo.....	26
2.2.1.3 Genes do Ciclo do Potássio.....	29
2.2.1.4 Formas Monogênicas de Surdez.....	32
2.2.1.5 Outros genes.....	33
2.2.2 Descoberta dos Genes da PAIR em Camundongos.....	35
2.3 REFERÊNCIAS DA BASE TEÓRICA.....	50
3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	67
4. OBJETIVOS	67
4.1 OBJETIVO GERAL.....	67
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA — Análise de variância

CAT — Catalase

CCE — Células ciliadas externas

CCI — Células ciliadas internas

CDH23 — Caderina 23

Cx26 — Conexina 26

dB — Decibel

DCLK1 — *Doublecortin-like kinase 1*

DFNA4 — Deficiência auditiva autossômica dominante em humanos (*deafness, autosomal dominant 4*)

DFNB12 — Deficiência auditiva autossômica recessiva (*deafness, autosomal recessive 12*)

dfw — *deaf waddler*

EMMA — *Efficient Mixed-Model Association*

EOAs — Emissões otoacústicas

EOAPD — Emissões otoacústicas por produto de distorção

EPI — Equipamento de proteção individual

eQTL — *Locus* de traço quantitativo de expressão (*expression quantitative trait locus*)

Fabp3 — Proteína de ligação a ácidos graxos (*fatty acid-binding protein 3*)

GADD45-beta — *Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta*

GJB2 — *Gap junction beta-2*

GPX1 — Glutaciona peroxidase

GRM7 — *Glutamate receptor, metabotropic, 7*

GRM8 — *Glutamate receptor, metabotropic, 8*

GSH — Glutaciona reduzida

GSR — Glutaciona redutase

GSSG — Glutaciona dissulfato

GST — Glutaciona S-transferase

GTM — *Genome-tagged mice*

GWAS — Estudos de associação do genoma inteiro (*genome-wide association studies*)

HDL — Lipoproteína de alta densidade (*high-density lipoprotein*)

HMDP — *Hybrid Mouse Diversity Panel*

HSF1 — Fator de transcrição de choque térmico (*heat-shock transcription factor*)

HSPs — Proteínas de choque térmico (*heat-shock proteins*)

Hz — Hertz

IRF — Índice de reconhecimento de fala

KCNE1 — Canal de potássio voltagem-dependente, subfamília E, membro 1

KCNJ10 — Canal de potássio retificador de influxo, subfamília J, membro 10

KCNQ1 — Canal de potássio voltagem-dependente, subfamília KQT, membro 1

KCNQ4 — Canal de potássio voltagem-dependente, subfamília KQT, membro 4

KIM-1 — Molécula de lesão renal-1 (*kidney injury molecule-1*)

LRF — Limiar do reconhecimento de fala

mdfw — *Modifier deaf waddler*

mGluR7 — *Metabotropic glutamate receptor type 7*

MYH14 — Miosina 14

NADPH — Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NOX NADPH — Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase não fagocítica

NPS — Nível de pressão sonora

NS SNP — Polimorfismo de base única não sinônimo

PAIR — Perda auditiva induzida por ruído

PBS — *Phosphate buffer saline*

PCA — Programa de Conservação Auditiva

PCDH15 — Protocaderina 15

PCR — Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PEATE — Potencial evocado auditivo de tronco cerebral

PTPRD — *Protein tyrosine phosphatase, receptor type, D*

PTS — mudança permanente do limiar (*permanent threshold shift*)

QTL — *Locus* de Traço Quantitativo (*Quantitative Trait Locus*)

RNA-seq — Sequenciamento massivo de RNA (*RNA sequencing*)

RT-PCR — Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa (*reverse transcription polymerase chain reaction*)

SLC12A2 — Membro 2 da família 12 de carreador de soluto

SNP — Polimorfismo de Base Única (*Single Nucleotide Polymorphism*)

SNR — Relação sinal-ruído (*signal-to-noise ratio*)

SOD1 — Superóxido dismutase 1

SOD2 — Superóxido dismutase 2

TRPVA1 — Receptor de potencial transiente vaniloide do tipo 1 (*transient receptor potential vanilloid 1*)

TRPVA4 — receptor de potencial transiente vaniloide do tipo 4 (*transient receptor potential vanilloid 4*)

TTS — Mudança temporária do limiar (*temporary threshold shift*)

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o *Centers for Disease Control* (CDC) até 25% da população americana adulta pode desenvolver Perda Auditiva Induzida pelo Ruído (PAIR) no decorrer de sua vida (1). Além do problema humano, caracterizado pela perda auditiva, zumbido, perturbação do sono, etc., o impacto econômico gerado pela PAIR é considerável. A *American Tinnitus Association* (ATA) estima custos anuais de US\$ 1,2 bilhão relacionados à PAIR (2).

Nas últimas décadas, diversos estudos forneceram evidências da contribuição genética na PAIR em humanos. Estudos que avaliaram o componente genético da PAIR em gêmeos demonstraram cerca de 36% de herdabilidade (3). Elucidar os efeitos genéticos específicos é fundamental para a compreensão de doenças complexas como a PAIR, pois permitirá no futuro abordagens específicas em indivíduos suscetíveis. Em humanos, as interações gene-ambiente ($G \times A$) estão sendo consideradas, mas poucos estudos foram replicados até o momento (4).

Uma grande dificuldade em estudos da PAIR em humanos é a incapacidade de controlar e quantificar as exposições ambientais de forma consistente, o que leva à falta de populações bem caracterizadas e monitoradas para estudo (4). Atualmente vários estudos tem avaliado a genética da PAIR, principalmente após o início da utilização de modelos animais nas pesquisas da área.

No passado, estudos com modelos animais já demonstraram que camundongos de diferentes linhagens apresentaram suscetibilidades variadas ao ruído, utilizando diferentes métodos eletrofisiológicos para estimar o limiar auditivo dos animais (5). Um

exemplo foi o estudo de Erway et al, em que camundongos da raça C57BL/6J foram mais suscetíveis ao ruído do que as demais. Outros trabalhos também demonstraram que camundongos *knockout* testados por *Auditory Brainstem Response (ABR)* SOD1 - / - (6), GPX1 - / - (7), PMCA2 - / - (8) foram mais sensíveis ao ruído do que seus companheiros de ninhada do tipo selvagem. Além disso, camundongos CDH23 + / - também foram mais suscetíveis ao ruído que os demais, com seus limiares testados através de potencial de ação composto (CAP - Limiares de potencial de ação composto) (9).

Lavinsky et al., por meio de um *Genome Wide Association Study (GWAS)* mapearam vários loci para suscetibilidade a PAIR em linhagens consanguíneas de camundongos usando *ABR*. Um pico estatisticamente significativo no cromossomo 17 foi evidenciado dentro de um bloco de haplótipos contendo NADPH oxidase-3 (Nox3), fornecendo evidências para apoiar seu papel na suscetibilidade à PAIR (4).

O uso de animais, como camundongos, pode ser um método válido para o estudo da perda auditiva devido à semelhança de sua orelha interna com o humano. Existe a possibilidade de criação de um ambiente controlado em laboratório, com exposição idêntica das cobaias ao ruído, evitando fatores de confusão. Isso permite, com a análise dos limiares auditivos pré e pós exposição ao ruído, em diferentes linhagens de camundongos, quantificando o exato papel da genética na PAIR. Atualmente os estudos do tipo *GWAS* proporcionam o cruzamento de dados genotípicos e fenotípicos de camundongos híbridos de variadas linhagens que formam uma coleção previamente genotipada e catalogada, o *Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP)*.

Com base nessas evidências, nosso estudo tem como objetivo buscar outros fenótipos auditivos baseados nas Emissões Otoacústicas por Produto de Distorção (EOAPD). Este método avalia os limiares auditivos através da função das células ciliadas externas da cóclea, que podem ser afetadas precocemente na exposição ao ruído. Essa é uma abordagem potencialmente promissora, pois avalia através de um método eletrofisiológico inédito, camundongos do *HMDP* através de um *GWAS* antes e após exposição ao ruído.

1.1. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

1. Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *J Neurosci*. 2009;29(45):14077-85. doi:10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009.
2. Yankaskas K. Prelude: noise-induced tinnitus and hearing loss in the military. *Hear Res*. 2013Jan;295:3-8. doi: 10.1016/j.heares.2012.04.016.
3. Heinonen-Guzejev M, Vuorinen HS, Mussalo-Rauhamaa H, Heikkilä K, Koskenvuo M, Kaprio J. Somatic and psychological characteristics of noise-sensitive adults in Finland. *Arch Environ Health*. 2004;59(8):410-417. doi:10.3200/AEOH.59.8.410-417.
4. Lavinsky J, Crow AL, Pan C, et al. Genome-wide association study identifies *nox3* as a critical gene for susceptibility to noise-induced hearing loss [published correction appears in *PLoS Genet*. 2015 Jun;11(6):e1005293]. *PLoS Genet*. 2015;11(4):e1005094. Published 2015 Apr 16. doi:10.1371/journal.pgen.1005094

5. M. Sliwinska-Kowalska, M. Pawelczyk. Contribution of genetic factors to noise-induced hearing loss: a human studies review *Mutat. Res.*, 752 (2013), pp. 61-65. doi:10.1016/j.mrrev.2012.11.001
6. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, et al. Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (Sod1) increases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Audiol Neurotol.* 1999;4(5):237-246. doi:10.1159/000013847
7. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Lear PM, Ho YS. *Assoc Res Otolaryngol.* 2000;1(3):243-254. doi:10.1007/s101620010043
8. Kozel PJ, Davis RR, Krieg EF, Shull GE, Erway LC (2002) Deficiency in plasma membrane calcium ATPase isoform 2 increases susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear Res* 164: 231 –239. doi:10.1016/s0378-5955(01)00420-8
9. 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(1):66-79. doi:10.1007/s10162-003-4021-2

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PERDA AUDITIVA INDUZIDA POR RUÍDO

2.1.1 Epidemiologia

A Perda Auditiva Induzida por Ruído (PAIR) é uma das principais causas de perda auditiva na população mundial. Estima-se que um terço de todos os casos de perda auditiva sejam causados pela PAIR, sendo a segunda causa mais frequente de perda auditiva, após a presbiacusia (1) (2). De todas as etiologias envolvidas nas perdas auditivas, a mais comumente evitável é a PAIR. Estima-se que até 12% da população mundial esteja suscetível a PAIR, o que corresponde a aproximadamente 600 milhões de pessoas (3).

2.1.2 Fisiopatologia

A exposição danosa ao ruído acomete a audição lesando estruturas da orelha interna e causando dano neurosensorial, tanto à cóclea quanto aos neurônios auditivos primários (4) (5). Os efeitos deletérios do ruído ocorrem tanto na exposição laboral quanto recreacional a níveis elevados de energia acústica. O trauma acústico responsável pela lesão das estruturas da orelha interna está associado a dois padrões de dano, dependendo da intensidade e da duração da exposição.

No caso de alteração temporária do limiar auditivo (chamado *TTS - Temporary Threshold Shift*), geralmente ocasionado por lesões agudas e de alta intensidade sonora, a lesão auditiva ocorre, porém após algum tempo, os limiares auditivos voltam ao valor basal, pela recuperação da função coclear. Em situações específicas essa recuperação não acontecerá, ocasionando mudança permanente do limiar auditivo (chamado *PTS -*

Permanent Thresholds Shift). Na ocorrência de traumas repetidos do tipo *TTS*, ocorrerá *PTS*, tipicamente notado na PAIR (6).

A recuperação dos limiares auditivos basais pós *TTS* é provavelmente o resultado do desacoplamento reversível entre os estereocílios das células ciliadas externas e a membrana tectorial (7) e/ou aumento reversível do ganho central/hiperacusia e zumbido associados (8). No entanto, mesmo quando há recuperação dos limiares tonais auditivos basais, pode haver dano considerável nas sinapses cocleares, denominada sinaptopatia coclear (4) (9). A sinaptopatia resulta na perda de conexões entre as células ciliadas internas e seus neurônios aferentes na fase aguda do trauma coclear induzido por ruído (4) (10), sendo provavelmente o resultado da excitotoxicidade do neurotransmissor glutamato, causando danos às terminações nervosas pós-sinápticas (11). Isso também é chamado de perda auditiva oculta induzida por ruído, pois não é acompanhada por uma mudança de limiar auditivo (9).

Embora seja desconhecida a extensão em que a sinaptopatia contribui para a PAIR, argumenta-se que esses mecanismos semelhantes à sinaptopatia que ocorrem em certos tipos de neuropatia auditiva, estão envolvidos na PAIR (11). Isso também é apoiado por pesquisas em animais que mostram células ciliadas intactas, mas extensa perda de neurônios do gânglio espiral da cóclea, induzida por ruído (4).

A perda de células ciliadas externas, degeneração das fibras nervosas cocleares e formação de tecido cicatricial (zonas mortas) no órgão de Corti são responsáveis pela perda auditiva irreversível na *PTS* (12). Uma característica crucial da perda de células ciliadas por qualquer causa (ruído, medicamentos ototóxicos, idade) é a incapacidade das células sensoriais de mamíferos se regenerarem (13).

Dependendo da intensidade e duração do ruído, todo o órgão de Corti pode ser rompido (12). A destruição do órgão de Corti pode ser o resultado de dois mecanismos: destruição mecânica por exposição curta a intensidades extremas de ruído ou descompensação metabólica após exposição a ruído por um longo período de tempo (14).

A destruição mecânica é adquirida pela exposição a intensidades de ruído acima do nível de pressão sonora de 130 dB (NPS), levando à desassociação do órgão de Corti da membrana basilar, interrupção das junções celulares e mistura de endolinfa e perilinfa (15).

A descompensação metabólica gera interrupção dos estereocílios, núcleos e mitocôndrias aumentadas, vesiculação citoplasmática e vacuolização (16) (17). Acredita-se que sua causa seja tanto a formação de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ERO) quanto a excitotoxicidade do glutamato, evocadas pela estimulação excessiva do ruído, seguidas pela ativação de vias de sinalização que levam à morte celular (18). As EROs emergem imediatamente após a exposição ao ruído e persistem por 7 a 10 dias depois, espalhando-se apicalmente da extremidade basal do órgão de Corti, ampliando assim a área de necrose e apoptose (18) (19). O glutamato é o neurotransmissor excitatório que em altos níveis de podem superestimular as células pós-sinápticas e causar edema dos corpos celulares e dendritos (20).

Outra consequência metabólica da exposição ao ruído é o aumento de cálcio livre (Ca^{2+}) nas células ciliadas externas imediatamente após a superestimulação acústica, contribuído tanto pela entrada pelos canais iônicos quanto pela liberação das reservas intracelulares (21). A sobrecarga de Ca^{2+} também pode desencadear vias de

morte celular apoptótica e necrótica, independentemente da formação de ERO (22). Existe um risco significativo de desenvolver PAIR após exposição crônica a ruído acima de 85 dB por pelo menos 8 horas ao dia. Quanto maior a intensidade do ruído, menor o período suficiente para desenvolver PAIR. A Norma Regulamentadora n.º 15 (NR-15), da Portaria do Ministério do Trabalho (MTb) n.º 3.214/1978 (BRASIL, 1978), estabelece os limites de exposição a ruído contínuo (tabela 1).

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

2.1.3 Quadro Clínico

O sintoma mais evidente da PAIR é a perda auditiva, a qual pode estar acompanhada do zumbido. Esses sintomas podem variar em função de período de exposição, nível de pressão sonora e susceptibilidade individual. A hipoacusia costuma ser bilateral e simétrica, sendo dificilmente de caráter profundo. Os valores de discriminação auditiva estão dentro dos níveis normais ou levemente alterados. Assim como na perda auditiva, o zumbido tem intensidade variável, frequentemente é bilateral e pode estar presente em pelo menos metade dos pacientes com PAIR (23). Algiacusia e plenitude aural podem estar presentes no quadro clínico. Em fases iniciais de exposição ao ruído, antes mesmo da hipoacusia, podem ocorrer sintomas temporários de zumbido,

Tabela 1: Limites de tolerância para ruído contínuo ou intermitente. Fonte: NR-95 - Ministério do Trabalho (MTb) n. 3214/1978 (BRASIL, 1978).

Nível de ruído dB (A)	Máxima exposição diária permissível
85	8 horas
86	7 horas
87	6 horas
88	5 horas
89	4 horas e 30 minutos
90	4 horas
91	3 horas e 30 minutos
92	3 horas
93	2 horas e 40 minutos
94	2 horas e 15 minutos
95	2 horas
96	1 hora e 45 minutos
98	1 hora e 15 minutos
100	1 hora
102	45 minutos
104	35 minutos
105	30 minutos
106	25 minutos
108	20 minutos
110	15 minutos
112	10 minutos
114	8 minutos
115	7 minutos

cefaléia e tontura, e posteriormente, após meses a anos de exposição há uma intensificação do zumbido e uma leve redução da discriminação auditiva, especialmente no ruído. A progressão da perda auditiva é interrompida na medida em que o indivíduo se afasta da exposição ao ruído, porém a lesão coclear é irreversível e as sequelas são permanentes.

Manifestações extra-auditivas podem ocorrer no decorrer da doença, como: comportamentais (isolamento social, irritabilidade, dificuldade de concentração), neurológicas (sono, tremores, cefaleia e náusea), digestivas (dor abdominal e gastrites) e alterações vestibulares. O exame clínico pode demonstrar alterações cardiovasculares (aumento da pressão arterial e taquicardia) e metabólicas (aumento do cortisol, glicemia e adrenalina) (24).

2.1.4 Diagnóstico

A avaliação diagnóstica dos casos suspeitos de PAIR deve incluir tanto a anamnese clínica convencional quanto a anamnese ocupacional. Além da anamnese, o exame físico otorrinolaringológico e exames complementares fazem parte da investigação clínica da PAIR.

A anamnese convencional deve obedecer os passos de investigação das perdas auditivas neurossensoriais, incluindo os seguintes aspectos: período de evolução dos sintomas, histórico de intercorrências neonatais, infecções (sarampo, caxumba, meningite), uso de drogas ototóxicas, otites, trauma, doenças metabólicas (diabetes, hipotireoidismo, dislipidemias), histórico familiar de perda auditiva e hábitos de vida (tabagismo, alcoolismo). Além disso, os pacientes devem ser questionados sobre o uso

de arma de fogo e instrumentos musicais, além de exposição ao ruído em atividades recreativas (danceterias, shows).

Um passo importante na avaliação diagnóstica da PAIR é a anamnese ocupacional. Deve-se questionar sobre todas as atividades profissionais realizadas, tipos de máquinas usadas, tempo de exposição diária ao ruído, exposição a produtos químicos, histórico de acidentes e utilização de proteção auditiva individual (24).

O exame físico otorrinolaringológico completo deverá ser realizado na investigação da PAIR com especial atenção para a otoscopia e a acumetria com testes de Rinne e Weber. O principal exame complementar para o diagnóstico da PAIR é a audiometria tonal aéreo-óssea. Além da audiometria tonal, é importante investigar o limiar do reconhecimento de fala (LRF), o índice de reconhecimento de fala (IRF) e a pesquisa de recrutamento auditivo.

Em determinadas situações, como na suspeita de simulação, podem ser solicitados os potenciais evocados auditivos de tronco cerebral (PEATE) e as emissões otoacústicas (EOA). A audiometria ocupacional (somente via aérea) pode ser utilizada no acompanhamento e no controle de perda auditiva; porém, não fornece diagnóstico da PAIR, pois a falta da via óssea não permite a identificação de lesão neurossensorial. Independentemente do tipo de exame audiométrico, é importante o repouso auditivo de pelo menos 14 horas antes da realização do exame, para afastamento de possibilidade de se tratar de *TTS*.

O primeiro sinal audiométrico da PAIR é o aparecimento da gota acústica com comprometimento dos limiares nas frequências de 3.000, 4.000 ou 6.000 Hz, sendo

restaurado em 8.000 Hz. O fato de frequências em torno de 4 kHz serem mais afetadas pelo ruído é provavelmente devido à frequência de ressonância da orelha externa / canal auditivo, bem como às propriedades mecânicas da orelha média (25). Nos estágios iniciais da PAIR, a média dos limiares em 500, 1.000 e 2.000 Hz são melhores que a média em 3.000, 4.000 e 6.000 Hz, e os limiares em 8.000 Hz são melhores que o ponto mais profundo da gota acústica.

A PAIR dificilmente produz uma perda auditiva superior a 75 dB nas altas frequências e 40 dB nas baixas frequências. Porém quando os dados individuais são revisados, a perda auditiva neurossensorial severa à profunda é documentada em indivíduos expostos ao ruído, com uma prevalência variando de 1 a 15%, bem acima da prevalência na população em geral nos Estados Unidos (0,5%) e Reino Unido (0,7%) (26) (27) (28).

A ampla faixa de prevalência de perda auditiva severa à profunda encontrada em estudos de populações expostas ao ruído pode ser influenciada por fatores genéticos subjacentes ou diferenças na intensidade, tipo e duração da exposição ao ruído. Por exemplo, a perda neurossensorial pode progredir para severa ou profunda com durações prolongadas de exposição ao ruído (29) (30), especialmente no ruído de impacto (31). A velocidade de perda auditiva em função da PAIR é maior nos primeiros 10-15 anos de exposição, reduzindo essa velocidade à medida em que há um agravamento da perda auditiva (30).

2.1.5 Tratamento

Sendo a PAIR uma doença irreversível, atualmente não dispomos de tratamentos medicamentosos ou cirúrgicos que possam modificar sua história natural. A reabilitação auditiva continua sendo o tratamento de escolha, quando as perdas são mais severas e sintomáticas.

O enfoque atual na PAIR deve ser realizado na prevenção da doença no âmbito do ambiente de trabalho. Campanhas que possam orientar a população geral quanto aos malefícios do ruído intenso em seu dia-a-dia também são métodos possíveis de prevenção. Profissionais de saúde devem ser treinados em reconhecer os sinais precoces da PAIR e realizar práticas de orientação quanto à saúde auditiva principalmente em populações de maior risco.

Programas de prevenção são fundamentais e devem ser incentivados. Órgãos governamentais instituíram o Programa de Conservação Auditiva (PCA) (32). Esse programa envolve o reconhecimento e a avaliação dos riscos para a audição, gerenciamento audiométrico, medidas de proteção coletiva, medidas de proteção individual (EPI), educação e motivação, gerenciamento de dados e avaliação do programa.

2.2 A GENÉTICA DA PERDA AUDITIVA INDUZIDA POR RUÍDO

2.2.1 Descoberta de Genes da PAIR em Humanos

A descoberta de fatores genéticos que predisõem à PAIR em humanos tem encontrado muitas dificuldades. Até hoje, não existem estudos de hereditariedade

realizados, já que é impossível coletar dados em famílias em que todos os indivíduos são expostos a condições idênticas de exposição ao ruído. Existem algumas técnicas alternativas em que as variantes causais podem ser estudadas através de genes candidatos, sendo cuidadosamente selecionados com base na informação relacionada à sua função biológica. Isso abriu oportunidades para uma análise da possibilidade de esses genes aumentarem a susceptibilidade à PAIR numa base populacional através de estudos de associação.

Os estudos genéticos de susceptibilidade à PAIR em humanos são limitados pelas dificuldades em avaliar de forma precisa o efeito cumulativo do ruído nos indivíduos. Os trabalhadores da indústria que atuam por muitos anos na mesma atividade são os indivíduos ideais para estudos de associação do genoma inteiro, especialmente em função de que, nessas indústrias, o grau de exposição ao ruído é cuidadosamente monitorado. Entretanto, o uso de protetores auditivos e a consistência da sua utilização pode diferir entre os trabalhadores numa mesma indústria. Além disso, a variação entre os tipos, dose, padrões e duração da exposição ao ruído em diferentes indústrias, dificulta a avaliação do efeito cumulativo da exposição ao ruído, especialmente entre os trabalhadores que mudam frequentemente de emprego.

Além da PAIR relacionada ao trabalho, a exposição ao ruído recreacional (como caçadas, música por fones de ouvido, uso de ferramentas) é mais difícil de ser medida. Os estudos sobre PAIR, em indivíduos afastados de atividades industriais, devem confiar somente no relato individual através de questionários padronizados, o que pode gerar um viés de aferição. O envelhecimento e fatores ambientais (drogas, poluentes) podem também ser considerados fatores de confusão nos estudos genéticos de PAIR em

humanos. Muitas vezes, é difícil distinguir a presbiacusia da PAIR. A PAIR pode ser distinguida da presbiacusia através de um pico negativo na frequência específica de 4 kHz da audiometria. Entretanto, com a progressão da PAIR, esse pico negativo se espalha e dificulta a diferenciação com a presbiacusia.

Finalmente, em relação aos questionários, frequentemente os indivíduos não conhecem ou não se lembram se foram expostos a drogas ototóxicas durante a sua vida. Além dos trabalhadores da indústria, a população de militares é passível de investigação sobre a suscetibilidade à PAIR. Entretanto, os resultados provavelmente serão diferentes entre essas duas populações. Enquanto os trabalhadores da indústria estão tipicamente expostos a ruídos contínuos em intervalos de frequência específica, os militares são expostos a um ruído descontínuo e explosivo.

2.2.1.1 Estudos de associação do genoma inteiro

Os estudos de associação do genoma inteiro (*GWAS - genome wide association study*) têm sido utilizados de forma bem-sucedida nos últimos 10 anos para identificar múltiplos genes que interagem e contribuem para o fenótipo da doença. Em estudos de associação do genoma inteiro de larga escala, o DNA de milhares de indivíduos diagnosticados com uma doença específica e o DNA de indivíduos não afetados (controles) são rastreados e pareados, utilizando chips de DNA que contém entre 3.000 e 5.000 dos polimorfismos mais informativos no genoma humano. Isso possibilita ao pesquisador identificar polimorfismos associados a doenças específicas. Essas novas ferramentas facilitam a identificação de genes para doenças complexas, já que pequenas alterações em diversos genes podem contribuir para o fenótipo final (33).

A confiabilidade desses achados pode ser verificada através da replicação dessa descoberta em uma segunda população, não relacionada (34). Os controles envolvem uma análise semelhante através de diferentes grupos étnicos (Europa Oriental, África e Ásia), já que alguns polimorfismos apresentam maiores frequências em alguns grupos étnicos específicos e são menos informativos em estudos de associação. Em função da grande quantidade de amostras de DNA e polimorfismos, os *GWAS* têm sido muito caros. Entretanto, o desenvolvimento de banco de dados com a já conhecida frequência de alelos de polimorfismos (www.hapmap.org) e a disponibilidade de métodos de genotipagem massiva (como os chips de DNA) tornam os *GWAS* mais factíveis.

Nos últimos 15 anos, tem sido observado um grande aumento no número de *GWAS* com o objetivo de identificar genes relacionados a susceptibilidade à PAIR. Centenas de polimorfismos foram rastreados em genes envolvidos em diferentes mecanismos e estruturas da orelha interna. Nesse sentido, foram classificados em genes de estresse oxidativo, rotas de reentrada de potássio, genes monogênicos de surdez, genes das proteínas *heat shock* e outros genes.

2.2.1.2 Genes de Estresse Oxidativo

A cóclea é um órgão metabolicamente ativo. O estresse oxidativo apresenta um papel central na patogênese da PAIR. As células ciliadas demandam uma grande quantidade de energia durante e após a exposição ao ruído. Por isso, subsequentemente, existe uma prolongada liberação de radicais livres (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio), gerando dano ao epitélio coclear, especialmente se o sistema de defesa antioxidante não for suficiente para neutralizar essa agressão. Existem dois grupos de enzimas antioxidantes que são ativas na cóclea.

O primeiro grupo compreende enzimas envolvidas no metabolismo da glutathiona, incluindo a glutathiona S-transferase (GST), glutathiona peroxidase (GPX1) e a glutathiona redutase (GSR). As classes GST compreendem os genes GSTM1 e GSTT1, que demonstram uma grande variabilidade genética em humanos. Até 50% da população caucasiana não apresenta o genótipo para o gene GSTT1 (35).

O segundo grupo de enzimas antioxidantes inclui as enzimas envolvidas na quebra dos ânions superóxido e peróxido de hidrogênio (catalase-CAT, superóxido dismutase 1 – Cu/Zn SOD1, superóxido dismutase 2 – SOD2 mitocondrial e paraxonase/arilesterase 2 sérica –PON2). Os resultados dos estudos de associação entre as variações nos genes de estresse oxidativo e a susceptibilidade à PAIR são ambíguos.

Wang et al. avaliaram através de uma metanálise a associação entre o polimorfismo C47T do gene SOD2 com a PAIR. Três estudos elegíveis compondo 1094 indivíduos chineses foram incluídos. Não foi encontrada associação significativa entre esse polimorfismo e PAIR na população estudada (36).

Em um estudo com trabalhadores suecos (103 susceptíveis e 114 resistentes ao ruído selecionados de um banco de dados com mais 1.200 trabalhadores), nenhum dos sete genes relacionados ao estresse oxidativo (GSTM1, GSST1, CAT, SOD, GPX, GSR e GSTP1) foram associados à PAIR. Entretanto, os mesmos autores demonstraram que o efeito do tabagismo na susceptibilidade à PAIR é dependente da presença da deleção do gene GSTM1. Essa relação sugere uma interação entre os genes e fatores ambiental na susceptibilidade à PAIR (37).

Em função da evidência de que o estresse oxidativo pode ser um mecanismo subjacente à PAIR, a associação entre a CAT e a PAIR foi novamente analisada em duas grandes populações independentes (Suécia, Polônia). Além dos três polimorfismos originais, nove variantes adicionais foram genotipadas a fim de ampliar a cobertura do gene em estudo. Além disso, foi realizada uma análise estatística mais detalhada, levando em consideração as interações entre os genótipos com os níveis de exposição ao ruído. Os autores identificaram associações significativas para os dois polimorfismos em ambas as amostras populacionais. Essa análise sugeriu que o genótipo pode apresentar efeito diferencial na susceptibilidade ao ruído, considerando os níveis de exposição ao ruído (38).

Um estudo duplo-cego com 53 trabalhadores tratados com n-acetilcisteína apoiou a hipótese de que indivíduos portadores dos genótipos nulos nos genes GSTT1, GSTM1 e GSTP1 são mais susceptíveis à PAIR (39). Porém um estudo caso-controle recente publicado por Loukzadeh et al. avaliou polimorfismos dos genes GSTT1 e GSTM1 e não encontrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (40).

Outro estudo recente realizado em população Chinesa, avaliou por regressão logística a interação entre o nível de exposição ao ruído e os genótipos do CAT. Entre os 6 *SNPs* estudados, dois foram associados ao nível de exposição ao ruído. Um *SNP* (rs208679) foi associado ao risco de PAIR em nível de exposição sonora mais baixo (<85dB), e outro genótipo (rs769217) foi associado à exposição mais elevadas (85-92dB) (41).

2.2.1.3 Genes do Ciclo do Potássio

As células sensoriais da orelha interna são banhadas por endolinfa, que é o líquido extracelular enriquecido por íons de potássio que preenche a escala média da cóclea. O potássio é a principal carga que atua na transdução sensorial, sendo esse ciclo do potássio fundamental para o processo de audição. Esses íons são secretados na endolinfa pela estria vascular, entram nas células ciliadas através de canais apicais mecanossensíveis ao potássio e saem dessas células através da membrana basolateral. Finalmente, migram por meio das células de suporte e de fibrócitos em direção a estria vascular através das junções gap (42).

Os genes envolvidos no ciclo do potássio são essenciais para o processo de audição. Isso está evidenciado através de múltiplas mutações desses genes (GJB2, GJB3, GJB6, KCNE1, KCNQ1 e KCNQ4), as quais podem gerar formas de perda auditiva síndrômica e não síndrômica (43)(44). Além disso, camundongos deficientes para os genes SLC12A2 e KCNJ10 desenvolvem perda auditiva em função do colapso dos espaços endolinfáticos e incapacidade de gerar potencial endococlear, respectivamente (45)(46). As variantes dos genes do ciclo do potássio têm sido analisadas para explicar a variabilidade individual à susceptibilidade ao ruído.

O primeiro estudo de associação sobre os genes que atuam no ciclo do potássio foi realizado numa população finlandesa. Esse estudo separou os 10% de indivíduos mais resistentes (classificados como resistentes ao ruído) e os 10% de indivíduos menos resistentes ao ruído (classificados como susceptíveis ao ruído) numa amostra de 1.200 trabalhadores expostos ao ruído de acordo com a regulamentação ISSO 1999 (37). Esse grupo estudou se os portadores da mutação 35delG no gene GJB2 são mais sensíveis ao

desenvolvimento da PAIR. Entretanto, não foi verificada diferença entre os indivíduos resistentes e susceptíveis à PAIR. A ausência de significância em relação à incidência dos portadores foi confirmada em uma população polonesa. Foi realizado um estudo com 3.000 trabalhadores expostos ao ruído com graus de susceptibilidade ao ruído semelhante entre os dois extremos do espectro fenotípico (47).

O estudo de associação seguinte foi realizado em uma amostra sueca e envolveu 35 *SNPs* em 10 genes que controlam o ciclo do potássio na orelha interna. Foram cinco genes da família da conexina, como Cx26 (GJB2), Cx30 (GJB6), Cx30.3 (GJB4), Cx31 (GJB3) Cx32 (GJB1); quatro genes de canais ou subunidades de potássio como KCNJ10, KCNQ4, KCNE1, KCNQ1; e um gene do cotransporte da bomba de sódio e potássio, como o SLC12A2. Associações significativas com PAIR foram observadas para três polimorfismos no KCNE1, um polimorfismo no KCNQ1 e um polimorfismo no KCNQ4. Isso sugere que esses são os primeiros genes envolvidos com a susceptibilidade à PAIR. Um dos polimorfismos do gene KCNE1 (D85N) tem sido testado em células ovarianas de hamsters chineses. Existe a hipótese de que a variante 85N possa levar a uma maior concentração de potássio e, como consequência, possa determinar um aumento da susceptibilidade ao ruído no órgão de Corti (48).

Uma análise semelhante, porém com maior número de polimorfismos (total de 99), foi realizada numa população polonesa (49). Nesse estudo, associações significativas foram encontradas em sete de um total de 10 genes (KCNE1, KCNQ4, GJB1, GJB2, GJB4, KCNJ10, KCNQ1). Os resultados mais interessantes foram obtidos nos genes KCNE1 e KCNQ4. Esses achados foram replicados pelos autores nos mesmos polimorfismos que foram previamente publicados na amostra sueca (rs2070358

e Q455H, respectivamente). A direção dessa tendência genética para o KCNE1 foi a mesma em ambas as populações, mas oposta para o KCNQ4. Isso pode ser explicado, teoricamente, por diferenças nas frequências dos alelos ou nos padrões de desequilíbrio de ligação em ambas as populações. Houve uma discreta diferença nos procedimentos de seleção entre os estudos, influência de diversos fatores ambientais ou associações falso-positivas com a PAIR.

Recentemente um estudo avaliou a associação da variação genética no KCNQ4 e PAIR numa população Chinesa. Foram comparados três polimorfismos - rs709688, rs2769256 e rs4660468 - em indivíduos expostos ao ruído com e sem PAIR. Diferença significativa foi observada no *SNP* rs4660468 do KCNQ4, sugerindo como possível marcador de susceptibilidade para PAIR nessa população (50).

Uma análise estendida de 644 polimorfismos em 53 genes candidatos foi realizada em duas populações independentes (sueca e polonesa). As associações positivas foram demonstradas para dois genes, um que codifica a protocaderina 15 (PCDH15) e outra que codifica a miosina 14 (MYH14) (51). Um polimorfismo na PCDH15 resultou em associações significativas em ambas as populações. Dois polimorfismos no gene MYH14 resultaram numa associação positiva na amostra polonesa e em uma interação significativa com exposição ao ruído na amostra sueca.

As caderinas, conhecidas por caderina 23 e protocaderina 15, são moléculas que formam as ligações entre as células ciliadas sensoriais da cóclea e são essenciais para a transdução mecanoelétrica (52). Foi demonstrado que a mutação da CDH23 quebra a organização dos esterocílios, gerando perda auditiva e disfunção vestibular em camundongos waltzer. A variante 753^a desse gene foi correlacionada com a

susceptibilidade à PAIR (53). Um estudo caso-controle recente realizado por Zhang et al. na China encontrou o CDH23 como gene candidato na PAIR em humanos (54).

A MYH14 codifica uma das proteínas da superfamília miosina. São proteínas motoras actina-dependentes que regulam a motilidade e a polaridade das células ciliadas da cóclea. A mutação na MYH14 resulta em deficiência auditiva autossômica dominante em humanos (DFNA4).

O gene *EYA4* é fundamental para o desenvolvimento estrutural da orelha interna, que inclui vesícula ótica, membrana de Reissner e epitélio sensorial do sistema vestibular. Além disso acreditava-se que o gene *EYA4* regulando a bomba Na^+/K^+ ATPase seria a chave para o desenvolvimento das células mecanossensoriais da cóclea. Em humanos a deleção desse gene é responsável por uma perda auditiva neurossensorial não síndrômica. (55) (56). Um estudo caso-controle avaliou mutações no gene *Eya4* em metalúrgicos, encontrando evidências de associação do seu polimorfismo rs3813346 com a PAIR (57).

Outros dois trabalhos realizados por Zhang et al. (2015) e Zhang et al. (2019) também encontraram correlações positivas do gene *EYA4* com PAIR em população chinesa (58) (54).

2.2.1.4 Formas Monogênicas de Surdez

As *heat-shock proteins* (HSPs) formam um grupo de proteínas que atuam na síntese, construção e transporte celular de diversas outras proteínas, sendo expressas em condições fisiológicas e patológicas. O HSP70 é distribuído na orelha interna e tem o potencial de proteger a audição contra ruídos, drogas ototóxicas ou lesões (59). A

superexpressão do HSP70 pode proteger significativamente as células ciliadas da orelha interna da morte celular causada por aminoglicosídeos (60). Em situações como exposição a níveis sonoros moderados, podem proteger o ouvido da exposição excessiva ao ruído (61) (62). Um total de três genes são responsáveis pelas HSPs, especialmente o HSP70-1, HSP70-2 e o HSP70-hom. Esses genes são induzidos pelo calor, exceto o HSP70-hom.

Uma meta-análise recente avaliou a associação entre os polimorfismos do *HSP70* (rs1043618, rs1061581, rs2075800, rs2227956 e rs2763979) e risco de PAIR em populações chinesa e caucasiana. Um total de cinco estudos foram incluídos nessa revisão e após análise de subgrupos por etnia, foram observadas associações significativas entre os polimorfismos rs1061581 e rs2227956 do HSP70 e susceptibilidade à PAIR em indivíduos caucasianos do sexo masculino (63).

2.2.1.5 Outros genes

Os genes DNMT1 e DNMT3A atuam primariamente mantendo padrões de metilação do DNA e preservando as informações epigenéticas através das gerações celulares subsequentes além de estabilizar novos padrões de metilação. Um estudo caso-controle avaliou polimorfismos dos genes DNMT1 e DNMT3A e sua associação com a PAIR. Foram avaliados quatro polimorfismos dos genes em população chinesa exposta ao ruído. Três polimorfismos: rs749131, rs1550117 e rs2228611 foram associados com aumento significativo do risco de PAIR (64).

Outro gene candidato, o GRM7, atua codificando o receptor 7 metabotrófico do glutamato (mGlutR7). Esse receptor mantém a fenda sináptica entre as células ciliadas

internas e gânglios do neurônio espiral tipo I depurada do glutamato. O glutamato é um neurotransmissor excitatório que em excesso é responsável pelo envenenamento por superestimulação dos neurônios pós sinápticos, que ocorre no dano metabólico após a exposição ao ruído. Um trabalho realizado em metalúrgicos chineses avaliou o polimorfismo do gene GRM7 no desenvolvimento de PAIR. Foi demonstrado pela primeira vez que a mutação do alelo C no rs1485175 do GMR7 reduziu a susceptibilidade à PAIR na população estudada (65).

Em 2017 Guo et al avaliaram outro gene candidato, o FOXO3 e associação das suas variações genéticas com susceptibilidade à PAIR (66). O Forkhead Box 3 (FOXO3) é um fator de transcrição conhecido por regular a longevidade de várias espécies, incluindo humanos e camundongos (67). O FOXO3 regula a expressão de proteínas de resposta ao estresse (68) e os efetores do FOXO3 podem melhorar o estresse oxidativo, bloquear a mitose, induzir apoptose ou promover inflamação (69). O estudo demonstrou que os polimorfismos genéticos rs2802292, rs10457180 e rs12206094 do gene FOXO3 estão associados a um risco aumentado de PAIR em uma população chinesa e têm potencial para serem biomarcadores para trabalhadores expostos ao ruído (66).

Além disso, acredita-se que mutações no FOXO3 estejam relacionadas a perdas auditivas por neuropatia auditiva. Camundongos adultos com mutações no gene FOXO3 foram suscetíveis à perda auditiva com as características típicas da neuropatia auditiva, a saber, limiares auditivos elevados combinados à função normal das células ciliadas externas (70).

A apoptose é uma das causas de perdas de células ciliadas da cóclea na PAIR, sendo a ativação de caspases um evento central na morte celular programada. Foram avaliadas associações das variações genéticas dos genes das Caspases com a PAIR através de estudo caso-controle em trabalhadores Chineses. Foram investigados 15 polimorfismos dos genes das Caspases (CASP1, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP8, CASP10 e CASP14) e sua relação com PAIR. Dois *SNPs* dos gene CASP3 foram associados com PAIR (71).

Em 2019 um estudo caso-controle para screening de genes candidatos à PAIR em trabalhadores Chineses expostos ao ruído avaliou 83 *SNPs*. Foram encontrados sete *SNPs* nos genes CDH23, PCDH15, EYA4, MYO1A, KCNMA1 e OTOG associados à PAIR (54).

2.2.2 Descoberta dos Genes da PAIR em Camundongos

Os camundongos geraram a primeira evidência da influência genética da PAIR. Isso ocorreu em função da identificação de genes que aumentam a susceptibilidade ao trauma sonoro (72). A base genética da PAIR tem sido claramente demonstrada em modelos animais. As linhagens de camundongos (C57BL/6J), que apresentam perda auditiva relacionada ao envelhecimento, foram também associadas a uma maior susceptibilidade ao ruído em comparação com outras linhagens (73)(74)(75). Além disso, diversos camundongos knockout, como SOD1^{-/-} (75), GPX1^{-/-} (76), PMCA2^{-/-} (77) e CDH23^{+/-} (78), demonstraram ser mais sensíveis ao ruído que o tipo selvagem. Esses estudos em camundongos knockout indicam que existem certos déficits que quebram diferentes ciclos e estruturas dentro da cóclea e geram um aumento da susceptibilidade da orelha interna ao ruído.

A principal vantagem para estudos de PAIR em modelos animais é a capacidade de fornecer e monitorar, de forma precisa, a exposição ao ruído. Por exemplo, uma exposição contínua ao ruído num espectro de frequência e energia durante 1-2 horas. Dada a homogeneidade genética das linhagens de camundongos consanguíneas, os camundongos apresentam menor variabilidade nas medidas de desfecho quando comparados a outros modelos experimentais. Entretanto, é frequentemente difícil comparar os estudos com animais de diferentes laboratórios devido a diferentes protocolos de exposição ao ruído e configurações diversas.

A outra vantagem dos estudos animais, como PAIR, é a de que os pesquisadores têm acesso aos tecidos cocleares em diferentes momentos após a exposição ao ruído para estudos histológicos de morfologia e patologia, assim como análises moleculares de alterações na expressão gênica. Já em humanos, os pesquisadores somente têm acesso às estruturas cocleares de ossos temporais extraídos durante autópsias. As alterações das estruturas cocleares em ossos temporais podem refletir o impacto cumulativo da exposição ao ruído ao longo dos anos, os efeitos dos danos ambientais (como drogas ototóxicas e/ou exposição química) e qualquer degeneração celular patológica relacionada à idade. Embora as coleções de ossos temporais sejam extremamente úteis e tenham gerado conhecimento sobre os padrões de dano coclear, o tempo entre a exposição ao ruído e a análise de ossos temporais pode ser extremamente longo.

Os geneticistas continuam a excluir ou a introduzir mutações humanas conhecidas em genes de camundongos que codificam proteínas cocleares para avaliação do efeito funcional. Além de analisar o quanto a mutação afeta os limiares auditivos,

será também importante investigar a susceptibilidade ao ruído, a qual é uma área ainda pouco explorada. A ampliação da coleção de camundongos mutantes gera oportunidade de avaliar se a eliminação ou a modificação de uma proteína em especial faz com que o camundongo seja mais susceptível à PAIR.

A principal limitação dos estudos com ruído é o efeito da base genética do camundongo mutante em relação à degeneração coclear fisiológica e à PAIR. Enquanto algumas sublinhagens da linhagem 129 são completamente resistentes ao ruído, o C57BL/6J, BALB/c e algumas sublinhagens da linhagem 129 comumente utilizados para gerar knockouts ou camundongos transgênicos são portadoras do alelo *Cdh23ahl1*, o qual é responsável pela perda auditiva de início precoce e pela PAIR (76). Os investigadores são estimulados a realizar uma cruzada do tipo retrocruzamento com o C57BL/6J para que os mutantes apresentem uma base genética semelhante. A presença do alelo *Cdh23ahl1* pode complicar a avaliação da função auditiva nesses mutantes, especialmente após os 4 meses de vida. Nesse momento, o camundongo da linhagem CBA mostrou adquirir resistência ao ruído (79). Portanto, a seleção da linhagem para estudos de PAIR deve ser realizada com precaução. Quando trabalhar com o tipo selvagem, deve ser recomendado a utilização de híbridos F1 das duas linhagens consanguíneas para se utilizar da força do híbrido, o que reduz a variabilidade das medidas de desfecho (80).

As mutações nulas nos camundongos CDH23 e PCDH15 geram uma desorganização dos feixes de cílios e uma deterioração precoce do epitélio sensorial auditivo e vestibular no camundongo waltzer (v; *Cdh23*834–835insG) e Ames waltzer, respectivamente (81) (82). Uma mutação missense da mutação *Cdh23*A2210T no

camundongo salsa gera um fenótipo mais leve com desenvolvimento normal, mas perda progressiva da ligação na ponta dos estereocílios, resultando em perda auditiva que se assemelha aos pacientes com DFNB12 (83).

A evidência de que os genes CDH23 e PCDH15 participam da PAIR advém das linhagens de camundongos consanguíneos que apresentam diferenças sutis na sequência de genes. Estudos auditivos em camundongos comuns e consanguíneos demonstraram que, na idade de 23 meses, o camundongo da linhagem CBA apresenta a melhor audição e a pior resposta nos limiares auditivos de tronco cerebral. Por outro lado, os camundongos das linhagens DBA/2J e C57BL/6J apresentam perda auditiva precoce e acelerada com a idade (84). Diversos grupos têm comparado o camundongo CBA com o C57BL/6J e têm demonstrado que a linhagem C57BL/6J apresenta perda auditiva precoce e acelerada. Além disso, esses camundongos são mais susceptíveis ao ruído e exibem maiores alterações dos limiares após a exposição ao ruído na maioria das frequências testadas (85)(86)(87). O camundongo CBA também apresenta rápida recuperação da função auditiva nos primeiros 3 dias após a exposição ao ruído, enquanto o C57BL/6J apresenta uma recuperação limitada com o passar do tempo (74) (75)(53).

Em estudo publicado em 2009 (88) foram realizados diversos experimentos com modelos transgênicos para estudo da PAIR. Os camundongos da linhagem consanguínea Castaneous (CAST/Ei) são resistentes ao ruído, enquanto a linhagem C57BL/6J é susceptível. Foi utilizado a biblioteca genome-tagged mice (GTM) para linhagens congênicas. Portadores de segmentos definidos do genoma do CAST/Ei foram inseridos numa base genética de um C57BL/6J, a fim de procurar loci que modificassem o dano

auditivo gerado pelo ruído na linhagem C57BL/6J. A PAIR foi gerada através da exposição de camundongos (6 a 8 semanas de vida) a uma intensidade sonora de 108 dB. Foram testadas a audição de cada camundongo até 23 dias após a exposição ao ruído através de PEATEs. Esse estudo identificou loci que modificam a resposta inicial ao dano gerado pelo ruído, assim como a recuperação a longo prazo. Os dados sugerem que múltiplos alelos no genoma do CAST/Ei modificam a patogênese da PAIR e que o rastreamento através de bibliotecas de linhagens congênicas para determinados loci e traços de interesse pode ser facilmente realizado.

Os estudos de mapeamento identificaram um locus no cromossomo 10 de camundongos, sendo responsável pela perda auditiva de início precoce no C57BL/6J e também em nove outras linhagens consanguíneas comuns (74)(89). Esse locus foi originalmente conhecido por Ahl, e posteriormente renomeado como Ahl1, sendo o primeiro locus relacionado à perda auditiva pela idade. Testes de complementação genética mostraram que o Ahl e o Nihl são alélicos, ou seja, estão localizados na mesma posição do cromossomo e são indistinguíveis entre si (90). Os camundongos que herdaram duas cópias do alelo mutante Ahl (homozigotos) apresentam perda auditiva precoce, assim como maior alteração dos limiares auditivos após a exposição ao ruído quando comparados aos camundongos com uma ou duas cópias do alelo Ahl selvagem. Assim, a sensibilidade ao ruído do camundongo C57BL/6J apresenta um traço recessivo que é cossegregado juntamente com o Ahl. A base genética desses fenótipos é um polimorfismo A753G no exon 7 da CDH23 (91)(53). A alteração na adesão ou redução da estabilidade da CDH23 pode conferir susceptibilidade à perda auditiva pela idade e à PAIR.

O cálcio intracelular é uma importante molécula sinalizadora que regula a liberação de neurotransmissores pela célula ciliada interna. O cálcio também é importante para manter as integrações entre a CDH23 e a PCDH15, as quais são sensíveis ao cálcio. A bomba de Ca-ATPase tipo 2 na membrana plasmática (PMCA2, ATP2B2) é um importante regulador dos níveis de cálcio entre os estereocílios. Na orelha interna do camundongo, a PMCA2 está localizada nos estereocílios e na parede basolateral tanto nas células ciliadas cocleares como vestibulares. Considerando a sua importância em manter a homeostase do cálcio, essa bomba de cálcio é claramente importante no desenvolvimento da PAIR. Os defeitos na PMCA2 afetam diretamente as interações entre CDH23 e PCDH15, a subsequente transdução mecânica e sensorial do estereocílios e a liberação de neurotransmissores pelas células ciliadas internas. Dessa forma, a inativação das mutações na ATP2B2 resultam em surdez e disfunção vestibular no camundongo de mutação espontânea deaf waddler (dfw) e no camundongo com deleção específica para ATP2B2 (92)(93). A expressão fenotípica do mutante recessivo com surdez (dfw) inativa a PMCA2 (94). Enquanto os homozigotos dfw/dfw são surdos, os heterozigotos +/dfw apresentam audição normal ou perda auditiva de início precoce e rapidamente progressiva, dependendo do locus no cromossomo 10 modificado no modified deaf waddler (mdfw). Estudos genéticos e funcionais revelaram como o mdfw é alélico para Ah1 (95). A identificação do CDH23 como gene modificador do mdfw é o primeiro exemplo de um gene modificador de surdez em camundongos e uma interessante demonstração de uma herança digenética para surdez. Esses estudos geram evidência convincente de que mutações sutis num gene podem modificar os efeitos num segundo gene, gerando fenótipos extremos.

Além do papel crítico da interação entre CDH23 e PCDH15, o cálcio é também importante para a sinalização intracelular. O receptor de potencial transiente vaniloide do tipo 4 (transient receptor potential vanilloid 4 - TRPV4) é um canal catiônico permeável ao cálcio que funciona como um receptor osmossensorial e mecanossensorial. Na cóclea de camundongos, o TRPV4 é expresso nas células ciliadas internas e externas e nos neurônios do gânglio espiral (96). O TRPV4 é responsável pelo influxo de cálcio nas células ciliadas externas induzido pela estimulação hipotônica. Camundongos knockout TRPV4 apresentam tanto morfologia coclear (órgão de Corti, neurônios do gânglio espiral e estria vascular) como função auditiva normal em comparação com o tipo selvagem até 5 meses de vida. Entretanto, o camundongo knockout TRPV4 apresenta maior sensibilidade ao ruído. Isso está evidente através da maior PTS após 4 horas de exposição ao ruído com 128 dB (96).

Tem sido demonstrado que a exposição ao ruído gera uma maior produção de peróxido de hidrogênio na mitocôndria e um desequilíbrio na redução oxidativa e na liberação do citocromo c, o qual desencadeia uma cascata de apoptose e resulta em morte celular (97). O acúmulo e a propagação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio/nitrogênio geram dano em uma ampla área do órgão de Corti, nas células do gânglio espiral e na estria vascular (98)(76). A ligação entre o ruído e o aumento da expressão de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio foi fortalecida através da demonstração dos efeitos protetores de “limpadores” de radicais livres, como vitamina E, ácido ascórbico, d-metionina, n-acetilcisteína e a coenzima Q que mimetiza a idebenona (99).

O metabolismo do superóxido e dos derivados de peróxidos necessita de um efeito combinado de catalase, SOD e enzimas dos sistemas antioxidantes de glutathione, glutaredoxina e tioredoxina. A redução da atividade de qualquer um desses componentes pode gerar o comprometimento da capacidade antioxidante e o aumento do dano gerado pelas espécies reativas de oxigênio/nitrogênio. A eliminação parcial ou completa do SOD citosólico (Cu, Zn-SOD, SOD1) em camundongos gera um discreto aumento nos limiares auditivos basais e maior sensibilidade ao ruído (100) (101). Entretanto, sobreexpressão do SOD1 em camundongos transgênicos, administração intracoclear do gene ou injeção intraperitoneal da proteína purificada não oferecem proteção adicional contra ruído, ototoxicidade ou envelhecimento (102)(103)(104). Em comparação ao SOD1, o SOD mitocondrial (Mn-SOD, SOD2) pode exercer um papel importante. Os camundongos knockout *Sod2* - / - morrem dentro das primeiras 2 semanas de vida, enquanto os camundongos *Sod2* + / - parecem não apresentar alterações (105) e possuem audição normal na idade jovem (106). A sobreexpressão de SOD2 não protege a audição e as células ciliadas de forma efetiva pela ototoxicidade por aminoglicosídeos (102). Portanto, o SOD2, com a sua proximidade com os superóxidos produzidos pela mitocôndria, provavelmente tem participação importante na produção de peróxido de hidrogênio e no estresse oxidativo após o ruído.

O sistema da glutathione exerce um papel central nos mecanismos antioxidantes intrínsecos. A glutathione é um tripeptídeo composto de glutamato-cisteína-glicina em que um único grupo – SH da cisteína residual atua como receptor e doador de elétrons. Os camundongos com ausência da GPX1 apresentam elevados limiares auditivos e são mais susceptíveis ao ruído (76)(107). As glutathione peroxidases (codificadas pela

GPX1-6) utilizam a glutathiona reduzida (GSH) como um doador de elétrons para reduzir o peróxido de hidrogênio em água ou reduzir o hidroxiperóxido para o correspondente álcool. Esse evento gera a glutathiona dissulfato (GSSG). A GSSG pode ser reduzida para gerar o GSH através da glutathiona redutase (codificada pela GSR). A biossíntese da glutathiona necessita de duas enzimas (glutamilcisteína ligase e glutathiona sintetase) dependentes de ATP (trifosfato de adenosina). Além disso, a GSH pode formar conjugados através da ação da glutathiona S-transferase (GST) ou reagir com componentes eletrofilicos de forma não enzimática. De fato, a conjugação da glutathiona apresenta um aspecto essencial tanto para o metabolismo normal como para o xenobiótico. A formação da proteína-S-SG dissulfídica, conjugação da glutathiona e da excreção da GSSG, pode reduzir a disponibilidade de GSH e aumentar a demanda para restabelecer a capacidade antioxidante (108). Um baixo nível de glutathiona pode gerar células mais susceptíveis ao estresse oxidativo.

O fator de transcrição de choque térmico (*heat shock transcription factor -HSF1*) é um importante fator de transcrição que controla a resposta induzida pelo estresse, protegendo as células e os tecidos de diversos estresses celulares e ambientais (109). Essa resposta, conhecida por resposta de choque térmico, tem sido conservada durante a evolução, desde as bactérias até os humanos. Os estressores ativam o HSF1, que trimeriza, se transloca do núcleo e se liga a elementos nos genes para as HSPs. Tanto o estresse térmico quanto o ruído são conhecidos por ativar a resposta de choque térmico na cóclea e proteger de um subsequente trauma sonoro (60) (110). Os camundongos com ausência do HSF1 (*Hsf1 knockouts*) são frequentemente mais sensíveis a estressores, especialmente no sistema auditivo. O camundongo *Hsf1 - / -* é

viável (111) e apresenta limiares auditivos normais (110) (112). Entretanto a resposta do tipo selvagem a um ruído leve produz somente uma perda auditiva temporária, o camundongo Hsf1 - / - apresenta uma maior perda auditiva e de células ciliadas externas (112). Durante o estresse térmico, seja por choque térmico do corpo inteiro (110) ou por hipertermia localizada (60), tem sido demonstrado um aumento da expressão do HSP70 na cóclea, o que pode indicar o papel-chave para proteger as células ciliadas de um subsequente estresse pelo ruído.

Foi demonstrado o efeito da exposição intensa ao ruído na expressão de moléculas que parecem ser importantes para o desenvolvimento da PAIR em linhagens de camundongos consanguíneos (113). Foram avaliados os camundongos B6.CAST, 129X1/SvJ e 129S1/SvImJ. O protocolo de exposição ao ruído gerou uma perda de 40 dB nos limiares auditivos de camundongos B6, porém houve resistência ao ruído nas demais linhagens de camundongos. Após 6 horas da exposição ao ruído, a análise da expressão gênica no labirinto membranoso demonstrou um aumento da regulação de fatores de transcrição tanto no camundongo suscetível quanto no camundongo resistente. Entretanto, uma significativa redução dos genes envolvidos no ciclo celular (HSP70 e HSP40, GADD45-beta e Cip1) foi detectada somente no camundongo resistente. Além disso, houve uma upregulation de HSP70 e HSP40, GADD45-beta e Cip1 nos camundongos da linhagem 129, sendo confirmado a nível proteico. Já que a função dessas proteínas inclui um importante papel como potente rota celular antiapoptótica, a sua upregulation poderia contribuir para a proteção do camundongo resistente ao desenvolvimento da PAIR (113).

Foram realizados estudos sobre a proteína de ligação a ácidos graxos (fatty acid-binding protein 3 - Fabp3) e a sua relação com a exposição ao ruído. A Fabp3 é uma proteína de transporte intracelular de lipídeos que tem papel na mediação do metabolismo energético. A Fabp3 é expressa nos neurônios do gânglio espiral e nas células de suporte do órgão de Corti. Entretanto, não está claro o papel da Fabp3 na cóclea. Foi demonstrado que limiares auditivos de potenciais evocados de camundongos knockout Fabp3 não se modificaram em comparação ao tipo selvagem. Ao comparar com o tipo selvagem, o camundongo mutante não demonstrou diferenças em relação à vulnerabilidade da exposição ao ruído. Esses resultados demonstram que a deficiência isolada da Fabp3 não afeta a função auditiva (114).

Foram realizados estudos comparados sobre a linhagem de camundongo CBA/CaJ como modelo de perda auditiva relacionada à idade e à PAIR. Considerando a resistência ao ruído e a limitada perda auditiva relacionada à idade, foram realizados estudos com outras linhagens para encontrar padrões semelhantes à linhagem CBA/CaJ (115). Foram utilizadas algumas linhagens do HMDP, o qual tem sido utilizado para *GWAS* a fim de estudar traços complexos em camundongos. A linhagem FVB/NJ é parte do HMDP e foi previamente descrita com um fenótipo auditivo semelhante ao CBA/CaJ. Foi demonstrado que a linhagem FVB/NJ desenvolve o fenótipo de perda auditiva relacionada à idade mais precoce que o CBA/CaJ. Além disso, camundongos jovens de FVB/NJ são mais vulneráveis à PAIR até as 10-12 semanas de vida. Isso sugere que a linhagem FVB/NJ pode ser utilizada como modelo genético para formas neurais de perda auditiva progressiva e para estudos de sensibilidade ao ruído na idade jovem.

Foi estudado o fator de transcrição LIM (Isl1) em função do seu papel crítico na orelha interna. Na orelha interna de camundongos, o Isl1 é expresso na região do otocisto, em células ciliadas jovens e nas células de suporte. Não é expresso em células ciliadas auditivas no período pós-natal. Para avaliar a expressão continuada do Isl1 em células ciliadas no período pós-natal e descobrir como afeta o desenvolvimento celular e a função coclear, foi criado um modelo de camundongo transgênico. O Pouf4f3 promoveu uma sobreexpressão do Isl1 de forma específica nas células ciliadas. As células ciliadas com sobreexpressão de Isl1 se desenvolvem normalmente, o que foi confirmado por morfologia e função coclear (potenciais evocados auditivos e emissões otoacústicas). À medida que o camundongo se aproxima da idade de 17 meses, os camundongos selvagens apresentam um progressivo aumento dos limiares auditivos e uma perda de células ciliadas externas, traço de perda auditiva relacionada à idade na linhagem com origem (C57BL/6J). Em contraste, o camundongo transgênico Isl1 demonstrou significativamente uma menor elevação dos limiares auditivos e maior sobrevivência de células ciliadas. Além disso, a sobreexpressão do Isl1 protegeu o ouvido da PAIR. Tanto as alterações dos potenciais evocados quanto a morte de células ciliadas externas foram significativamente menores em comparação ao tipo selvagem. Esse modelo sugere um mecanismo subjacente comum na PAIR e na perda auditiva relacionado à idade. Além disso, gera evidência de que a expressão do Isl1 de forma específica nas células ciliadas pode promover uma maior sobrevivência celular e minimizar a perda auditiva que normalmente ocorre com o envelhecimento e a exposição ao ruído intenso (4).

Foi estudada a deficiência do gene MYH14 na susceptibilidade à PAIR em camundongos CBA/CaJ. Foi utilizada tecnologia CRISPR / Cas9 para estabelecer uma linhagem de camundongos knockout Myh14 - / - e esclarecer o papel do MYH14 na cóclea e na PAIR. Foi caracterizado que os camundongos Myh14 - / - não apresentaram perda auditiva significativa até os cinco meses de idade. Além disso, os animais Myh14 - / - foram mais vulneráveis ao ruído de alta intensidade em comparação aos animais controle na avaliação eletrofisiologia auditiva (ABR). Após trauma acústico foi observada perda mais significativa de células ciliadas externas em camundongos Myh14 - / - do que em controles do tipo selvagem. Esses resultados sugerem que Myh14 pode desempenhar um papel benéfico na proteção da cóclea após superestimulação acústica em camundongos CBA / CaJ (116).

Foi explorada a associação entre Conexina 26 e PAIR, estabelecendo um modelo de camundongo Cx26 knockdown (KD), através de engenharia molecular, atenuando a função desse gene após o nascimento. Camundongos Conexina26 nulos já nascem surdos e não são apropriados para estudo em PAIR. Após knockdown condicional da Conexina26 no 18o dia pós-natal e, foram medidos os limiares auditivos e as alterações morfológicas nesses camundongos com e sem exposição ao ruído. Os camundongos Cx26 KD não apresentaram perda auditiva substancial e degeneração das células ciliadas antes do ruído. Após trauma acústico, os camundongos Cx26 KD sofreram maior perda auditiva e não tiveram recuperação auditiva. Também foi observada uma extensa perda de células ciliadas externas e destruição mais severa do órgão basal de Corti em camundongos Cx26 KD após a exposição ao ruído. Esses dados indicam que a

expressão reduzida de Cx26 na cóclea pode aumentar a suscetibilidade à perda auditiva induzida por ruído e facilitar a degeneração celular no órgão de Corti (117)

Um estudo em camundongos avaliou o gene NRF2 na proteção coclear após danos induzidos por ruído. Foram testados camundongos NRF2 - / - após exposição ao ruído, sendo verificadas mudanças dos seus limiares auditivos significativamente maiores em comparação com camundongos do tipo selvagem. O tratamento com CDDO-Im, um potente medicamento ativador de NRF2, antes, mas não após a exposição ao ruído, preservou a integridade das células ciliadas e melhorou os níveis auditivos pós-exposição em camundongos do tipo selvagem, mas não nos camundongos Nrf2 - / -. Portanto, a ativação de NRF2 demonstrou-se eficaz para a prevenção de PAIR. Assim, a alta atividade de NRF2 pareceu ser vantajosa para a proteção coclear de lesões induzidas por ruído, sendo o NRF2 um alvo promissor para a prevenção de PAIR (118).

Foi também estudado o papel da isoforma 2 da quinase regulada por sinal extracelular (ERK2) na PAIR. As quinases reguladas por sinal extracelular são membros da família de proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs) e regulam coordenadamente uma infinidade de processos celulares. Em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares, a fosforilação dos resíduos de treonina e tirosina ativa a ERK. Demonstrou-se que a ERK2 desempenha um papel importante na regulação da sobrevivência das células ciliadas e na PAIR em camundongos (C57BL/6J). Camundongos knockout condicionais deficientes de ERK2 nas células ciliadas da orelha interna apresentaram audição comparável aos controles e não exibiram perda de células ciliadas em condições normais. No entanto esses camundongos knockout foram

mais vulneráveis a ruídos e apresentaram recuperação atenuada na PAIR em comparação aos camundongos controle. Além disso, observou-se uma taxa de sobrevivência significativamente menor das células ciliadas internas nesses camundongos, em comparação aos controles. Esse resultado indicou que o ERK2 pode desempenhar papel importantes na sobrevivência das células ciliadas na PAIR (119).

Em 2015 Lavinsky et al realizaram um GWAS com camundongos transgênicos na busca de genes envolvidos na perda auditiva induzida por ruído. O gene *Nox3* foi crítico no o desenvolvimento da PAIR. Foram utilizados animais do HMDP, e protocolos de exposição ao ruído e aferição da audição rígidos. Verificou-se um pico significativo para PAIR no cromossomo 17, dentro de um bloco de haplótipos específicos, após exposição ao estímulo de 8 kHz tone burst (120).

Esse pico significativo foi localizado em região próxima ao gene *Nox3*, levantando a hipótese de sua associação direta na PAIR. Para comprovação, através de engenharia genética, foram criados camundongos *Nox3* mutantes e heterozigotos. Esses camundongos foram submetidos a protocolos de exposição ao ruído com PEATE e EOA-PD, possuindo grande susceptibilidade para PAIR especialmente em 8KHz. Na avaliação histológica de suas cócleas e através de imunofluorescencia foram visualizadas alterações específicas nas fendas sinápticas da cóclea, especificamente na tonotopia de 8KHz. Esse GWAS definiu que a susceptibilidade genética está distribuída tonotopicamente na cóclea. Além disso, foi o primeiro gene da perda auditiva induzida pelo ruído descrito na literatura mundial utilizando GWAS com camundongos (120).

2.3 REFERÊNCIAS DA BASE TEÓRICA

1. LaDou J. Current occupational & environmental medicine. 5th ed, New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2014.
2. Noise and Hearing Loss. In: National Institutes of Health. Consensus Development Conference Statement. Edited by: Services USDoHH. Bethesda, MB: 1990.
3. Alberti PW, Symons F, Hyde ML. Occupational hearing loss. The significance of asymmetrical hearing thresholds. *Acta Otolaryngol.* 1979;87:255–263. doi: 10.3109/00016487909126417.
4. Kujawa SG, Liberman MC, 2009. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. *J. Neurosci* 29, 14077–14085.
5. Webster M, Webster DB, 1981. Spiral ganglion neuron loss following organ of Corti loss: a quantitative study. *Brain Res* 212, 17–30.
6. 1999 I. International Standard, I. S. O. 1999 acoustics: determination of occupational noise exposure and estimation of noise-induced hearing impairment. In: Edited by: Standardization GIOf. 1990.
7. Nordmann AS, Bohne BA, Harding GW. Histopathological differences between temporary and permanent threshold shift. *Hear Res.* 2000;139:13–30. doi: 10.1016/S0378-5955(99)00163-X.
8. Heeringa AN, van Dijk P. The dissimilar time course of temporary threshold shifts and reduction of inhibition in the inferior colliculus following intense sound exposure. *Hear Res.* 2014;312:38–47. doi: 10.1016/j.heares.2014.03.004.

9. Shi L, Chang Y, Li X, et al. Cochlear Synaptopathy and Noise-Induced Hidden Hearing Loss. *Neural Plast.* 2016;2016:6143164.
10. Liberman MC, Epstein MJ, Cleveland SS, et al. Toward a Differential Diagnosis of Hidden Hearing Loss in Humans. *PLoS One.* 2016;11:e0162726. doi: 10.1371/journal.pone.0162726.
11. Moser T, Starr A. Auditory neuropathy--neural and synaptic mechanisms. *Nat Rev Neurol.* 2016;12:135–149. doi: 10.1038/nrneurol.2016.10.
12. Hirose K, Liberman MC. Lateral wall histopathology and endocochlear potential in the noise-damaged mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol JARO.* 2003 Sep;4(3):339–52.}
13. Hudspeth AJ. How hearing happens. *Neuron.* 1997;19:947–950. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80385-2.
14. Borg E, Canlon B, Engstrom B. Noise-induced hearing loss. Literature review and experiments in rabbits. Morphological and electrophysiological features, exposure parameters and temporal factors, variability and interactions. *Scand Audiol Suppl.* 1995;40:1–147. doi: 10.1080/02827589509382860.
15. Henderson D, Hamernik RP. Impulse noise: critical review. *J Acoust Soc Am.* 1986;80:569–584. doi: 10.1121/1.394052.
16. Spoenclin H. Histopathology of noise deafness. *J Otolaryngol.* 1985;14:282–286.
17. Kim DK, Park Y, Back SA, et al. Protective effect of unilateral and bilateral ear plugs on noise-induced hearing loss: functional and morphological evaluation in animal model. *Noise Health.* 2014;16:149–156. doi: 10.4103/1463-1741.134915.

18. Yamashita D, Jiang HY, Schacht J, Miller JM. Delayed production of free radicals following noise exposure. *Brain Res.* 2004;1019:201–209. doi: 10.1016/j.brainres.2004.05.104.
19. Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, Hu BH. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear.* 2006;27:1–19. doi: 10.1097/01.aud.0000191942.36672.f3.
20. Robertson D. Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. *Hear Res.* 1983;9:263–278. doi: 10.1016/0378-5955(83)90031-X.
21. Fridberger A, Flock A, Ulfendahl M, Flock B. Acoustic overstimulation increases outer hair cell Ca²⁺ concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:7127–7132. doi: 10.1073/pnas.95.12.7127.
22. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews. Mol Cell Biol.* 2003;4:552–565.
23. McShane DP, Hyde ML, Alberti PW. Tinnitus prevalence in industrial hearing loss compensation claimants. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1988 Oct;13(5):323–30.
24. IBAÑEZ, R. N.; SCHNEIDER, I. O.; SELIGMAN, J. Anamnese dos trabalhadores expostos ao ruído. In: NUDELMANN, A. A. et al. *Pair – Perda Auditiva Induzida pelo Ruído: volume II.* Rio de Janeiro: Revinter, 2001
25. Pierson LL, Gerhardt KJ, Rodriguez GP, Yanke RB. Relationship between outer ear resonance and permanent noise-induced hearing loss. *Am J Otolaryngol.* 1994;15:37–40. doi: 10.1016/0196-0709(94)90038-8.

26. Hong O. Hearing loss among operating engineers in American construction industry. *Int Arch Occup Environ Health*. 2005;78:565–574. doi: 10.1007/s00420-005-0623-9.
27. Jansen S, Luts H, Dejonckere P, et al. Exploring the sensitivity of speech-in-noise tests for noise-induced hearing loss. *Int J Audiol*. 2014;53:199–205. doi: 10.3109/14992027.2013.849361.
28. Wang YP, Hsu WC, Young YH. Vestibular evoked myogenic potentials in acute acoustic trauma. *Otol Neurotol*. 2006;27:956–961. doi: 10.1097/01.mao.0000231590.57348.4b.
29. Dube KJ, Ingale LT, Ingale ST. Hearing impairment among workers exposed to excessive levels of noise in ginning industries. *Noise Health*. 2011;13:348–355. doi: 10.4103/1463-1741.85506.
30. Touma JB. Controversies in noise-induced hearing loss (NIHL) *Ann Occup Hyg*. 1992;36:199–209.
31. Taylor W, Lempert B, Pelmeier P, et al. Noise levels and hearing thresholds in the drop forging industry. *J Acoust Soc Am*. 1984;76:807–819. doi: 10.1121/1.391305.
32. Comitê Nacional de Ruído e Conservação Auditiva. Perda auditiva induzida por ruído relacionada ao trabalho. *Boletim*, n. 1, 29 jun. 1994. Revisto em 14 nov. 1999, São Paulo.
33. International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):851–61.

34. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007 Jun 7;447(7145):661–78.
35. Rabinowitz PM, Pierce Wise J, Hur Mobo B, Antonucci PG, Powell C, Slade M. Antioxidant status and hearing function in noise-exposed workers. *Hear Res*. 2002 Nov;173(1-2):164
36. WANG, Jing et al. Association of the C47T polymorphism in superoxide dismutase gene 2 with noise-induced hearing loss: a meta-analysis. *Braz. j. otorhinolaryngol.* [online]. 2017, vol.83, n.1, pp.80-87. ISSN 1808-8686. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2016.01.008>
37. Carlsson P-I, Van Laer L, Borg E, Bondeson M-L, Thys M, Fransen E, et al. The influence of genetic variation in oxidative stress genes on human noise susceptibility. *Hear Res*. 2005 Apr;202(1-2):87–96.
38. Konings A, Van Laer L, Pawelczyk M, Carlsson P-I, Bondeson M-L, Rajkowska E, et al. Association between variations in CAT and noise-induced hearing loss in two independent noise-exposed populations. *Hum Mol Genet*. 2007 Aug 1;16(15):1872–83.
39. Lin C-Y, Wu J-L, Shih T-S, Tsai P-J, Sun Y-M, Guo YL. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms as susceptibility factors for noise-induced temporary threshold shift. *Hear Res*. 2009 Nov;257(1-2):8–15.
40. Loukzadeh, Z., Sani, H.E., Sheikha, M.H., & Ratki, F.M. (2019). Association of GST gene polymorphism and noise-induced hearing loss. *AIMS Public Health*, 6, 546 - 553.

41. Yang J, Zhang J, Wang X, Wang C, Chen J, Qian Y, Duan Z. Identification of functional tag single nucleotide polymorphisms within the entire CAT gene and their clinical relevance in patients with noise-induced hearing loss. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Mar 1;8(3):2852-63. PMID: 26045794; PMCID: PMC4440103.
42. Wangemann P. K⁺ cycling and the endocochlear potential. *Hear Res*. 2002 Mar;165(1-2):1-9.
43. Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J, et al. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet*. 1997 Feb;15(2):186-9.
44. Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lütjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, et al. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*. 1999 Feb 5;96(3):437-46.
45. Delpire E, Lu J, England R, Dull C, Thorne T. Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat Genet*. 1999 Jun;22(2):192-5.
46. Marcus DC, Wu T, Wangemann P, Kofuji P. KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Feb;282(2):C403-7.
47. Van Eyken E, Van Laer L, Fransen E, Topsakal V, Hendrickx J-J, Demeester K, et al. The contribution of GJB2 (Connexin 26) 35delG to age-related hearing impairment and noise-induced hearing loss. *Otol Neurotol Off Publ Am Otol Soc Am Neurotol Soc Eur Acad Otol Neurotol*. 2007 Oct;28(7):970-5.

48. Van Laer L, Carlsson P-I, Ottschytsch N, Bondeson M-L, Konings A, Vandeveldel A, et al. The contribution of genes involved in potassium-recycling in the inner ear to noise-induced hearing loss. *Hum Mutat.* 2006 Aug;27(8):786–95.
49. Pawelczyk M, Van Laer L, Franssen E, Rajkowska E, Konings A, Carlsson P-I, et al. Analysis of gene polymorphisms associated with K ion circulation in the inner ear of patients susceptible and resistant to noise-induced hearing loss. *Ann Hum Genet.* 2009 Jul;73(Pt 4):411–21.
50. Guo H, Ding E, Sheng R, et al. Genetic variation in KCNQ4 gene is associated with susceptibility to noise-induced hearing loss in a Chinese population. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2018;63:55-59. doi:10.1016/j.etap.2018.08.009
51. Konings A, Van Laer L, Wiktorek-Smagur A, Rajkowska E, Pawelczyk M, Carlsson PI, et al. Candidate gene association study for noise-induced hearing loss in two independent noise-exposed populations. *Ann Hum Genet.* 2009 Mar;73(2):215–24.
52. Sakaguchi H, Tokita J, Müller U, Kachar B. Tip links in hair cells: molecular composition and role in hearing loss. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009 Oct;17(5):388–93.
53. Noben-Trauth K, Zheng QY, Johnson KR. Association of cadherin 23 with polygenic inheritance and genetic modification of sensorineural hearing loss. *Nat Genet.* 2003 Sep;35(1):21–3.
54. Zhang X, Ni Y, Liu Y, et al. Screening of noise-induced hearing loss (NIHL)-associated SNPs and the assessment of its genetic susceptibility. *Environ Health.* 2019;18(1):30. Published 2019 Apr 4. doi:10.1186/s12940-019-0471-9

55. Wayne S, Robertson NG, DeClau F, et al. Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet* 2001;10:195–200.
56. Wang L, Sewell WF, Kim SD, et al. Eya4 regulation of Na⁺/K⁺-ATPase is required for sensory system development in zebrafish. *Development* 2008;135:3425–34.
57. Yang Q, Xu X, Jiao J, et al. Genetic variation in EYA4 on the risk of noise-induced hearing loss in Chinese steelworks firm sample. *Occup Environ Med*. 2016;73(12):823-828. doi:10.1136/oemed-016-103613
58. Zhang X, Liu Y, Zhang L, et al. Associations of genetic variations in EYA4, GRHL2 and DFNA5 with noise-induced hearing loss in Chinese population: a case- control study. *Environ Health*. 2015;14:77. Published 2015 Sep 24. doi:10.1186/s12940-015-0063-2,
59. Neely JG, Thompson AM, Gower DJ. Detection and localization of heat shock protein 70 in the normal guinea pig cochlea. *Hear Res*. 1991; 52(2):403–6. PMID: 2061228.
60. Taleb M, Brandon CS, Lee FS, Harris KC, Dillmann WH, Cunningham LL. Hsp70 inhibits aminoglyco- side-induced hearing loss and cochlear hair cell death. *Cell Stress Chaperones*. 2009; 14(4):427–37. <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0097-2> PMID: 19145477; PubMed Central PMCID: PMC2728278
61. Yoshida N, Kristiansen A, Liberman MC. Heat stress and protection from permanent acoustic injury in mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1999 Nov 15;19(22):10116–24.
62. Altschuler RA, Fairfield D, Cho Y, Leonova E, Benjamin IJ, Miller JM, et al. Stress pathways in the rat cochlea and potential for protection from acquired deafness. *Audiol Neurootol*. 2002 Jun;7(3):152–6.

63. Lei S, Huang L, Liu Y, Xu L, Wang D, Yang L. Association between polymorphisms of heat-shock protein 70 genes and noise-induced hearing loss: A meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(11):e0188539. Published 2017 Nov 27. doi:10.1371/journal.pone.0188539
64. Ding, E., Liu, J., Guo, H. *et al.* *DNMT1* and *DNMT3A* haplotypes associated with noise-induced hearing loss in Chinese workers. *Sci Rep* 8, 12193 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29648-4>
65. Yu P, Jiao J, Chen G, et al. Effect of GRM7 polymorphisms on the development of noise-induced hearing loss in Chinese Han workers: a nested case-control study. *BMC Med Genet* 2018;19:4.
66. Guo H., Ding E., Bai Y., et al. Association of genetic variations in FOXO3 gene with susceptibility to noise induced hearing loss in a Chinese population. *PLoS One*. 2017;12(12, article e0189186) doi: 10.1371/journal.pone.0189186.
67. Hwangbo DS, Gershman B, Tu MP, Palmer M, Tatar M. Drosophila dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature*. 2004;429(6991):562–6. doi: 10.1038/nature02549 .
68. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors in ageing and cancer. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008 Jan;192(1):19-28. doi: 10.1111/j.1748-1716.2007.01780.x. PMID: 18171426.
69. Hwang JW, Rajendrasozhan S, Yao H, Chung S, Sundar IK, Huyck HL, Pryhuber GS, Kinnula VL, Rahman I. FOXO3 deficiency leads to increased susceptibility to cigarette smoke-induced inflammation, airspace enlargement, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol*. 2011 Jul 15;187(2):987-98. doi: 10.4049/jimmunol.1001861. Epub 2011 Jun 20. PMID: 21690325; PMCID: PMC3131437.

70. Gilels F, Paquette ST, Zhang J, Rahman I, White PM. Mutation of Foxo3 causes adult onset auditory neuropathy and alters cochlear synapse architecture in mice. *J Neurosci*. 2013 Nov 20;33(47):18409-24. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2529-13.2013. PMID: 24259566; PMCID: PMC6618809.
71. Wu Y, Ni J, Qi M, Cao C, Shao Y, Xu L, Ma H, Yang L. Associations of genetic variation in CASP3 gene with noise-induced hearing loss in a Chinese population: a case-control study. *Environ Health*. 2017 Jul 24;16(1):78. doi: 10.1186/s12940-017-0280-y. PMID: 28738811; PMCID: PMC5525200.
72. Ohlemiller KK. Contributions of mouse models to understanding of age- and noise-related hearing loss. *Brain Res*. 2006 May 26;1091(1):89–102.
73. Li HS. Influence of genotype and age on acute acoustic trauma and recovery in CBA/Ca and C57BL/6J mice. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1992 Nov;112(6):956–67.
74. Erway LC, Shiau YW, Davis RR, Krieg EF. Genetics of age-related hearing loss in mice. III. Susceptibility of inbred and F1 hybrid strains to noise-induced hearing loss. *Hear Res*. 1996 Apr;93(1-2):181–7.
75. Davis RR, Newlander JK, Ling X, Cortopassi GA, Krieg EF, Erway LC. Genetic basis for susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear Res*. 2001 May;155(1-2):82–90.
76. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Lear PM, Ho YS. Targeted mutation of the gene for cellular glutathione peroxidase (Gpx1) increases noise-induced hearing loss in mice. *J Assoc Res Otolaryngol JARO*. 2000 Nov;1(3):243–54.

77. Kozel PJ, Davis RR, Krieg EF, Shull GE, Erway LC. Deficiency in plasma membrane calcium ATPase isoform 2 increases susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear Res.* 2002 Feb;164(1-2):231–9.
78. 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 JARO.* 2004 Mar;5(1):66–79.
79. Kujawa SG, Liberman MC. Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: evidence of a misspent youth. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2006 Feb 15;26(7):2115–23.
80. Frisina RD, Singh A, Bak M, Bozorg S, Seth R, Zhu X. F1 (CBA×C57) mice show superior hearing in old age relative to their parental strains: hybrid vigor or a new animal model for “golden ears”? *Neurobiol Aging.* 2011 Sep;32(9):1716–24.
81. Alagramam KN, Murcia CL, Kwon HY, Pawlowski KS, Wright CG, Woychik RP. The mouse Ames waltzer hearing-loss mutant is caused by mutation of *Pcdh15*, a novel protocadherin gene. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):99–102.
82. Di Palma F, Holme RH, Bryda EC, Belyantseva IA, Pellegrino R, Kachar B, et al. Mutations in *Cdh23*, encoding a new type of cadherin, cause stereocilia disorganization in waltzer, the mouse model for Usher syndrome type 1D. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):103–7.
83. Schrauwen I, Ealy M, Huentelman MJ, Thys M, Homer N, Vanderstraeten K, et al. A genome-wide analysis identifies genetic variants in the *RELN* gene associated with otosclerosis. *Am J Hum Genet.* 2009 Mar;84(3):328–38.

84. Erway LC, Willott JF, Archer JR, Harrison DE. Genetics of age-related hearing loss in mice: I. Inbred and F1 hybrid strains. *Hear Res.* 1993 Feb;65(1-2):125–32.
85. Hultcrantz M, Li HS. Inner ear morphology in CBA/Ca and C57BL/6J mice in relationship to noise, age and phenotype. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg.* 1993;250(5):257–64.
86. Li HS, Borg E. Auditory degeneration after acoustic trauma in two genotypes of mice. *Hear Res.* 1993 Jun;68(1):19–27.
87. Li HS, Hultcrantz M, Borg E. Influence of age on noise-induced permanent threshold shifts in CBA/Ca and C57BL/6J mice. *Audiol Off Organ Int Soc Audiol.* 1993 Jun;32(3):195–204.
88. White CH, Ohmen JD, Sheth S, Zebboudj AF, McHugh RK, Hoffman LF, et al. Genome-wide screening for genetic *loci* associated with noise-induced hearing loss. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc.* 2009 Apr;20(4):207–13.
89. Johnson KR, Erway LC, Cook SA, Willott JF, Zheng QY. A major gene affecting age-related hearing loss in C57BL/6J mice. *Hear Res.* 1997 Dec;114(1-2):83–92.
90. Johnson KR, Zheng QY, Erway LC. A major gene affecting age-related hearing loss is common to at least ten inbred strains of mice. *Genomics.* 2000 Dec 1;70(2):171–80.
91. Johnson KR, Zheng QY, Erway LC. A major gene affecting age-related hearing loss is common to at least ten inbred strains of mice. *Genomics.* 2000 Dec 1;70(2):171–80.

92. Kozel PJ, Friedman RA, Erway LC, Yamoah EN, Liu LH, Riddle T, et al. Balance and hearing deficits in mice with a null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2. *J Biol Chem*. 1998 Jul 24;273(30):18693–6.
93. Street VA, McKee-Johnson JW, Fonseca RC, Tempel BL, Noben-Trauth K. Mutations in a plasma membrane Ca²⁺-ATPase gene cause deafness in deafwaddler mice. *Nat Genet*. 1998 Aug;19(4):390–4.
94. Noben-Trauth K, Zheng QY, Johnson KR, Nishina PM. *mdfw*: a deafness susceptibility locus that interacts with deaf waddler (*dfw*). *Genomics*. 1997 Sep 15;44(3):266–72.
95. Zheng QY, Johnson KR. Hearing loss associated with the modifier of deaf waddler (*mdfw*) locus corresponds with age-related hearing loss in 12 inbred strains of mice. *Hear Res*. 2001 Apr;154(1-2):45–53.
96. Tabuchi K, Suzuki M, Mizuno A, Hara A. Hearing impairment in TRPV4 knockout mice. *Neurosci Lett*. 2005 Jul 15;382(3):304–8.
97. Kim H, Lee M-H, Chang H-K, Lee T-H, Lee H-H, Shin M-C, et al. Influence of prenatal noise and music on the spatial memory and neurogenesis in the hippocampus of developing rats. *Brain Dev*. 2006 Mar;28(2):109–14.
98. Yamane H, Iguchi H, Konishi K, Nakagawa T, Nakai Y, Takahashi K, et al. Natural killer cell response in the inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1995 Nov;115(6):738–41.
99. Le Prell CG, Hughes LF, Miller JM. Free radical scavengers vitamins A, C, and E plus magnesium reduce noise trauma. *Free Radic Biol Med*. 2007 May 1;42(9):1454–63.

100. McFadden SL, Ding D, Reaume AG, Flood DG, Salvi RJ. Age-related cochlear hair cell loss is enhanced in mice lacking copper/zinc superoxide dismutase. *Neurobiol Aging*. 1999 Feb;20(1):1–8.
101. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Flood DG, Reaume AG, Hoffman EK, et al. Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (*Sod1*) increases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Audiol Neurootol*. 1999 Oct;4(5):237–46.
102. Kawamoto K, Sha S-H, Minoda R, Izumikawa M, Kuriyama H, Schacht J, et al. Antioxidant gene therapy can protect hearing and hair cells from ototoxicity. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2004 Feb;9(2):173–81.
103. Endo T, Nakagawa T, Iguchi F, Kita T, Okano T, Sha S-H, et al. Elevation of superoxide dismutase increases acoustic trauma from noise exposure. *Free Radic Biol Med*. 2005 Feb 15;38(4):492–8.
104. Keithley EM, Canto C, Zheng QY, Wang X, Fischel-Ghodsian N, Johnson KR. Cu/Zn superoxide dismutase and age-related hearing loss. *Hear Res*. 2005 Nov;209(1-2):76–85.
105. Huang TT, Carlson EJ, Raineri I, Gillespie AM, Kozy H, Epstein CJ. The use of transgenic and mutant mice to study oxygen free radical metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;893:95–112.
106. Le T, Keithley EM. Effects of antioxidants on the aging inner ear. *Hear Res*. 2007 Apr;226(1-2):194–202.

107. McFadden SL, Ohlemiller KK, Ding D, Shero M, Salvi RJ. The Influence of Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Deficiencies on Noise-Induced Hearing Loss in Mice. *Noise Health*. 2001;3(11):49–64.
108. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol*. 2002 Sep;64(5-6):1019–26.
109. Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN, Cotto JJ. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem*. 1997;32:17–29.
110. Sugahara K, Inouye S, Izu H, Katoh Y, Katsuki K, Takemoto T, et al. Heat shock transcription factor HSF1 is required for survival of sensory hair cells against acoustic overexposure. *Hear Res*. 2003 Aug;182(1-2):88–96.
111. Xiao X, Zuo X, Davis AA, McMillan DR, Curry BB, Richardson JA, Benjamin IJ. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J*. 1999 Nov 1;18(21):5943-52. doi: 10.1093/emboj/18.21.5943. PMID: 10545106; PMCID: PMC1171660.
112. Fairfield DA, Lomax MI, Dootz GA, Chen S, Galecki AT, Benjamin IJ, Dolan DF, Altschuler RA. Heat shock factor 1-deficient mice exhibit decreased recovery of hearing following noise overstimulation. *J Neurosci Res*. 2005 Aug 15;81(4):589-96. doi: 10.1002/jnr.20417. PMID: 15952177.
113. Gratton MA, Eleftheriadou A, Garcia J, Verduzco E, Martin GK, Lonsbury-Martin BL, Vázquez AE. Noise-induced changes in gene expression in the cochleae of mice differing

- in their susceptibility to noise damage. *Hear Res.* 2011 Jul;277(1-2):211-26. doi: 10.1016/j.heares.2010.12.014. Epub 2010 Dec 25. PMID: 21187137; PMCID: PMC3098916.
114. Suzuki J, Oshima T, Yoshida N, Kimura R, Takata Y, Owada Y, Kobayashi T, Katori Y, Osumi N. Preservation of cochlear function in Fabp3 (H-Fabp) knockout mice. *Neurosci Res.* 2014 Apr-May;81-82:64-8. doi: 10.1016/j.neures.2014.02.003. Epub 2014 Feb 18. PMID: 24560810.
115. Ho MK, Li X, Wang J, Ohmen JD, Friedman RA. FVB/NJ mice demonstrate a youthful sensitivity to noise-induced hearing loss and provide a useful genetic model for the study of neural hearing loss. *Audiol Neurotol Extra.* 2014 Jan 1;4(1):1-11. doi: 10.1159/000357770. PMID: 24707282; PMCID: PMC3972069.
116. Fu X, Zhang L, Jin Y, Sun X, Zhang A, Wen Z, Zhou Y, Xia M, Gao J. Loss of Myh14 Increases Susceptibility to Noise-Induced Hearing Loss in CBA/CaJ Mice. *Neural Plast.* 2016;2016:6720420. doi: 10.1155/2016/6720420. Epub 2016 Dec 22. PMID: 28101381; PMCID: PMC5215640.
117. Zhou XX, Chen S, Xie L, Ji YZ, Wu X, Wang WW, Yang Q, Yu JT, Sun Y, Lin X, Kong WJ. Reduced Connexin26 in the Mature Cochlea Increases Susceptibility to Noise-Induced Hearing Loss in Mice. *Int J Mol Sci.* 2016 Feb 26;17(3):301. doi: 10.3390/ijms17030301. PMID: 26927086; PMCID: PMC4813165.
118. Honkura Y, Matsuo H, Murakami S, et al. NRF2 Is a Key Target for Prevention of Noise-Induced Hearing Loss by Reducing Oxidative Damage of Cochlea. *Sci Rep.* 2016;6:19329. Published 2016 Jan 18. doi:10.1038/srep19329

119. Kurioka T, Matsunobu T, Satoh Y, Niwa K, Endo S, Fujioka M, Shiotani A. ERK2 mediates inner hair cell survival and decreases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Sci Rep.* 2015 Nov 18;5:16839. doi: 10.1038/srep16839. PMID: 26577290; PMCID: PMC4649542.
120. Lavinsky Joel, Friedman Rick A., Lavinsky Luiz. Estudo de Associação do Genoma Inteiro para Descoberta de Genes da Susceptibilidade à Perda Auditiva Induzida por Ruído [Tese on the Internet]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2015 [cited 2019 Nov 24]. 260 s. Available from: <http://hdl.handle.net/10183/118282> Doutorado em Medicina

3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O avanço nas pesquisas da genética da perda auditiva foi considerável principalmente na última década. Com o sucesso da utilização de modelos animais no estudo da PAIR, principalmente camundongos de linhagens endogâmicas, a descoberta de genes candidatos é cada vez maior. Nesse interim surge a necessidade de busca de outros fenótipos ainda não explorados.

A utilização dos Potenciais Evocados de Tronco Encefálico para avaliação do limiar auditivo consagrou-se nos estudos de PAIR. Porém existem outras formas de estimar os limiares auditivos, sendo o caso das Emissões Otoacústicas por Produtos de Distorção (EOPD). Essa metodologia avalia especificamente a função das células ciliadas externas, que são acometidas precocemente na PAIR.

Buscando unir as experiências dos estudos prévios com camundongos na PAIR, nesse estudo pretendemos realizar um Estudo de Associação do Genoma Inteiro utilizando protocolos rígidos de exposição ao ruído em camundongos previamente genotipados do *Hybrid Mice Diversity Panel*.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Mapear genes relacionados à perda auditiva induzida por ruído através de Emissões otoacústicas por produtos de distorção através de um estudo de associação do genoma inteiro utilizando o *Hybrid Mice Diversity Panel (HDMP)*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão coclear dos genes candidatos (eQTLs).
- Disponibilizar publicamente a informação dos genes candidatos ao fenótipo estudado.
- Correlacionar os dados encontrados no estudo com dados disponíveis na literatura referentes à genética da PAIR.