

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas**



**Estudo de Associação do Genoma Inteiro para  
Descoberta de Genes da Susceptibilidade  
à Perda Auditiva Induzida por Ruído**

**JOEL LAVINSKY**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Lavinsky

Coorientador Estrangeiro: Prof. Dr. Rick A. Friedman

Tese de Doutorado

2015

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas**



**Estudo de Associação do Genoma Inteiro para  
Descoberta de Genes da Susceptibilidade  
à Perda Auditiva Induzida por Ruído**

**JOEL LAVINSKY**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Lavinsky

Coorientador Estrangeiro: Prof. Dr. Rick A. Friedman

Tese de Doutorado

2015

## FICHA CATALOGRÁFICA

Lavinsky, Joel

Estudo de Associação do Genoma Inteiro para  
Descoberta de Genes da Susceptibilidade a Perda  
Auditiva Induzida por Ruído / Joel Lavinsky. -- 2015.  
250 f.

Orientador: Luiz Lavinsky.

Coorientador: Rick Friedman.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Estudo de Associação do Genoma Inteiro. 2.  
Perda Auditiva Induzida por Ruído. 3. Hybrid Mouse  
Diversity Panel. I. Lavinsky, Luiz , orient. II.  
Friedman, Rick, coorient. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, por serem minhas referências e os orientadores da minha formação como indivíduo e profissional. Agradeço o apoio durante esse longo período no exterior.

À minha amada esposa Lísia, pelo apoio incondicional e carinho pleno. Embora distantes nesse período de doutorado no exterior, os nossos sentimentos sempre estiveram muito próximos.

Às minhas irmãs, por participarem e me apoiarem em todos esses desafios da minha vida.

Aos tios, primos e cunhados, por serem responsáveis pela formação de uma família caracterizada por princípios e valores éticos.

Ao meu orientador brasileiro, Prof. Dr. Luiz Lavinsky, modelo de médico, pesquisador e professor. Referência sólida da minha formação acadêmica e profissional. Recebi importante orientação, apoio e incentivo durante esse período no exterior.

Ao meu coorientador estrangeiro, Dr. Rick Adam Friedman, por ter me orientado na realização dos experimentos referentes a minha tese de “doutorado-sanduíche” em Los Angeles (EUA).



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2.1 Referências da Introdução .....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	18
2.1 Conceitos Básicos.....	18
2.1.1 Gene, Alelo, <i>Locus</i> .....	18
2.1.2 Genótipo, Fenótipo, Dominante, Recessivo, Codominante, Aditivo.....	19
2.1.3 Polimorfismo, Mutação .....	21
2.1.4 Polimorfismo de Base Única ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ).....	22
2.1.5 Ligação Gênica .....	22
2.1.6 Traço Complexo, Multifatorial, Poligênica, Monogênica .....	24
2.1.7 Hipótese de Doença Comum/Variante Comum.....	24
2.1.8 Estratificação Populacional.....	26
2.1.9 Haplótipo .....	27
2.1.10 Projeto “ <i>Human Haplotype Map</i> ” .....	27
2.1.11 Traços Quantitativos .....	28
2.1.12 Tecnologias de Genotipagem.....	30
2.1.13 Amplificação do DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	31
2.2 Estudos de Associação Genética.....	33
2.2.1 Estudos de Associação Direta.....	34
2.2.2 Estudos de Associação Indireta .....	34
2.2.3 Mapeamento de Traços Complexos.....	37
2.2.3.1 Análise de Ligação para Traços Complexos .....	38
2.2.3.2 Análise de Ligação para Traços Qualitativos .....	38

2.2.3.3	Análise de Ligação para Traços Quantitativos .....	39
2.2.3.4	Associação com a Doença .....	40
2.3	Estudo de Associação do Genoma Inteiro ( <i>Genome-wide Association Study - GWAS</i> ) .....	41
2.3.1	Estudos de Associação do Genoma Inteiro em Humanos .....	43
2.3.2	Estudos de Associação do Genoma Inteiro em Camundongos.....	51
2.3.3	Novas Estratégias para Estudos Genéticos em Camundongos .....	54
2.3.3.1	Associação com linhagens clássicas.....	54
2.3.3.2	<i>Hybrid Mouse Diversity Panel</i> (HMDP) .....	56
2.3.3.3	<i>Collaborative Cross</i> .....	58
2.3.3.4	Estoque Heterogêneo ( <i>heterogeneous stock</i> ).....	59
2.3.4	Genes Candidatos e Traços Complexos.....	62
2.3.5	Genética de Sistemas .....	67
2.3.5.1	Estudos de Genética de Sistemas.....	69
2.3.5.2	Expressão Gênica .....	71
2.3.6	Complexidade das Interações .....	73
2.3.6.1	Interações entre os Genes .....	73
2.3.6.2	Interações dos Genes com o Ambiente.....	76
2.3.7	Modelos de Rede .....	77
2.4	Estudos de Associação do Genoma Inteiro na Orelha Interna.....	80
2.5	Perda Auditiva Induzida por Ruído .....	85
2.5.1	Fisiopatologia da PAIR.....	85
2.5.2	Quadro Clínico.....	87
2.5.3	Investigação Diagnóstica .....	88
2.5.4	Diagnóstico Diferencial da PAIR .....	90

2.5.5 Tratamento .....	90
2.6 A Genética da Perda Auditiva Induzida por Ruído .....	91
2.6.1 Descoberta de Genes da PAIR em Humanos.....	91
2.6.1.1 Genes de Estresse Oxidativo .....	94
2.6.1.2 Genes do Ciclo do Potássio .....	97
2.6.1.3 Formas Monogênicas de Surdez.....	99
2.6.1.4 Genes <i>Hsp70</i> .....	100
2.6.2 Descoberta dos Genes da PAIR em Camundongos .....	101
2.7 A Família NOX.....	113
2.7.1 Espécies Reativas de Oxigênio na Família NOX .....	114
2.7.2 <i>Nox3</i> .....	115
2.7.3 O <i>Nox3</i> e a Orelha Interna .....	118
2.7.3.1 O <i>Nox3</i> e o Sistema Vestibular.....	121
2.7.3.2 O <i>Nox3</i> e o Dano Auditivo .....	123
2.8 Referências Bibliográficas da Base Teórica .....	124
3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO .....	154
4 OBJETIVO .....	155
4.1 Objetivo Geral.....	155
4.2 Objetivos Específicos .....	155
5 ARTIGO EM LÍNGUA INGLESA.....	156
6 VERSÃO DO ARTIGO EM LÍNGUA PORTUGUESA .....	203
7 ANEXOS .....	250



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA — Análise de variância

*Apoa2* — Apolipoproteína A2

*Asxl2* — *Additional sex combs-like 2*

bp — Pares de bases (*base pairs*)

*CAT* — Catalase

CCE — Células ciliadas externas

CCI — Células ciliadas internas

*CDH23* — Caderina 23

*CFTR* — *Regulador de condutância transmembranar de fibrose cística (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)*

*Cip1* — *Cyclin-dependent kinase interacting protein 1*

CMIP — *C-Maf Inducing Protein*

COOH — Carboxilo protonado

*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

EOAPDs — 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*)

FAD — Dinucleótido de flavina-adenina

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

*GJB2* — *Gap junction beta-2*

*GPX1* — Glutationa peroxidase

*GRM7* — *Glutamate receptor, metabotropic, 7*

*GRM8* — *Glutamate receptor, metabotropic, 8*

*GSH* — Glutationa reduzida

*GSR* — Glutationa redutase

*GSSG* — Glutationa dissulfato

*GST* — Glutationa 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

IC95% — Intervalo de confiança de 95%

*IQGAP2* — *IQ motif-containing GTPase-activating-like*

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*)

neoR — Resistência à neomicina

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

*PON2* — Paraxonase/arilesterase 2

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

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

OC90 — *Otocin 90*

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

RFLP — Polimorfismo de fragmentos com comprimento restrito (*restriction fragment length polymorphism*)

RI — Resistência à insulina

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

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

siRNA — Pequena interferência de RNA (*small interfering RNA*)

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*)

TYROBP — *TYRO protein tyrosine kinase-binding protein*

VsEPs — Potenciais evocados vestibulares (*vestibular evoked potentials*)

## 1. INTRODUÇÃO

A perda auditiva induzida por ruído (PAIR) é a líder mundial no risco à saúde ocupacional em países industrializados e a segunda forma mais comum de deficiência auditiva neurossensorial, após a presbiacusia (1). Nos Estados Unidos, aproximadamente 10% da população total é exposta, diariamente, a níveis perigosos de ruído no ambiente de trabalho (2)(3). O risco poderia ser reduzido através de um melhor entendimento dos processos biológicos que modulam a susceptibilidade ao ruído. Acredita-se que a PAIR é uma doença complexa, que resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais. Está bem estabelecido que pessoas expostas ao ruído de forma semelhante apresentam variação no grau de perda auditiva, indicando um componente genético (4). Estudos com gêmeos estimam que a herdabilidade da PAIR é de aproximadamente 36% (5).

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

A base genética da PAIR tem sido claramente demonstrada em animais, já que diferentes linhagens de camundongos consanguíneos apresentam diferentes susceptibilidades ao ruído (4). Algumas linhagens de camundongos (C57BL/6J) que apresentam perda auditiva relacionada à idade, também se mostraram mais

susceptíveis ao ruído que outras linhagens (6). Além disso, diversos camundongos mutantes (*knockout*), como SOD1<sup>-/-</sup> (7), GPX1<sup>-/-</sup> (8) e PMCA2<sup>-/-</sup> (9)(10), se mostraram ser mais sensíveis ao ruído do que o tipo selvagem. O camundongo tem sido um modelo animal essencial para estudos em perda auditiva. Os avanços na genética dos camundongos, incluindo o sequenciamento do genoma e o mapa altamente denso de polimorfismos de base única (SNP), têm gerado um sistema adequado para o estudo de um traço complexo como a PAIR (6). A identificação de novos genes é crucial para a descoberta de novas vias e redes de genes. Isso aumentará nosso conhecimento sobre a biologia auditiva básica e será possível identificar novos potenciais alvos terapêuticos para combater a PAIR. Da mesma forma, será possível o desenvolvimento de testes de susceptibilidade à PAIR.

Em função das limitações dos estudos humanos de associação do genoma inteiro e das análises de *locus* de traço quantitativo (QTL) em camundongos, optou-se por utilizar a estratégia de associação do genoma inteiro através da incorporação do *Hybrid Mouse Diversity Panel* (HMDP). O HMDP é uma coleção de linhagens de camundongos consanguíneos clássicos e recombinantes, cujos genomas têm sido sequenciados e/ou genotipados com alta resolução (11). O cálculo de poder tem demonstrado que esse painel é superior à análise de ligação tradicional (*linkage*) e é capaz de detectar *loci* responsáveis por 5% da variância global. Diversos estudos, de forma bem-sucedida, têm mapeado *loci* candidatos em traços complexos através desse painel para o mapeamento de diversos fenótipos (12)(13)(14)(15).

Nessa tese de doutorado será desenvolvida uma pesquisa inédita com o objetivo de realizar uma análise de associação do genoma inteiro para o mapeamento de genes envolvidos na susceptibilidade à PAIR, utilizando linhagens de camundongos consanguíneos.

Após esse mapeamento, será realizado o processo de confirmação do gene candidato com o uso de modelos mutantes de camundongos. O detalhamento por eletrofisiologia e imuno-histoquímica investigará o papel desse gene candidato na susceptibilidade à PAIR e o mecanismo envolvido na orelha interna.

## **2.1 Referências da Introdução**

1. Stucken EZ, Hong RS (2014) Noise-induced hearing loss: an occupational medicine perspective. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 22: 388–393. doi:10.1097/MOO.000000000000079.
2. Dobie RA (2008) The burdens of age-related and occupational noise-induced hearing loss in the United States. *Ear Hear* 29: 565–577. doi:10.1097/AUD.0b013e31817349ec.
3. Yankaskas K (2013) Prelude: noise-induced tinnitus and hearing loss in the military. *Hear Res* 295: 3–8. doi:10.1016/j.heares.2012.04.016.
4. Sliwinska-Kowalska M, Pawelczyk M (2013) Contribution of genetic factors to noise-induced hearing loss: a human studies review. *Mutat Res* 752: 61–65. doi:10.1016/j.mrrev.2012.11.001.
5. Heinonen-Guzejev M, Vuorinen HS, Mussalo-Rauhamaa H, Heikkilä K, Koskenvuo M, et al. (2005) Genetic component of noise sensitivity. *Twin Res Hum Genet Off J Int Soc Twin Stud* 8: 245–249. doi:10.1375/1832427054253112.
6. Erway LC, Shiau YW, Davis RR, Krieg EF (1996) Genetics of age-related hearing loss in mice. III. Susceptibility of inbred and F1 hybrid strains to noise-induced hearing loss. *Hear Res* 93: 181–187.

7. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Flood DG, Reaume AG, et al. (1999) Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (Sod1) increases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Audiol Neurootol* 4: 237–246. doi:13847.
8. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Lear PM, Ho YS (2000) Targeted mutation of the gene for cellular glutathione peroxidase (Gpx1) increases noise-induced hearing loss in mice. *J Assoc Res Otolaryngol JARO* 1: 243–254.
9. 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.
10. Holme RH, Steel KP (2004) 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* 5: 66–79. doi:10.1007/s10162-003-4021-2.
11. Bennett BJ, Farber CR, Orozco L, Kang HM, Ghazalpour A, et al. (2010) A high-resolution association mapping panel for the dissection of complex traits in mice. *Genome Res* 20: 281–290. doi:10.1101/gr.099234.109.
12. Farber CR, Bennett BJ, Orozco L, Zou W, Lira A, et al. (2011) Mouse genome-wide association and systems genetics identify *Asxl2* as a regulator of bone mineral density and osteoclastogenesis. *PLoS Genet* 7: e1002038. doi:10.1371/journal.pgen.1002038.
13. Park CC, Gale GD, de Jong S, Ghazalpour A, Bennett BJ, et al. (2011) Gene networks associated with conditional fear in mice identified using a systems genetics approach. *BMC Syst Biol* 5: 43. doi:10.1186/1752-0509-5-43.



14. Smolock EM, Ilyushkina IA, Ghazalpour A, Gerloff J, Murashev AN, et al. (2012) Genetic locus on mouse chromosome 7 controls elevated heart rate. *Physiol Genomics* 44: 689–698. doi:10.1152/physiolgenomics.00041.2012.
15. Davis RC, van Nas A, Bennett B, Orozco L, Pan C, et al. (2013) Genome-wide association mapping of blood cell traits in mice. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 24: 105–118. doi:10.1007/s00335-013-9448-0.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Conceitos Básicos

#### 2.1.1 Gene, Alelo, *Locus*

O conceito de gene foi estabelecido por Mendel, que utilizou a palavra em alemão “fator”. Na terminologia original, ainda utilizada por geneticistas, os genes ocorrem em pares de cromossomos homólogos. Nessa terminologia, os quatro grupos sanguíneos A, B, O e AB (definidos de acordo com as reações de aglutinação) são determinados por três genes: A, B e O. Atualmente, os geneticistas moleculares não chamam esses três fatores de genes, mas de “alelos”. Os alelos são considerados formas alternativas de um gene que pode ocorrer num mesmo *locus* no genoma. Enquanto os antigos geneticistas da drosófila falavam em dois *loci* para um gene e os geneticistas humanos falavam em dois genes em um *locus*, os geneticistas modernos falam em “dois alelos de um gene” ou “dois alelos em um *locus*”. Essa última terminologia será utilizada nesta tese de doutorado. Isso significa que dois alelos no mesmo *locus* são “alélicos” em relação ao outro, enquanto que dois alelos que estão em diferentes *loci* são “não alélicos” em relação ao outro.

Um gene é frequentemente definido por uma sequência de DNA que tem uma função, indicando uma sequência semelhante de DNA envolvida em uma mesma função molecular específica, como a formação dos antígenos de células vermelhas ABO. Alguns restringem a palavra gene somente a genes codificadores de proteínas, mas existem muitas outras sequências de DNA que

apresentam essa função em virtude de serem transcritas em RNA sem nunca terem sido traduzidas em proteínas e, conseqüentemente, a proteínas codificadas. Então essa definição restrita de gene parece não fazer sentido.

Um *locus* é a localização de um gene no genoma, como o gene do sistema ABO. Por definição, um gene deve envolver mais de um par de bases. Os SNPs não ocorrem em *loci*, mas ao redor dos *loci*. Em função da confusão que ocorre quando os SNPs são descritos como ocorrendo nos *loci*, alguns utilizam o termo “gene-*locus*”. Contudo, sempre se deve utilizar o termo *locus* para indicar o posicionamento de um gene funcional. É indicado permitir que os SNPs tenham alelos e que seja utilizado o termo original para as suas localizações. Se existir somente um alelo em um *locus* na população, podemos dizer que esse *locus* é monomórfico ou monoalélico nessa determinada população. Se houver dois alelos, como ocorre frequentemente com os SNPs, podemos utilizar o termo dialélico ou bialélico. Se muitos alelos existirem, devemos descrever o polimorfismo como polialélico ou multialélico. Quando existirem somente dois alelos em um *locus*, o que apresentar menor frequência na população deve ser chamado de alelo menor. No campo da genética, o termo frequência alélica é utilizado para indicar a frequência relativa média, sendo a proporção de todos os alelos em um *locus* entre os membros de uma população.

### **2.1.2 Genótipo, Fenótipo, Dominante, Recessivo, Codominante, Aditivo**

Um genótipo individual é a totalidade do material genético desse indivíduo, enquanto um fenótipo individual é relativo ao aspecto do indivíduo. Entretanto, os termos genótipo e fenótipo são frequentemente utilizados em referência a um *locus* em particular ou um grupo de *loci* e a um traço particular ou a um grupo de

traços. Os genótipos não são observados diretamente, mas inferidos através de fenótipos específicos. Dessa forma, em relação ao *locus* do grupo ABO, os quatro tipos sanguíneos A, B, O e AB são fenótipos e os possíveis genótipos são formados pelos pares de alelos AA, AO, BB, BO, AB e OO. Em relação aos fenótipos do grupo sanguíneo ABO, o alelo A é dominante em relação ao alelo B e o alelo O é recessivo em relação ao alelo A. De forma semelhante, o alelo B é dominante em relação ao alelo O e o alelo O é recessivo em relação ao alelo B. Os alelos A e B são codominantes. Para que as palavras dominante e recessivo tenham sentido, pelo menos dois alelos e dois fenótipos devem ser especificados. Se um alelo em particular em *locus* é dominante em relação à presença da doença, deve existir pelo menos um outro alelo naquele *locus* que seja recessivo em relação à ausência daquela doença.

Informalmente, os geneticistas falam sobre a doença como sendo dominante. Em relação ao fenótipo “doença”, o alelo da doença subjacente dominante indica que a doença está presente quando uma ou duas cópias do alelo estão presentes. De forma semelhante, doença recessiva significa que, em relação ao mesmo fenótipo, o alelo recessivo da doença subjacente aponta que a doença está presente somente quando os dois alelos da doença estão presentes. A questão importante é perceber que a dominância ou a recessividade descreve o relacionamento entre um ou mais genótipos de um fenótipo em particular. Isso leva ao conceito de conjunto de fenótipos. Os genótipos AA e AO formam o grupo que corresponde ao tipo sanguíneo A, os genótipos BB e BO formam o grupo correspondente ao tipo sanguíneo B. No caso do grupo sanguíneo ABO, um indivíduo que tem um alelo A e um alelo B tem o tipo sanguíneo AB, que apresenta fenótipo diferente dos demais homocigotos AA e BB. Essa relação é

conhecida por codominância. Em geral, um *locus* é codominante em relação ao grupo de fenótipos que controla se o fenótipo de cada heterozigoto naquele *locus* difere dos correspondentes homozigotos.

Podemos distinguir o codominante do aditivo. O termo codominante implica que o fenótipo (ou distribuição fenotípica) correspondente ao heterozigoto está na metade do caminho entre aqueles dois correspondentes homozigotos. O termo aditivo tem significado somente na existência de um escalonamento de medidas.

### **2.1.3 Polimorfismo, Mutação**

Os tipos sanguíneos A, B, O e AB correspondem a um polimorfismo no sentido de que são fenótipos alternativos que ocorrem frequentemente na população. Um *locus* polimórfico foi originalmente definido como um *locus* determinante de um polimorfismo em que o alelo ocorre com uma frequência de pelo menos 1%. Os diferentes alelos aparecem em um *locus* como resultado de uma mutação ou uma mudança súbita de material genético. Mutação é um evento relativamente raro, causado, por exemplo, em função de um erro de replicação. Portanto, todos os alelos são originalmente alelos mutantes, e o polimorfismo genético foi definido como um *locus* em que a frequência do alelo menos comum tem uma frequência grande demais para ser mantido na população somente através de mutação recorrente. O mais importante em um *locus* é o grau de polimorfismo. Um *locus* em que existem 1.000 alelos com a mesma frequência seria considerado muito mais polimórfico que um *locus* em que existem somente dois alelos com frequências de 0,01 e 0,99. Muitos autores

utilizam o termo mutação para qualquer alelo raro e o termo polimorfismo para qualquer alelo comum.

#### **2.1.4 Polimorfismo de Base Única (*Single Nucleotide Polymorphism*)**

A unidade moderna de indicação de variação genética é o SNP. Os polimorfismos são mudanças específicas de pares de bases na sequência do DNA que ocorrem com alta frequência no genoma humano (1). Nos estudos genéticos, os polimorfismos são frequentemente utilizados como marcadores de uma região no genoma, sendo que a maioria apresenta mínimo impacto nos sistemas biológicos. Os polimorfismos podem ter consequências funcionais através de troca de aminoácido, mudanças na estabilidade do mRNA e mudanças na afinidade de ligação do fator de transcrição (2). Os polimorfismos são a maior forma de variação genética no genoma humano.

Os polimorfismos são o tipo mais comum de variação genética e estão presentes em uma grande proporção da população humana (3). Tipicamente, os polimorfismos apresentam dois alelos, indicando que dentro de uma população existem duas possibilidades de troca de pares de bases comuns para uma dada localização de um polimorfismo. A frequência de um polimorfismo é dada através da frequência alélica menor ou pela frequência do alelo menos comum. Por exemplo, um polimorfismo com uma frequência do alelo menor (G) de 0,40 implica que 40% da população tem o alelo G em relação ao alelo mais frequente, que está presente em 60% da população.

#### **2.1.5 Ligação Gênica**

Algumas doenças, como fibrose cística (e a maioria das doenças genéticas raras), podem ser causadas por múltiplas variantes genéticas dentro de um

mesmo gene. Em função do forte efeito dessa variante genética, a fibrose cística segue um padrão de herança autossômica dominante em famílias com essa doença. Um dos maiores sucessos da genética humana foi a identificação de múltiplas mutações no gene *CFTR* como causa da fibrose cística (4). Isso foi alcançado através da genotipagem de famílias afetadas pela fibrose cística utilizando uma coleção de marcadores genéticos ao longo do genoma e através da análise de como esses marcadores segregam com a doença através de diversas famílias. Essa técnica, conhecida por ligação gênica ou *linkage*, foi subsequentemente aplicada de forma bem-sucedida para identificar variantes genéticas que contribuem para doenças raras, como a Doença de Huntington (5). Quando aplicado para doenças comuns, como doenças cardíacas ou câncer, os estudos de ligação gênica não se mostraram eficazes. Isso significa que os mecanismos genéticos que influenciam as doenças comuns são diferentes daqueles envolvidos nas doenças raras (6).

A análise de ligação gênica ampla é o método tradicionalmente utilizado para identificar genes de doenças e tem sido muito bem-sucedido em mapear genes envolvidos em doenças monogênicas mendelianas (7). Para o sucesso da análise de ligação gênica, os marcadores que sinalizam a doença devem segregar com a doença nas famílias. As variantes que causam distúrbios monogênicos são frequentemente raras. Dessa forma, cada alelo segregado será encontrado na mesma base cromossômica de 10 a 20 cM (centimorgans) dentro de cada família (8)(9). Além disso, já que as doenças mendelianas são por definição causadas por variantes altamente penetrantes, os marcadores dos alelos causadores de doença dentro do intervalo de 10-20 cM vão se segregar com a doença.

### **2.1.6 Traço Complexo, Multifatorial, Poligênica, Monogênica**

O termo “traço complexo” foi introduzido há três décadas sem uma definição clara. Foi utilizado para traços que não exibiam um *locus* segregado definido (mendeliano), geralmente em função de que a segregação envolveu mais de um *locus*. Enquanto multifatorial e complexa são conceitos mal definidos e frequentemente intercambiáveis, uma clara distinção deve ser realizada entre multifatorial e poligênico.

O conceito de multifatorial indica que mais de um fator pode estar envolvido na etiologia do fenótipo, tanto genético quanto ambiental ou ambos. Por outro lado, o conceito de poligênico indica que somente fatores genéticos estão envolvidos, frequentemente de forma cumulativa, e que o número de fatores (*loci*) é tão extenso que não podem ser individualmente caracterizados. Portanto, o termo poligênico não deve ser utilizado para incluir fatores ambientais.

### **2.1.7 Hipótese de Doença Comum/Variante Comum**

O conceito de que doenças comuns têm diferente arquitetura genética de base quando comparadas a doenças raras e a descoberta de diversas variantes de susceptibilidade para doenças comuns com alta frequência alélica menor levaram ao desenvolvimento da hipótese de doença comum/variante comum (10). Essa hipótese postula simplesmente que doenças comuns são influenciadas por variação genética que também é comum na população. Existem diversas ramificações para o estudo de doenças complexas.

Se existem variantes genéticas que influenciam a doença, o tamanho do efeito (penetrância) para qualquer variante deve ser pequeno em relação à penetrância encontrada para doenças raras. Por exemplo, se um polimorfismo de



40% de frequência na população causa uma substituição deletéria de aminoácido, gerando o fenótipo de doença, aproximadamente 40% da população apresentaria a doença. Assim, a frequência do alelo e a prevalência na população são diretamente correlatas. No entanto, se o mesmo polimorfismo causador de doença apresentasse uma mínima mudança na expressão gênica que alterasse minimamente o risco da doença, a prevalência da doença e o alelo envolvido apresentariam uma correlação leve. Dessa forma, variantes comuns por definição não podem apresentar alta penetrância.

Se alelos comuns apresentam pequenos efeitos genéticos (baixa penetrância), mas doenças comuns apresentam hereditariedade, conseqüentemente, múltiplos alelos comuns devem influenciar na susceptibilidade à doença. Por exemplo, estudos com gêmeos podem estimar a hereditariedade de uma doença comum em 40%, ou seja, 40% do total da variância no risco da doença é devido a fatores genéticos. Se o alelo de um único polimorfismo gera um pequeno risco no desenvolvimento da doença, esse polimorfismo somente pode explicar uma pequena proporção do total da variância devido a fatores genéticos. Dessa forma, o total de risco genético devido a variação genética comum deve se espalhar através de diversos fatores genéticos. Esses dois pontos sugerem que os estudos genéticos tradicionais baseados nas famílias não são úteis para doenças complexas, indicando a necessidade da mudança para estudos com base populacional.

A frequência com que cada alelo ocorre na população e o risco atribuído ao alelo para doenças complexas são pontos-chave a serem levados em consideração no planejamento dos estudos genéticos, impactando na tecnologia necessária para buscar informação genética e dimensionar o tamanho da amostra

para descobrir efeitos genéticos estatisticamente significativos. O espectro de potenciais efeitos genéticos pode ser visualizado e estratificado de acordo com o tamanho do efeito e pela frequência alélica.

A hipótese de doença comum/variante comum tem sido testada em diversas doenças comuns. Enquanto muito da hereditariedade para essas condições ainda não está explicada, alelos comuns certamente têm um papel na susceptibilidade. Em geral, doenças comuns apresentam diversos alelos susceptíveis, cada um com tamanho de efeito pequeno e que pode aumentar o risco de doença em 1,2 até 2 vezes (11). A partir desses resultados, pode-se dizer que, para a maioria das doenças comuns, a hipótese de doença comum/variante comum é verdadeira; porém, não se deve supor que todo componente genético de qualquer doença comum se deve somente a alelos comuns.

### **2.1.8 Estratificação Populacional**

A estratificação populacional aparece em estudos de caso e controle quando os dois grupos em estudo são pobremente comparados do ponto de vista da ancestralidade genética. Existe então confusão entre o estado da doença (caso ou controle) e a ancestralidade genética, com um consequente aumento das associações falso-positivas. Para promover uma estratificação populacional, as populações subjacentes devem diferir na frequência dos alelos do polimorfismo e devem ser representadas em diferentes frequências em grupos de casos e controles. Detectar e controlar para estratificação populacional é extremamente importante, especialmente em estudos de associação gênica, quando pequenas diferenças entre casos e controles podem apresentar importantes efeitos na análise. Diversos métodos estão disponíveis para detectar e corrigir a

estratificação populacional, incluindo controle genômico, teste de Cochran/Mantel-Haenszel e teste de transmissão do desequilíbrio.

### **2.1.9 Haplótipo**

Consiste em um alelo de cada um dos diversos *loci* que são transmitidos juntos dos pais para os descendentes. Utiliza-se o termo haplótipo para o caso em que todos os *loci* envolvidos estão no mesmo par de cromossomos; portanto, todos os alelos envolvidos estão no mesmo cromossomo. Geralmente, mas não sempre, assume-se que todas as diferentes fases de um heterozigoto múltiplo têm o mesmo fenótipo.

### **2.1.10 Projeto “*Human Haplotype Map*”**

Para testar a hipótese de doença comum/variante comum em um fenótipo, uma metodologia sistemática é necessária para avaliar as variações comuns no genoma humano. Primeiramente, é necessário identificar a localização e a densidade de polimorfismos comuns para identificar regiões no genoma e locais específicos que devem ser examinados em estudos genéticos. Além disso, diferenças populacionais específicas em relação à variação genética devem ser catalogadas para que estudos com fenótipos em diferentes populações possam ser realizados de maneira apropriada. Finalmente, correlações entre variantes genéticas comuns devem ser determinadas para que estudos genéticos não necessitem coletar dados de forma repetida. O projeto internacional *HapMap* foi desenvolvido para identificar variações. Esse projeto utilizou uma ampla variedade de técnicas de sequenciamento para descobrir e catalogar polimorfismos em populações descendentes de europeus, a população africana Yoruba, chineses Han de Beijing e japoneses de Tóquio (12)(13). Esse projeto

tem se expandido e já incluiu 11 populações humanas com genotipagem de mais 1,6 milhões de polimorfismos (3). O genótipo disponibilizado pelo *HapMap* permitiu a análise do desequilíbrio de ligação.

### **2.1.11 Traços Quantitativos**

O *locus* em que os alelos determinam o grau de um fenótipo quantitativo é chamado de QTL (*quantitative trait locus*) ou *locus* de traço quantitativo. De um modo geral, as palavras “quantitativo” e “contínuo” são utilizadas da mesma forma para descrever um fenótipo. Entretanto, os traços quantitativos podem ser discretos. Deve se tomar cuidado ao realizar análises de traços quantitativos de acordo com o tipo de distribuição normal ou anormal.

A transformação de um *locus* de traço quantitativo pode ser linear ou não linear. Os alelos do *locus* de traço quantitativo têm um efeito aditivo se a distribuição fenotípica do heterozigoto é a média da distribuição fenotípica correspondente aos dois homozigotos. Em relação ao fenótipo, o alelo A é dominante em relação ao alelo B e o alelo B é recessivo em relação ao alelo A se a distribuição fenotípica inteira do heterozigoto AB for a mesma que a do homozigoto AA. Qualquer variância entre as médias fenotípicas dos genótipos de um determinado *locus* acima ou abaixo devido à ação do alelo aditivo é conhecida por dominância ou dominância genética. Essa variante dominante pode ocorrer como resultado de um alelo ser dominante em relação ao outro. Porém, essa simples ação do alelo não é necessariamente implicada na variante dominante. A presença da variante dominante depende da escala de medida. Se a distribuição fenotípica do heterozigoto não corresponder à média da distribuição

dos fenótipos dos dois homozigotos, podemos dizer que existe uma codominância.

O conceito de dominância tem um significado diferente quando aplicado a traços quantitativos, como ocorre com a epistasia. Do ponto de vista estatístico, dominância pode ser considerada uma interação *intra locus* ou uma contribuição não aditiva do alelo no fenótipo. Epistasia é um termo genético, sendo atribuído, nos dias atuais, a traços quantitativos para indicar que não existe efeito aditivo dos genótipos em dois ou mais *loci* no fenótipo da população. É caracterizado, do ponto de vista estatístico, como uma interação *inter locus* e, dessa forma, depende de como o fenótipo é mensurado. Interação estatística é um termo com limitação semelhante, mas não está restrito a fatores genéticos. Interação estatística deve ser cuidadosamente distinguida de interação biológica (14). Enquanto a interação biológica não necessita da presença da interação estatística, a presença da interação estatística implica a existência da interação biológica. A magnitude de qualquer efeito de interação pode depender, de forma crítica, de como cada efeito individual é definido (14). Geralmente, não existe perda da capacidade de generalização ao assumir a condição de doença (afetado ou não afetado), já que o traço quantitativo assume valores de 0 ou 1. Dessa forma, esse valor médio representa a prevalência da doença na população. Se existe uma medida quantitativa, como risco relativo ou *odds ratio*, o peso das medições vai determinar se essa interação existe ou não. Além disso, na existência de uma doença com fenótipo binário, a probabilidade de ser afetado é frequentemente transformada em logit, dando origem à chamada responsabilidade pela doença, e essa responsabilidade é tratada como um fenótipo contínuo.

A variante dominante está presente quando existe uma não adição intralocus em um *locus* de traço quantitativo. Da mesma forma, a variante epistática está presente quando existe não adição interlocus. Cada *locus* fornece aumento para seus próprios componentes da variante genética aditiva e da variante genética dominante. Se vários *loci* afetam um *locus* de traço quantitativo, existem múltiplos componentes de variância epistática.

### **2.1.12 Tecnologias de Genotipagem**

Os estudos de associação do genoma inteiro (*genome-wide association studies*) ou GWAS foram possíveis em função da disponibilidade da tecnologia de *chips* de *microarray* que avaliaram mais de 1 milhão de polimorfismos. Duas plataformas têm sido utilizadas na maioria dos GWAS. Uma dessas plataformas é a *Illumina* (San Diego, CA) e a outra é a *Affymetrix* (Santa Clara, CA, EUA). Essas duas tecnologias têm sido frequentemente avaliadas (15) e oferecem diferentes técnicas para medir a variação dos polimorfismos. Por exemplo, a plataforma *Affymetrix* marca pequenas sequências de DNA como um ponto no *chip* que reconhece um alelo específico de um polimorfismo. Os alelos são detectados por hibridização diferencial na amostra de DNA. Por outro lado, a técnica da plataforma *Illumina* utiliza uma tecnologia com sequências de DNA mais compridas para detectar os alelos. Os *chips* da *Illumina* são mais caros, porém fornecem melhor especificidade.

Outra questão importante diz respeito aos polimorfismos disponíveis em cada plataforma para o experimento. Isso pode ser importante conforme a população humana estudada. Por exemplo, é importante utilizar um *chip* que tem mais polimorfismos com melhor cobertura genômica para estudos em africanos

que em europeus. Isso porque o genoma africano teve mais tempo para se recombinar e, dessa forma, apresenta menos desequilíbrio de ligação gênica entre os alelos nos diferentes polimorfismos. Mais polimorfismos são necessários para obter a variação do genoma africano. É importante observar que as tecnologias para mensurar a variação do genoma mudam rapidamente. As plataformas de genotipagem baseadas em *chips*, como as mencionadas anteriormente, estão sendo substituídas por tecnologias de menor custos para o sequenciamento do genoma inteiro.

### **2.1.13 Amplificação do DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Desde 1985, novos métodos de multiplicação de fragmentos de DNA têm facilitado a análise molecular dos genes. A PCR é uma reação rápida, sensível e automatizada para multiplicar fragmentos de DNA a partir de pequenas quantidades de DNA. É tão sensível que pode ocorrer contaminação por DNA indesejado, necessitando de precauções especiais.

A PCR padrão é um procedimento *in vitro* para amplificar alvos de sequências de DNA através de pequenas quantidades de DNA de diferentes origens. Essa amplificação seletiva necessita alguma informação prévia sobre a sequência de DNA que sinaliza o DNA alvo. Baseado nessa informação, dois *primers* de oligonucleotídeos com aproximadamente 15-25 pares de bases (bp) em comprimento são utilizados. Esses *primers* são complementares à sequência externa nas extremidades do local alvo com os dois filamentos de DNA e se ligam de forma específica. Durante cada ciclo de PCR, as moléculas de DNA são alternadamente desnaturadas e cada feixe de DNA é utilizado como fundo

para sintetizar um novo filamento até serem ligadas a um feixe complementar sob condições controladas. A reação de PCR tem aproximadamente 25-35 ciclos. Cada ciclo envolve três reações com temperatura e tempo controlados de forma automatizada (ao redor de 1-5 minutos). As três etapas em cada ciclo são desnaturação do DNA com dois filamentos na temperatura de 93-95 °C para DNA humano, reaquecimento do primer na temperatura de 50-70 °C, dependendo da temperatura de derretimento do DNA de dupla hélice, e síntese de DNA utilizando uma polimerase de DNA com estabilidade de calor ao redor de 70-75 °C. A cada ciclo subsequente, o DNA recém sintetizado no ciclo anterior funciona como um modelo para o seguinte. O primeiro ciclo resulta em DNA recém sintetizado de comprimentos variados nas extremidades, já que a síntese continua para além das sequências alvo. Ao final, pelo menos 105 cópias da sequência alvo específica estão presentes. Isso pode ser visualizado através um feixe único com tamanho específico após utilizar um gel de eletroforese. Além do PCR padrão, outros métodos de análise de PCR têm sido desenvolvidos.

A PCR reversa (RT-PCR) utiliza o mRNA como ponto de partida. Após a primeira fixação do *primer*, um DNA complementar novo é sintetizado por transcrição reversa. Isso é utilizado como modelo para um novo feixe de DNA. Subsequentemente, diversas cópias de cDNA são produzidas por PCR.

A PCR alelo-específica foi designada para amplificar a sequência de DNA de um alelo somente e excluir o outro alelo. Por exemplo, se o alelo 1 tem um par de base A-T em um local específico e o alelo 2 tem o par de base C-G, esses 2 alelos podem ser distinguidos através de uma PCR alelo-específica.



## 2.2 Estudos de Associação Genética

Os estudos de associação genética avaliam a correlação entre a variação genética e a condição de doença para identificar genes candidatos ou regiões no genoma que contribuem para uma doença específica. Uma maior frequência de polimorfismos ou genótipos em um grupo de indivíduos com a doença pode ser interpretada como se a variante testada aumentasse o risco de uma doença específica. Os polimorfismos são os marcadores mais amplamente utilizados em estudos de associação; porém, marcadores microssatélites e inserções/deleções também podem ser utilizados.

Os estudos de associação são a principal ferramenta para identificar genes que conferem susceptibilidade a doenças complexas. Esses traços e doenças são considerados complexos porque tanto fatores genéticos e quanto ambientais contribuem para o risco da susceptibilidade. Já existe uma ampla experiência com estudos genéticos para diversas doenças complexas (como diabetes, doença cardíaca, doenças autoimunes e traços psiquiátricos) que confirmam o fato de que diversas variantes genéticas controlam o risco de desenvolver a doença e que cada variante é capaz de exercer um efeito leve.

A associação genética significativa pode ser interpretada através de associação direta em que o polimorfismo genotipado é a variante causal verdadeira que confere susceptibilidade a doença. Também pode ocorrer por associação indireta, quando o polimorfismo com a variante causal verdadeira é genotipado num desequilíbrio de ligação gênica. Além disso, pode ser um resultado falso-positivo, quando existe risco de erros sistemáticos através da estratificação populacional. A distinção entre a associação direta e a indireta

pode ser desafiadora, pois pode requerer um novo sequenciamento da região candidata, genotipagem de todos os polimorfismos disponíveis ou realização de estudos funcionais que confirmem o papel decisivo dessa mutação na doença.

### **2.2.1 Estudos de Associação Direta**

O desenho mais simples de um estudo utilizado para testar uma associação é o estudo de casos e controles em que uma série de casos afetados pela doença em foco é coletada juntamente com uma série de indivíduos controles. A escolha do fenótipo dos casos pode definir a hipótese a ser testada, sendo necessário ter certeza da homogeneidade entre os casos. Dois métodos padrão são utilizados para coletar os dados entre os controles. O primeiro utiliza uma série de indivíduos que foram triados como negativos para presença da doença. O segundo método busca controles dentro da população de forma randomizada; porém, sem ter certeza quanto à condição da doença. Ambos esses grupos controles podem ser utilizados em um teste de associação e podem apresentar o mesmo poder para determinar uma doença rara. Em doenças mais comuns, um estudo com controles triados vai apresentar maior poder para detectar associação quando comparado a um estudo utilizando a população em geral como controle. Em diversas doenças, o rastreamento de controles para a presença ou ausência de doença pode ser difícil e a utilização de uma grande amostra de indivíduos não triados como controles pode ser mais eficiente.

### **2.2.2 Estudos de Associação Indireta**

O desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*) é a propriedade dos polimorfismos que determina em que grau o alelo de um determinado polimorfismo é herdado ou correlacionado a um alelo de um outro polimorfismo

dentro de uma população. O termo desequilíbrio de ligação foi utilizado por geneticistas populacionais numa tentativa de descrever matematicamente as alterações na variação genética dentro da população ao longo do tempo. Esse termo está relacionado ao conceito de ligação cromossômica, onde dois marcadores cromossômicos se mantem fisicamente juntos num cromossomo ao longo das gerações dentro de uma família. Eventos recombinantes dentro de uma mesma família ao longo das gerações quebram esses segmentos cromossômicos. Esse efeito é amplificado através das gerações e também em uma população com tamanho fixo com acasalamentos aleatórios. A recombinação aleatória de eventos recombinantes irá quebrar segmentos cromossômicos contíguos até que todos os alelos da população estejam em equilíbrio de ligação ou independentes. Dessa forma, a ligação entre os marcadores, em uma escala populacional, é referida como desequilíbrio de ligação.

O enfraquecimento do desequilíbrio de ligação é dependente de diversos fatores, incluindo o tamanho populacional, o número de cromossomos fundadores na população e o número de gerações que uma determinada população existiu. Dessa forma, diferentes subpopulações humanas apresentam diferente graus e padrões de desequilíbrio de ligação. Populações de origem africana são as que possuem maior ancestralidade e menos regiões de desequilíbrio de ligação devido ao acúmulo de mais eventos de recombinação nesse grupo. Populações de origem europeia e asiática foram criadas por eventos fundadores (uma amostra de cromossomos da população africana), os quais alteraram o número de cromossomos fundadores e o tamanho populacional. Essas populações apresentam mais regiões de desequilíbrio de ligação que as populações de origem africana.

Muitas medidas de desequilíbrio de ligação têm sido propostas (16), mas todas são relacionadas à diferença entre a frequência observada de coocorrência para os dois alelos e a frequência esperada se os dois marcadores fossem independentes. As duas medidas de desequilíbrio de ligação mais utilizadas são  $D'$  e  $r^2$  (12)(16). Os polimorfismos que são selecionados para capturar de forma específica a variação em locais próximos no genoma são chamados de polimorfismos *tag* (rótulos), pois os alelos nesses polimorfismos “rotulam” as áreas adjacentes com desequilíbrio de ligação. Os padrões de desequilíbrio de ligação são específicos de cada população e esses polimorfismos *tag* selecionados para uma determinada população podem não funcionar para uma população diferente. O desequilíbrio de ligação é explorado nos estudos genéticos para reduzir a chance de que os polimorfismos genotipados forneçam informações redundantes. De acordo com a análise dos dados fornecidos pelo projeto HapMap, 80% dos polimorfismos comuns entre a população de origem europeia podem ser capturados ao utilizar um subgrupo de 500 mil a 1 milhão de polimorfismos dispersos ao longo do genoma (17).

A presença do desequilíbrio de ligação cria dois possíveis desfechos positivos para um estudo genético de associação. No primeiro desfecho, o polimorfismo que influencia um sistema biológico leva ao fenótipo e está diretamente genotipado no estudo, sendo identificado como estatisticamente significativo para um determinado traço. Esse cenário é conhecido como associação direta, e o polimorfismo genotipado é conhecido como polimorfismo funcional. No segundo desfecho, o polimorfismo não é diretamente avaliado, mas um polimorfismo *tag* com elevado desequilíbrio de ligação com o polimorfismo está significativamente associado ao fenótipo. Isso é conhecido

como associação indireta (6). Em função dessas duas possibilidades, uma associação significativa de um polimorfismo num GWAS não deve ser assumida como a variante causal, sendo necessário estudos adicionais para mapear de forma precisa a localização do polimorfismo em questão. De forma conceitual, o desfecho de um estudo de associação do genoma inteiro, sob a hipótese de doença comum/variante comum, será que, em um painel de 500 mil a 1 milhão de marcadores, serão identificados polimorfismos comuns que estão associados a fenótipos comuns. Esse tipo de estudo necessita de tecnologia de genotipagem com acurácia e de forma custo-efetiva para capturar os alelos de 500 mil a 1 milhão de polimorfismos de cada indivíduo no estudo.

### **2.2.3 Mapeamento de Traços Complexos**

O conhecimento de que uma doença herdada, como uma doença complexa, tem um componente hereditário significativo não indica que os genes e as variantes moleculares são conhecidos. Tem se utilizado duas formas para localizar e identificar genes que predisõem a doenças complexas ou contribuem para a variância genética de traços quantitativos. O primeiro método é a análise de ligação (*linkage analysis*), que utiliza pares de membros de uma mesma família, como irmãos com o mesmo fenótipo. O segundo método é conhecido por associação, a qual procura por alelos específicos com alta frequência em indivíduos afetados em comparação com indivíduos não afetados na população. Ambas as formas apresentam vantagens e desvantagens em determinadas situações.

### **2.2.3.1 Análise de Ligação para Traços Complexos**

A análise de ligação é um método poderoso de mapeamento de doenças monogênicas, mas dificilmente aplicável para doenças complexas. As doenças herdadas com traços complexos não são passíveis de análise que dependam do conhecimento de um gene único herdado com padrão de herança mendeliano. Por isso, alguns métodos não paramétricos têm sido desenvolvidos para não assumir a preocupação quanto ao número de *loci* e determinar como os alelos contribuem para esse determinado traço. Esses “modelos livres” dependem de que se assuma o fato de que os pais afetados têm uma maior probabilidade de apresentarem alelos que predispõem a doença do que o esperado de forma ocasional.

### **2.2.3.2 Análise de Ligação para Traços Qualitativos**

Nesse método, somente irmãos concordantes em relação a uma doença são utilizados. Isso elimina o problema de determinar se o indivíduo não afetado é um carreador não penetrante dos alelos que predispõem a doença ou simplesmente não herdou esse alelo. Não é necessário que seja avaliado o número de *loci* envolvidos ou o padrão de herança. Os irmãos são analisados para determinar se existem *loci* em que o irmão afetado compartilha alelos com maior frequência do que 50% do esperado de forma ocasional. Nesse método de análise de irmãos afetados, o DNA do irmão afetado é sistematicamente analisado através do uso de centenas de marcadores polimórficos ao longo do genoma na busca por regiões que sejam compartilhadas pelos dois irmãos de forma significativa (mais frequente do que esperado de forma aleatória). Quando existir alto grau de compartilhamento de alelos em um marcador polimórfico,

isso sugere que o *locus* relacionado a doença está próximo a esse marcador. Se o grau de compartilhamento de alelos diverge significativamente de 50% do esperado de forma ocasional, isso pode ser analisado por *odds ratio* para gerar um escore LOD não paramétrico para casos de excesso de compartilhamento de alelos. O escore LOD é utilizado nas análises de ligação para avaliar a significância da frequência de recombinação entre dois *loci* que parece ser menor que 50%.

### **2.2.3.3 Análise de Ligação para Traços Quantitativos**

O método de ligação baseado no compartilhamento de alelos pode também ser utilizado para mapear *loci* envolvidos em traços complexos quantitativos. Embora diversos métodos estejam disponíveis, um exemplo interessante é o método de alta discordância entre irmãos. Não é necessário levar em consideração o número do *loci* envolvido ou o padrão de herança. Pares de irmãos que estão nos extremos opostos da curva de Gauss são considerados como discordantes para esse determinado traço quantitativo e podem ser menos propensos a compartilharem alelos que contribuem para esse determinado traço. O DNA de irmãos altamente discordantes é então analisado de forma sistemática através do uso de marcadores de polimorfismos ao longo de todo o genoma na busca por regiões que são compartilhadas entre os dois irmãos de forma significativamente menos frequente do que o esperado de forma ocasional. Quando os níveis de compartilhamento se encontram baixos em um determinado marcador de polimorfismo, isso sugere que o marcador esteja ligado a um *locus* com os alelos que contribuem para essa medida fisiológica.

#### 2.2.3.4 Associação com a Doença

Um método novo de investigação da contribuição genética em doenças complexas se apoia na busca de alelos específicos que estejam associados com a doença. A presença de um determinado alelo num *locus* com frequência aumentada ou diminuída em indivíduos afetados em relação aos controles é conhecido por associação com a doença. Em um estudo de associação, a frequência de um determinado alelo é comparada entre indivíduos afetados e não afetados na população.

Se o tipo de estudo é de caso-controle, é necessário que indivíduos com a doença sejam selecionados na população e comparados a um grupo controle sem doença. Além disso, é necessário que os genótipos desses indivíduos sejam avaliados. A associação entre o genótipo e a doença é calculada por *odds ratio*.

Os métodos de associação são ferramentas poderosas para localizar de forma precisa genes que contribuem para a doença genética através da demonstração dos genes e dos alelos responsáveis. São estudos de execução relativamente fácil, sendo necessária somente a coleta de amostras de indivíduos afetados e controles.

Os estudos de associação devem ser interpretados com cautela, pois existe um alto risco de que um alelo de um *locus* específico descoberto não seja capaz de provar envolvimento na patogênese da doença. Existem duas maneiras de um alelo em particular estar associado sem que seja realmente causador da doença. O principal problema envolvido numa associação artificial é causado pela estratificação populacional. Se a população estiver estratificada em subpopulações separadas (como etnia ou religião) e membros de uma



subpopulação raramente acasalam com membros de outras subpopulações, então a doença que parece ser mais comum em uma subpopulação está incorretamente associada aos alelos encontrados. Associações fictícias em função da estratificação populacional podem ser minimizadas através de uma cuidadosa seleção dos controles. Novos métodos têm sido desenvolvidos para testar associações entre doenças e alelos específicos dentro das famílias.

Uma segunda limitação é o fato de que muitos *loci* podem estar no mesmo desequilíbrio de ligação. Por exemplo, dois *loci* próximos têm dois alelos que estão em desequilíbrio de ligação em relação ao outro. Isso significa que quando um desses alelos está presente num haplótipo, o outro também tem uma chance aumentada de estar presente nesse mesmo haplótipo. De fato, todos os alelos no desequilíbrio de ligação com um alelo no *locus* envolvido com a doença vão demonstrar uma associação aparentemente positiva, mesmo se apresentar relevância funcional na susceptibilidade a doença ou não. A associação baseada no desequilíbrio de ligação é muito útil, especialmente quando os alelos associados estão perto o suficiente do *locus* da doença para parecerem estar associados.

### **2.3 Estudo de Associação do Genoma Inteiro (*Genome-wide Association Study - GWAS*)**

Os GWAS foram inicialmente propostos por Botstein et al (18). O princípio é o de genotipar diversas variantes genéticas comuns ao longo do genoma, as quais podem agir como representantes de variantes não genotipadas pela herança em comum de variantes vizinhas em um segmento do cromossomo. Botstein sugeriu que fosse utilizado um painel com polimorfismos de fragmentos com

comprimento restrito (*restriction fragment length polymorphisms*, RFLPs) para examinar como a transmissão familiar de variantes alélicas rastreiam a transmissão do fenótipo. Quando o polimorfismo apresenta ligação significativa com uma determinada doença, marcadores adicionais podem ser genotipados nessa região. Tal procedimento é conhecido como mapeamento fino com o sequenciamento para identificar o gene e a variante responsável. A análise da transmissão familiar por ligação tem sido utilizada de forma bem-sucedida para identificar variantes raras subjacentes a mais de 2.000 doenças monogênicas até hoje. As doenças monogênicas, como a hipercolesterolemia familiar, são relativamente menos comuns na população e são tipicamente causadas por variantes raras, geralmente levando a alterações na sequência de aminoácidos e, conseqüentemente, a doença. As doenças complexas, por outro lado, resultam de contribuições de múltiplos fatores genéticos e ambientais, sendo tipicamente doenças mais comuns. Conforme abordado por Risch & Merikangas (19), os estudos de ligação falham em identificar variantes comuns em traços multifatoriais devido a limitações inerentes ao método.

O sucesso dos estudos de associação do genoma inteiro iniciou a partir da identificação de dezenas de variantes genéticas comuns associadas a doenças e traços comuns. Essas descobertas estimularam novos pensamentos sobre a arquitetura genética de traços comuns através da evidência de que variações comuns explicam, pelo menos em parte, a variação no risco de desenvolver doenças frequentes, sendo mais conhecido com hipótese da doença comum/variante comum (20).

Os GWAS utilizam marcadores abundantes e facilmente identificáveis, os polimorfismos, que são substituições de um par de base único com uma

frequência do alelo menor superior a 0,01. Fundamentalmente, esses estudos de associação são simples e testam a hipótese de que a frequência do alelo difere entre os indivíduos com diferentes fenótipos.

Embora esses estudos tenham sido propostos há mais de 20 anos, somente após a divulgação do sequenciamento completo do genoma humano isso foi possível (21) através da publicação de milhões de polimorfismos em bancos de dados públicos (22), desenvolvimento de tecnologia de genotipagem de alta-resolução e publicação final do *Human Haplotype Map* (HapMap) (12).

Antes da era dos GWAS, poucos polimorfismos avaliados através de genes candidatos eram replicáveis (23)(24). Isso era explicado em parte por pobre desenho de estudo, erro de genotipagem, estratificação da população, valor p com limiares permissivos com resultados falso-positivos e tamanho de amostra inadequado, derivando em resultados falso-negativos. Atualmente, grupos como o do *US National Cancer Institute* e do *National Human Genome Research Institute* sugerem padrões para a realização de estudos de associação genética (25).

### **2.3.1 Estudos de Associação do Genoma Inteiro em Humanos**

Como em todos os estudos epidemiológicos, o primeiro passo é definir cuidadosamente o traço em estudo e utilizar decidir sobre o uso de uma variável qualitativa ou quantitativa. Os traços quantitativos geralmente aumentam o poder através de uma informação mais ampla, mas também podem diminuir o poder se as medições não forem precisas. Alguns traços, como as doenças, são por definição qualitativos, mas podem ser medidos de forma quantitativa. Da mesma forma, traços quantitativos podem ser analisados de forma qualitativa

através da aplicação de ponto de corte, como ao comparar indivíduos nos extremos da curva de distribuição para reduzir a heterogeneidade.

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

É muito provável que a maioria dos traços humanos que apresentam variabilidade tem componente genético. Entretanto, está bem estabelecido que o grau de hereditariedade difere amplamente entre os traços e a hereditariedade reflete o total de efeito da variação genética, assim como fatores ambientais e comportamentais segregados em famílias. Por isso, pode ser útil avaliar a parcela de variabilidade de um dado traço explicado pela hereditariedade antes de iniciar a execução de um caro GWAS. Dessa forma, se a hereditariedade de um traço é baixa, problemas com a definição do traço, erros de medida ou outros erros sistemáticos podem gerar vieses nos estudos de associação genética. Nesses casos, pode-se tentar enriquecer os efeitos genéticos através da avaliação precisa de subfenótipos bem definidos (como medidas de resistência à insulina, ao invés do diagnóstico de diabetes tipo 2).

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

na amostra utilizada, especialmente em famílias. Geralmente, os estudos que avaliam hereditariedade examinam a agregação familiar, concordância entre monozigóticos quando comparados a gêmeos dizigóticos e risco de recorrência entre irmãos (26).

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

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

A proporção de controle e casos é uma questão dependente da disponibilidade de recursos. Pode existir opção entre o aumento da proporção de

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

Os estudos de coorte são mais difíceis e caros de coletar, já que envolvem a fenotipagem de uma grande população de indivíduos e frequentemente com longos períodos de seguimento para detectar os eventos. Esses estudos têm a vantagem de serem mais representativos da população e, por isso, com menos propensão aos vieses. Entretanto, a condição em estudo deve ser relativamente comum na população para um estudo com poder satisfatório, sendo de difícil aplicação nas doenças raras. Enquanto existe menor risco de viés de seleção entre casos e controles, pode haver redução da precisão ao mensurar os desfechos. Existe a vantagem de que os indivíduos podem ser examinados e acompanhados para diversos traços diferentes, como foi realizado no estudo de Framingham (27).

Se o fenótipo é qualitativo, raro e tem baixa taxa de segregação nas famílias, um estudo de análise familiar pode ser muito útil. Entretanto, a agregação familiar pode ser devido ao compartilhamento dos mesmos fatores ambientais

com raras variantes genéticas. Os estudos em famílias se baseiam na frequência de transmissão dos alelos dos pais heterozigotos aos indivíduos afetados em relação ao que seria esperado de forma aleatória. Existem métodos que analisam somente os componentes dentro das famílias e têm a vantagem de não necessitar da informação fenotípica dos pais e da estratificação populacional. Além disso, diversos métodos têm sido desenvolvidos para aumento de poder ao incorporar componentes dentro das famílias e entre famílias. Estudos em famílias são vantajosos na avaliação das doenças pediátricas, sendo a maior desvantagem o fato de averiguar os genótipos familiares. Além disso, todos os estudos de transmissão familiar são mais sensíveis a associações falso-positivas em função de erros de genotipagem do que estudos de indivíduos não relacionados (28).

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

A estratificação populacional também é conhecida por confusão por ancestralidade, a qual ocorre quando as amostras são compostas por subgrupos com diferenças nas frequências alélicas, em função tanto das diferenças na ancestralidade como do excesso de relação entre os indivíduos com consequente diferenças fenotípicas. Isso pode confundir um estudo, resultando em achados falso-positivos e falso-negativos (29).

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

A associação entre o fenótipo e o genótipo é avaliada através da comparação de padrões dos alelos entre os indivíduos com diferentes fenótipos. Todos os padrões de herança (aditivo, dominante ou recessivo) podem ser avaliados em testes de alelos individuais com 1 grau de liberdade, o que aumenta o poder estatístico para detectar efeitos que seguem um modelo em especial e também o número de hipóteses testadas. Dessa forma, a maioria dos estudos de traços qualitativos com padrão de herança alélico desconhecido tem utilizado testes genotípicos genéricos ou testes aditivos de tendência alélica. O teste genotípico geral compara a distribuição entre as frequências dos três genótipos (homozigoto dominante, homozigoto recessivo e heterozigoto) entre casos e controles e frequentemente utilizam testes de qui-quadrado de Pearson com 2 graus de liberdade ou teste exato de Fischer. O teste de tendência alélica assume



um modelo de genética aditiva e testa se a angulação de uma linha de regressão com os três genótipos como variáveis independentes difere de zero e pode ser ajustada para covariância. O teste de tendência mais frequentemente utilizado é o teste de Cochran-Armitage, enquanto o teste de qui-quadrado para frequência alélica menor não é recomendado (30).

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

Existe um grande problema em discussão a respeito dos testes múltiplos realizados nos GWAS. O *Wellcome Trust Case Control Consortium* estabeleceu um limiar de  $5 \times 10^{-7}$  baseado em cálculos de poder estatístico. Mostrou que em um estudo com 2.000 casos e 3.000 controles alcançou 80% de poder para detectar uma associação com esse limiar de significância para polimorfismos com uma frequência alélica menor superior a 0,05 e um risco relativo de 1,5. Além disso, houve uma queda para um poder de 43% para um risco relativo de 1,3 (31). O tamanho de efeito de um polimorfismo é calculado como o *odds ratio* ou risco relativo pelo genótipo em traços qualitativos e como um coeficiente beta em um modelo de regressão, o que pode ser interpretado como o efeito de cada alelo adicional nos traços quantitativos.

Em função das dificuldades em especificar o limiar de significância em GWAS e a ampla diversidade de potenciais erros metodológicos, a prova final da associação deve advir da replicação de polimorfismos significativamente

associados em amostras independentes (25). Mesmo para polimorfismos perto de genes que constituem fortes candidatos biológicos, ainda é importante replicar a associação em amostras independentes a fim de aumentar a confiabilidade dos achados. A validação técnica implica em analisar novamente o polimorfismo associado em plataformas de genotipagem diferentes e fornecer evidência de que uma associação observada não ocorreu por erros sistemáticos de genotipagem.

Os estudos de associação do genoma inteiro não podem fornecer uma identificação inequívoca de genes causadores, mesmo se o polimorfismo associado está próximo ou em um gene. No entanto, diversos estudos de associação do genoma inteiro têm encontrado forte associação de determinadas regiões do genoma com diversos genes candidatos, enquanto outros encontraram regiões sem genes conhecidos. Isso possivelmente ocorre em função de elementos regulatórios remotos, amplas regiões de desequilíbrio de ligação ou anotação incompleta do gene.

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

A meta-análise é um estudo que agrupa múltiplos estudos para aumento de poder. Em GWAS, essa técnica tem identificado variantes comuns adicionais com menor efeito em diversos traços, o que pode gerar novos pensamentos sobre a fisiopatologia. A maioria dos estudos inclui somente indivíduos do mesmo “continente ancestral”, e as meta-análises podem agrupar essas amostras com aumento significativo de poder (32).

### **2.3.2 Estudos de Associação do Genoma Inteiro em Camundongos**

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

Até recentemente, o cruzamento genético era a forma mais comum de desenho de estudo para identificar sequências variantes que contribuem para a variação fenotípica em camundongos. Num cruzamento, duas linhagens consanguíneas são acasaladas e sua prole é acasalada entre si (*intercross*) ou com uma linhagem progenitora (retrocruzamento). A prole da segunda geração é fenotipada e genotipada. Finalmente, um estudo de ligação é realizado para identificar uma região associada a um determinado traço (33). Essa técnica tem identificado milhares de QTLs para diversos fenótipos e doenças. Entretanto, cada *locus* de traço quantitativo é uma região ampla, geralmente dezenas de megabases e contém centenas de genes. O processo de identificar uma variante causal e o gene envolvido é caro e difícil. De milhares de QTLs identificados, somente uma pequena fração de genes tem sido identificada.

Esses resultados se comparam pobremente ao recente sucesso dos GWAS em humanos, que têm descoberto centenas de genes envolvidos em dezenas de doenças comuns (34). Entretanto, os estudos com camundongos demonstraram que os estudos de cruzamento necessitam de poucas centenas de animais para identificar *loci*, que agregados, explicam 50% ou mais da variância fenotípica para um determinado traço (35). Esse achado é impactante se comparado aos estudos em humanos, os quais necessitam de milhares de indivíduos para identificar *loci* que estão envolvidos em um dado traço. Além disso, os *loci* identificados explicam somente uma pequena fração da variância fenotípica (36). Essas observações estimularam o desenvolvimento de novas formas de explorar a variação genética em camundongos para identificar as bases genéticas das doenças e dos traços mapeados em humanos. Além disso, os estudos com camundongos têm diversas vantagens em relação aos estudos em humanos, especialmente acesso a tecidos relacionados às doenças, maior habilidade de controlar fatores ambientais e uma melhor caracterização de genes candidatos (37).

Diversas novas estratégias de cruzamento genético têm sido desenvolvidas em camundongos e complementadas pelas mesmas tecnologias utilizadas em humanos. Essas estratégias estão utilizando as técnicas de *microarray* (38)(39) e as técnicas de sequenciamento, que estão possibilitando um mapeamento completo da variação genética em diversas linhagens de laboratório. Recentemente, o *Sanger Institute* sequenciou 17 genomas de camundongos e descobriu 71 milhões de polimorfismos (40), gerando um mapa completo da variação genética em camundongos. Enquanto isso, o *Jackson Laboratory* em conjunto com a Universidade da Carolina do Norte, tem

desenvolvido um *microarray* para genotipagem de camundongos conhecido por *Mouse Diversity Array*, o que mede 600.000 genótipos e pode ser aplicado em centenas de diferentes linhagens de camundongos de laboratório (41). O resultado desses esforços é uma grande revolução no cenário da variação genética e novos pensamentos sobre a origem (42).

Em um esforço em separado, diversos programas de reprodução de camundongos em larga escala têm gerado linhagens consanguíneas com propriedades genéticas vantajosas para a realização de estudos genéticos. Além disso, existe um esforço para expandir a população de linhagens recombinantes e o desenvolvimento de novas linhagens, como desenvolvido pelo *Collaborative Cross Project* (43). Além disso, esforços recentes para caracterizar linhagens de camundongos comercialmente disponíveis têm provido uma alta resolução para o mapeamento de traços complexos.

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas estratégias para estudos de associação do genoma inteiro em camundongos através da maior disponibilidade de linhagens e ferramentas para sequenciamento em larga escala, genotipagem e fenotipagem. Essas estratégias diferem de acordo com a base genética do camundongo que é incluído no estudo, a informação genética coletada e a forma como os fenótipos são mensurados. Essas técnicas identificaram *loci* envolvidos em diversas traços complexos, como níveis de lipídios e triglicerídeos (44)(45), densidade mineral óssea (46), condicionamento ao medo (47), proporção de albumina e creatinina na urina (45), pressão arterial (45), exercício e metabolismo (48) e susceptibilidade a doenças infecciosas (48).

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

A medida da resolução do mapeamento mede o tamanho do intervalo identificado no estudo. A resolução afeta o número de genes que serão identificados como candidatos e associados ao traço afetado pela variante. Uma baixa resolução significa que mais genes e variantes têm que ser testados para confirmar ou excluir o seu papel na contribuição da variação fenotípica. Uma alta resolução significa que menos genes e variantes necessitam ser testados.

### **2.3.3 Novas Estratégias para Estudos Genéticos em Camundongos**

#### **2.3.3.1 Associação clássica com linhagens clássicas**

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

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

O primeiro estudo de associação com linhagens consanguíneas ganhou interesse ao aplicar técnicas em maior escala. Esse interesse gerou o desenvolvimento do *Mouse Phenome Project* (49), um projeto do *Jackson Laboratory* que tem por objetivo criar um amplo catálogo de fenótipo para cada linhagem consanguínea. Atualmente, a maioria das linhagens estão genotipadas ou sequenciadas, e seus genótipos estão disponíveis em bases de dados públicas (40). Dessa forma, os pesquisadores não necessitam obter os genótipos experimentalmente.

Na época do primeiro estudo com linhagem consanguínea, parecia que essa estratégia tinha poder adequado para identificar a variação genética relacionada a um determinado traço. Entretanto, agora se entende que diversas associações

identificadas foram causadas pela estrutura populacional. Os diferentes graus de relação entre as linhagens geraram associações falso-positivas (50).

Um desafio em GWAS em camundongos é o complexo relacionamento entre as linhagens incluídas no estudo. Algumas dessas diferenças vêm de origens ancestrais distintas, como as diferenças entre linhagens derivadas de camundongos selvagens e linhagens clássicas, as quais são descendentes de um camundongo domesticado (42). Além disso, entre as linhagens, existe variabilidade no grau em que cada região específica do genoma é compartilhada em função do complexo processo de reprodução. Os testes de associação estatística assumem que os fenótipos dos indivíduos na associação são independentes. Entretanto, em função do complexo relacionamento genético, esse conceito é violado nos estudos de associação do genoma inteiro em camundongos. Linhagens intimamente relacionadas vão apresentar fenótipo mais semelhante quando comparadas às linhagens mais distantes. Esse fenômeno é conhecido por estrutura populacional, o qual gera associações espúrias. Recentemente, métodos de análise estatística têm sido desenvolvidos para corrigir esse problema, especialmente o *Efficient Mixed-Model Association* (EMMA) (51).

### **2.3.3.2 Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP)**

Enquanto os estudos de associação clássica têm vantagens como resolução, custo, cobertura e reprodutibilidade, a principal fraqueza era a falta de poder para associação do genoma inteiro e falha em conduzir a estrutura populacional. Uma extensão do desenho de estudo com linhagens consanguíneas clássicas é o HMDP (44). O HMDP aumenta o poder estatístico dos estudos de associação



clássica ao incluir um grupo de 70 linhagens recombinantes de camundongos no painel de mapeamento. Nesse desenho, aproximadamente 100 linhagens são fenotipadas (30 linhagens consanguíneas clássicas e 70 linhagens recombinantes) e a associação é realizada após a correção para estrutura populacional utilizando o EMMA. A resolução do mapeamento de um estudo de associação que utiliza somente linhagens recombinantes é menor que um estudo que utiliza linhagens consanguíneas clássicas. Entretanto, a utilização de uma população combinada incluída no HMDP gera um elevado poder estatístico (das linhagens recombinantes) e uma elevada resolução (das linhagens consanguíneas clássicas). O conjunto de linhagens incluído no HMDP foi determinado através de simulação de cálculos de poder (52). O HMDP tem uma resolução aproximada de 2 Mb de tamanho de intervalo.

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

O painel HMDP com 8-10 animais por linhagem tem aproximadamente 80% de poder em detectar *loci* que correspondem por aproximadamente 5% da variância de um traço. A técnica do HMDP tem estudado uma grande variedade de fenótipos como níveis de lipídeos (44), densidade mineral óssea (46) e condicionamento ao medo (47). Esses estudos destacam a vantagem do aumento da resolução, permitindo a identificação de genes em determinados *loci*, como a

previamente conhecida apolipoproteína A2 (*Apoa2*) no colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade) (44) e a nova associação com o *additional sex combs-like 2* (*Asxl2*) com densidade mineral óssea (46).

### **2.3.3.3 Collaborative Cross**

O *Collaborative Cross* é um esforço em larga escala para criar um conjunto de linhagens consanguíneas recombinantes que serão construídas exclusivamente para os estudos de mapeamento de traços complexos e para aplicação nas técnicas de análise dos sistemas biológicos para genética dos camundongos (43)(48)(53). Diferente do HMDP, que consiste nas linhagens atualmente disponíveis, o *Collaborative Cross* tem gerado novas linhagens consanguíneas utilizando um plano específico de reprodução. A linhagem consanguínea recombinante tem sido derivada de oito linhagens fundadoras com o objetivo de produzir animais que têm, em média, uma mesma combinação de ancestralidade de cada fundador. Cinco dos fundadores são de linhagens consanguíneas clássicas e três são de linhagens selvagens. As linhagens consanguíneas clássicas não possuem variantes em muitos genes. Então, o uso de linhagens selvagens geraria um aumento substancial na quantidade da diversidade genética no *Collaborative Cross* e a vantagem ao cobrir uma maior variação quando comparado a outras estratégias. Provavelmente existem mais variantes nos genes que perturbam traços de interesse. O *Collaborative Cross* tem uma segunda vantagem, que seria o fato de apresentar menos estrutura populacional em comparação com as outras estratégias. Mesmo que existam técnicas, como o EMMA, que corrigem para estrutura populacional, a presença da estrutura populacional continua representando um efeito negativo no poder estatístico.

Tem ocorrido uma intensa atividade relacionada ao *Collaborative Cross*, já que as primeiras linhagens estão próximas de estarem disponíveis (54)(55). Embora as linhagens disponíveis pelo *Collaborative Cross* ainda não estejam disponíveis, alguns estudos vêm utilizando formas incompletas de linhagens consanguíneas do *Collaborative Cross*. Um estudo publicado recentemente mapeou de forma bem-sucedida diversos fenótipos hematológicos (56).

#### **2.3.3.4 Estoque Heterogêneo (*heterogeneous stock*)**

O número limitado de linhagens consanguíneas que estão atualmente disponíveis ou que podem ser geradas por esforços como o *Collaborative Cross* colocam um limite no poder estatístico que pode ser alcançado em um estudo genético com camundongos que utiliza linhagens consanguíneas. Uma estratégia é o uso de camundongos não consanguíneos. Esses estudos incluem estoques heterogêneos de camundongos (57). Esses estoques podem ser utilizados em estudos de associação do genoma inteiro em camundongos. Os estoques heterogêneos utilizam animais descendentes de oito linhagens consanguíneas fundadoras e o *Diversity Outbred Mice* (58), que compreende animais descendentes de oito linhagens fundadoras do *Collaborative Cross*. Ambos os estoques heterogêneos e o *Diversity Outbred Mice* são similares em relação aos animais F2 gerados em um cruzamento, mas eles têm a ancestralidade de oito linhagens fundadoras, ao invés de somente duas. Além disso, a população é reproduzida por mais gerações. A principal vantagem dos estoques heterogêneos é que podem ser utilizados para gerar um número ilimitado de animais, possibilitando uma maior amplitude de estudos e podendo encontrar efeitos genéticos mais sutis. Além disso, em função do histórico de reprodução, os animais têm sido submetidos a um maior número de eventos de recombinação,

com uma resolução de mapeamento de aproximadamente 3 Mb para um QTL típico.

Entretanto, diferente de linhagens consanguíneas, cada estoque heterogêneo é único e não tem o mesmo fenótipo e a mesma reprodutibilidade oferecidos pelas linhagens consanguíneas. Além disso, não tem disponibilidade dos genótipos. A estrutura populacional nos estoques heterogêneos complica a análise e reduz o poder. Um amplo estudo com mais de 2.000 camundongos não consanguíneos utilizaram uma extensiva estratégia de fenotipagem (59). Esse estudo disponibilizou uma descrição da estratégia do uso dos estoques heterogêneos para um GWAS em camundongos. Um total de 101 fenótipos foram mensurados, incluindo traços comportamentais, traços relacionados a doenças comuns, bioquímica e traços relacionados a hematologia e imunologia. Esse estudo foi bem-sucedido em relacionar *loci* na maioria dos fenótipos (59).

Uma fonte alternativa de estoques heterogêneos está disponível através de empresas especializadas. Esses animais têm uma estrutura genética que difere dos estoques heterogêneos cuidadosamente construídos pela técnica descrita anteriormente. Muitas dessas empresas têm amplas colônias que são mantidas por diversas gerações, embora sejam descendentes de um pequeno número de linhagens consanguíneas clássicas. Uma caracterização recente dessas populações tem mostrado que alguns desses estoques tem propriedades adequadas para um mapeamento de alta resolução ao longo de várias gerações, desde o fundador do estoque. De fato, alguns estoques podem alcançar uma resolução com tamanho de intervalo de menor de 100 Kb.

A presença de grandes diferenças nas frequências de alelos entre as populações significa que nenhuma população não consanguínea de um estoque comercial é ideal. Contudo, também significa que se houver falha no mapeamento de uma população, o mapeamento de uma segunda população pode ser bem-sucedido em função das diferenças no desequilíbrio de ligação. As populações diferem entre si, gerando um histórico populacional único em cada estoque, porém a vasta maioria da variação presente no animal é derivada de diferenças genéticas presentes nas linhagens consanguíneas fundadoras. Esse conhecimento mostra ser possível obter informação genotípica acurada para cada animal através da coleta de algumas centenas de marcadores e da aplicação do sistema de imputação (60)(61).

Camundongos comerciais não consanguíneos foram recentemente utilizados para mapear variantes associadas a colesterol HDL, pressão arterial sistólica, níveis de triglicerídeos, glicose e proporção albumina-creatinina urinária (62). Além disso, simulações baseadas em um painel de camundongos utilizados no mapeamento mostram que a maioria dos picos com associações está dentro dos limites de 500 kb da variante causal.

A diferença-chave dos novos GWAS em camundongos é que algumas estratégias utilizam linhagens consanguíneas, como o HMDP ou o *Collaborative Cross*, enquanto outros utilizam animais não consanguíneos, como estoques heterogêneos e animais comercialmente disponíveis. As linhagens consanguíneas têm a vantagem da homozigose genômica e a completa reprodutibilidade das medidas do fenótipo. De fato, se o fenótipo apresenta baixa hereditariedade ou se a análise da medida apresenta muito ruído, múltiplos animais geneticamente idênticos podem ser mensurados para obter uma

estimativa acurada do fenótipo em cada linhagem. Essas medidas podem ser combinadas com quaisquer outras medições no mesmo grupo de linhagens, resultando num conjunto mais amplo de fenótipos. Entretanto, o número de linhagens consanguíneas disponíveis é limitado. Se as variantes a serem identificadas apresentarem tamanhos de efeito suficientemente pequenos, mesmo utilizando todas as linhagens consanguíneas apresentará um poder limitado. Dessa forma, o único método prático é a utilização de um amplo número de animais não consanguíneos.

A consideração final consiste em definir se é preferível utilizar uma população especialmente construída para estudos de mapeamento, como o *Collaborative Cross* e estoques heterogêneos, ou se é melhor utilizar recursos disponíveis atualmente que não foram construídos especificadamente para mapeamento, como o HMDP. Em geral, cada população de camundongos apresenta vantagens particulares, como menor quantidade de estrutura populacional e maior controle sobre o nível de diversidade genética. Entretanto, a resolução é vinculada ao número de eventos de recombinação, a qual pode ser limitada para populações de camundongos específicas que foram construídas recentemente para determinado estudo.

#### **2.3.4 Genes Candidatos e Traços Complexos**

Existem três formas comuns de provar o envolvimento de um gene ou de uma variante genética num traço complexo. A primeira forma é a hemizigose recíproca, a qual foi desenvolvida em leveduras (um par de linhagens F1) gerada com um alelo mutante de um gene de interesse em um cromossomo e a deleção desse gene no cromossomo homólogo, para que seja possível analisar o efeito

genotípico do alelo. Os alelos mutantes diferem entre as duas linhagens F1, e a diferença fenotípica entre elas implica o gene a um determinado fenótipo.

A segunda técnica é a complementação quantitativa, que foi desenvolvida a partir da *Drosophila melanogaster* (63). Quando utilizado em camundongos, esse método utiliza um par de linhagens para portar diferentes alelos de um *locus* oriundo de um GWAS em camundongos. Esse par de linhagens é então reproduzido com uma linhagem *knockout* para um determinado gene e com a linhagem originária desse *knockout*. Dessa forma, quatro linhagens F1 são geradas e seus fenótipos são analisados para testar uma interação entre o alelo nulo e o *locus* de traço quantitativo. Uma interação significativa indica que a interação entre os alelos do gene é responsável por aquele *locus* de traço quantitativo.

A terceira técnica é encontrar um enriquecimento de variantes raras e com baixas frequências em genes candidatos nos casos em relação aos controles, como determinado através do resequenciamento de genes candidatos. Essa estratégia foi desenvolvida para estudos em humanos e tem identificado de forma bem-sucedida variantes genéticas humanas que são associadas ao diabetes do tipo 1 (64) e à doença de Crohn (65).

Até hoje, esses três métodos não têm sido amplamente utilizados no estudo da genética dos camundongos. A hemizigose recíproca necessita de uma complexa manipulação genômica que é quase impossível de utilizar em camundongos. A complementação quantitativa é tecnicamente possível e tem sido implementada (66)(67), mas necessita de linhagens selvagens com a mesma origem genética, o que pode ser difícil de obter em camundongos. A maior parte

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

Uma alteração em um gene alvo refere a inativação experimental de um gene para investigar a sua função em determinados organismos. Num animal *knockout*, geralmente camundongos, o gene em estudo é inativado na fase germinativa através da quebra do gene. Os efeitos podem ser estudados em diferentes estágios embrionários e após o nascimento. Esse conhecimento pode ser utilizado para entender os efeitos das mutações nos genes humanos homólogos, como identificado em doenças genéticas humanas. Uma variante do *knockout* é conhecida como variante *knock-in*. Nesse caso, a sequência alvo contém um gene normal que é introduzido por adição ou em substituição do gene a ser estudado.

No preparo de células tronco embrionárias numa mutação *knockout* o gene alvo é “quebrado” (*knockout*) em leveduras ou células tronco embrionárias através de recombinação homóloga com um alelo não funcional produzido artificialmente. O isolamento de células tronco embrionárias com o gene “quebrado” necessita de seleção positiva e negativa. Um gene de bactéria que confere resistência à neomicina (neoR) é introduzido no DNA do alelo artificial, sendo parcialmente clonado do gene normal alvo (68)(69).



Num camundongo transgênico, uma cópia do gene alvo é substituída por um gene alterado durante a fase germinativa. Na primeira etapa das células tronco embrionárias, as células de um blastocisto do camundongo são isoladas após 3,5 dias de gestação (de um total de 19,5 dias de gestação) e transferida para uma cultura de células irradiadas que são inaptas em se dividir. As células tronco embrionárias heterozigotas para a mutação *knockout* são adicionadas. Essas células tronco embrionárias são derivadas de um camundongo que é homozigoto para uma cor (preto) diferente daquele camundongo que vai gerar o blastocisto (branco). As células tronco recombinantes são injetadas no blastocisto do receptor. Os embriões precoces são transplantados para um camundongo pseudogestante. Esses descendentes possuem células normais e células com um gene alterado. O camundongo transgênico pode ser reconhecido pela cor branca com pontos pretos. Esses camundongos são então cruzados com um camundongo homozigoto para a cor branca da geração anterior. Os descendentes pretos desse acasalamento são heterozigotos para o gene mutante. Através de reprodução subsequente, alguns dos seus descendentes (*knockouts*) são homozigotos para o gene mutante e são identificados através da cor (68).

Os geneticistas têm aplicado testes menos rigorosos para estabelecer a causalidade de genes candidatos em QTLs. Um teste simples é se o *knockout* de um gene candidato apresenta um fenótipo anormal (70). Deve ser observado que isso não prova que o QTL atua no gene ou através de determinado gene. Um alelo *knockout* é raramente o mesmo que a variante do alelo em um QTL. Dessa forma, a identificação de que um *knockout* tem algum efeito no fenótipo não prova o efeito desse gene candidato. Quase todas as variantes atuam em QTLs de forma muito sutil, especialmente através do aumento ou da redução do

transcrito. Além disso, fenótipos contrastantes podem ser atribuídos a diferentes alelos num mesmo gene (71).

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

Uma forma alternativa de identificar genes relevantes é um processo trabalhoso de geração de linhagens congênicas (72) que são especialmente desenvolvidas para o mapeamento fino de uma determinada região. Entretanto, essas técnicas têm gerado poucas associações e somente são bem-sucedidas quando o efeito do gene no traço é muito robusto. Existe perspectiva do desenvolvimento de técnicas alternativas para identificar QTLs com resolução de ordem de magnitude superior do que nos estudos de ligação. Dessa forma, seria facilitada a identificação de genes ou variantes causais.

Entretanto, mesmo com essas novas estratégias, a resolução dos estudos genéticos com camundongos é inferior aos estudos genéticos em humanos. Frequentemente, os investigadores analisam uma associação entre a expressão diferencial de um gene e o traço de interesse como forma de vincular esse gene a

um fenótipo. Entretanto, diversos outros métodos podem ser desempenhados, como através de um modelo estatístico comparativo em que a variação genética que contribui para a variação do transcrito, pode contribuir para uma variação no fenótipo através de modelos alternativos não causais (73). Essa técnica pode ser expandida de forma que toda a rede de transcritos esteja associada ao fenótipo.

Na maioria dos casos, os investigadores utilizam um método composto para encontrar genes. Esse método é conhecido por “caixa de ferramentas em bioinformática”, em que os dados de uma sequência, expressão e literatura publicada são sintetizados para aumentar a probabilidade de que um gene causal seja encontrado (74). Esse método ainda precisa ser rigorosamente testado. Um estudo avaliou a eficácia da incorporação de dados de expressão para genes isolados em determinados QTLs, através de 37 estudos, e demonstrou que esse é um método com sucesso limitado (75).

### **2.3.5 Genética de Sistemas**

Os GWAS têm identificado milhares de *loci* que contribuem com doenças comuns em humanos. Entretanto, os genes em cada *locus* podem ser individualmente testados em culturas de células ou em modelos animais, e o mecanismo em um determinado traço pode ser definido através de técnicas de biologia molecular (76). Entretanto, essa análise dos mecanismos subjacentes pode ser desafiadora. A maioria dos *loci* que tem sido identificada para doenças comuns mostra um efeito modesto que pode ser difícil de ser reproduzido de forma experimental. Está claro que, nos estudos que utilizaram organismos experimentais, a variação fenotípica natural geralmente resulta de diversos alelos

interagindo num contexto que é sensivelmente dependente de condições ambientais (77)(78)(79).

Uma forma complementar e alternativa seria através do estudo de um *locus* de cada vez para realizar uma análise global de moléculas biológicas em populações que possuam variações entre os indivíduos em determinados traços clínicos. Avanços tecnológicos recentes têm demonstrado que é possível quantificar centenas e milhares de moléculas, desde sequencias de variações no DNA até marcadores epigenéticos de determinados níveis de transcrição, proteínas e metabólitos.

Por exemplo, parece ser relativamente simples quantificar níveis de transcrição em tecidos, assumindo que determinados tecidos estão disponíveis, através de técnicas de hibridização ou tecnologias de sequenciamento. Os níveis de transcrição podem ser testados para determinadas correlações com o traço clínico ou mapeados em *loci* de cromossomos, para identificar variantes funcionais que podem contribuir para um determinado traço clínico. Os níveis de transcrição podem ser considerados fenótipos intermediários, já que a variação no DNA pode contribuir para um traço clínico através da perturbação na expressão de genes, proteínas e metabólitos. Além disso, esses traços moleculares são dinâmicos e podem ser reativos a determinados fenótipos. A vantagem dessa análise da genética de sistemas é que permite uma análise das interações moleculares num contexto relevante para o traço clínico, mais conhecido por perturbação genética. Ao contrário do que ocorre numa perturbação genética individual (como nos modelos transgênicos), as perturbações genéticas múltiplas são um fenômeno que ocorre naturalmente nas populações. Esse é o ponto fundamental da perspectiva de genética de sistemas,

em que as inferências sobre fenômenos biológicos são raramente separadas do sistema genético em que estão inseridos. Dessa forma, para a generalização dos resultados através de diversas origens genéticas, os experimentos devem ser realizados em múltiplas linhagens com componentes genéticos diferentes.

Além de doenças comuns, a genética de sistemas gera uma arquitetura geral de traços complexos organizadas num processo de informação biológica. Entretanto, a genética de sistemas enfrentou diversas questões acerca dessa arquitetura molecular genética de traços complexos. Uma das questões era como ocorre a variação funcional nas populações, como ocorre o fluxo da informação desde o DNA até o fenótipo e como é a natureza das interações do gene com os fatores ambientais. A genética de sistemas é limitada pela extensão da natureza da variação genética. Entretanto, pode ser combinada com experimentos complementares e banco de dados, como em camundongos transgênicos, através de uma pequena interferência de RNA (*siRNA*) e de modelos preditores. Isso gera um profundo detalhamento do mapeamento da interação do genótipo com o fenótipo (80)(81).

### **2.3.5.1 Estudos de Genética de Sistemas**

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

amplos, como a arquitetura, e dos fenótipos intermediários fisiológicos de traços complexos, como as doenças.

Num estudo hipotético de genética de sistemas, diversos indivíduos são avaliados para um dado traço clínico, níveis de transcrição, proteínas e metabólitos em tecido relevante. As variações dos fenótipos moleculares podem se relacionar umas com as outras e com os traços clínicos de diversas formas. Uma simples correlação gera evidência de uma possível relação entre dois traços (82)(83). Pode-se postular três possíveis explicações: traços moleculares influenciam um traço clínico (ou seja, o traço molecular é o causador do traço clínico), o traço clínico influencia o traço molecular (ou seja, o traço molecular é reativo ao traço clínico), ou ambos são afetados por um fator confundidor (ou seja, o traço clínico e o traço molecular são independentes).

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

Além disso, existem alguns modelos estatísticos que podem ser utilizados para integrar os dados. Por exemplo, diversas técnicas de rede, como de coexpressão, podem identificar grupos de traços moleculares que compartilham dos mesmos traços. Esses grupos, conhecidos por módulos, podem ser testados para relações com traços clínicos.

No delineamento de um estudo de genética de sistemas existem diversas considerações. É importante examinar um número suficiente de indivíduos para que exista um poder adequado para o mapeamento genético e para outras

análises. A resolução do mapeamento é também uma questão importante, já que o objetivo final é relacionar elementos genéticos específicos às alterações dos fenótipos clínicos e moleculares. Se o *locus* é amplo e contém muitos genes, como nos casos de QTL em camundongos e ratos, então é difícil identificar variação genética causal subjacente. Além disso, a estrutura populacional pode ter efeitos consideráveis na arquitetura de traços complexos. Por exemplo, uma coleção de linhagens consanguíneas da *Drosophila melanogaster* gerou um conjunto diferente de QTLs para determinado traço quantitativo comparado ao estudo em uma população não consanguínea que era derivada das mesmas linhagens. Entretanto, existia uma significativa sobreposição de redes subjacente a esses traços (84). Os estudos de genética de sistemas estão se tornando cada vez mais ferramentas poderosas ao analisar fenótipos adicionais, escalas biológicas múltiplas, condições ambientais e alterações ao longo do tempo.

Não é possível coletar dados nessa magnitude em poucos indivíduos. Dessa forma, são utilizadas grandes populações renováveis, como leveduras, moscas, minhocas, camundongos e ratos. Existem diversos novos estudos experimentais, como análises de segregação em massa, que envolvem a análise de indivíduos com fenótipos extremos oriundos de grandes populações de indivíduos fenotipados (85).

### **2.3.5.2 Expressão Gênica**

A análise dos níveis de transcrição é um método simples, sendo rotineiramente utilizado através de técnicas de *microarray* ou micro arranjo ou através de métodos de sequenciamento massivo de RNA (*RNA-seq*). Os níveis de transcrição, de forma semelhante a outros traços quantitativos (como altura),

podem mapear *loci* que explicam variações no genoma. Esse estudo pode ser realizado através de análise de ligação em populações segregadas ou em estudos de associação do genoma inteiro. Embora o mapeamento de níveis de expressão já seja realizado desde a década de 80, o primeiro mapeamento dos níveis de expressão no genoma inteiro foi realizado no ano de 2002, através de uma análise de ligação de uma cruz entre duas linhagens de levedura (86). Os resultados demonstraram uma ampla variedade de transcritos reguladores. Estudos subsequentes com bactérias, leveduras, plantas, minhocas, peixes, moscas e diversos tipos celulares e tecidos de camundongos, ratos e humanos aumentaram o entendimento da regulação genética da expressão gênica. Além disso, têm mostrado que variações genéticas que afetam a expressão gênica são amplamente distribuídas nas populações naturais (86)(87)(44)(88)(89).

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



estar afetando a expressão de centenas de genes, e esses eQTL são conhecidos por bandas *trans* ou pontos quentes (90).

Os estudos que utilizam células e tecidos de camundongos, ratos e humanos têm demonstrado a expressão de um alto percentual de genes ( $\geq 30\%$ ) influenciado de forma importante por eQTLs (89)(91)(92). A maioria dos polimorfismos destacados em mapas de GWAS fora de regiões codificadoras de proteínas e mais de 75% dos polimorfismos mapeados como elementos reguladores têm sido identificados através do projeto da *Encyclopedia of DNA Elements* (ENCODE) (93).

Esses resultados sugerem que variantes genéticas que alteram a expressão gênica, ao invés de alterar a sequência de proteínas, formam as bases primárias de variação natural em traços complexos. Isso contrasta com os distúrbios mendelianos, em que predominam as variações nas regiões codificadoras de proteínas. Os estudos de eQTL em transcritos não codificadores têm emergido, como microRNAs (94) e amplas regiões não codificadoras de RNA entre os genes (95). Parece que o grau de variação genética subjacente aos níveis desses transcritos é menor que o observado em proteínas codificadoras de RNA.

### **2.3.6. Complexidade das Interações**

#### **2.3.6.1 Interações entre os Genes**

A maioria dos estudos sobre traços quantitativos em modelos animais sugere que interações epistáticas (ou seja, não aditivas) entre os *loci* são largamente distribuídas (96), e vários exemplos de interações “gene-em-gene” em traços complexos têm sido identificados. A grande amplitude de variações fenotípicas patológicas que ocorrem nos indivíduos com distúrbios mendelianos representa

uma forma de epistasia. Essa variação é frequentemente observada em estudos que utilizam camundongos transgênicos para genes alvos em que a mutação completa é letal dependendo da origem da linhagem (97). Em populações naturais, as diversidades das variações comuns são forçadas por seleção, de tal forma que a maioria das combinações dos alelos devem ser compatíveis com funcionamento adequado, mas são ainda suficientes para adaptação em ambientes em transformação (98).

No nível molecular, a epistasia pode tomar diversas formas. Um mecanismo comum se preocupa com a dependência de um estado estável dos níveis de moléculas sobre as suas taxas de produção e degradação. Por exemplo, em recente GWAS humano entre indivíduos que consomem álcool, a incidência de câncer de esôfago envolveu uma interação genética forte entre os *loci* que contribuem com a produção de acetaldeído (que é carcinogênico) do álcool com aquelas que contribuem para a degradação do acetaldeído (99). Outro exemplo envolve a formação de complexos moleculares, em que os níveis finais do complexo são limitados por um componente abundante. Por exemplo, um estudo de genética de sistemas analisa os níveis de transcritos e níveis de proteínas no fígado do camundongo através de um painel de linhagens de camundongos. Esse estudo observou que as correlações entre os transcritos e as proteínas são mais fracas em proteínas com múltiplas subunidades do que em homopolímeros (100). De forma específica, a correlação entre os níveis de proteínas ribossômicas com aquelas transcritas foi essencialmente nula. Esse resultado esperado resulta do fato de que qualquer excesso de proteínas, que não foram construídas pelos ribossomos, é rapidamente degradado.

Uma vantagem da genética de sistemas para a análise das interações entre os genes é a de que centenas ou milhares de fenótipos moleculares (como níveis de transcrição) podem ser analisados em uma população única. Entretanto, nesses estudos de mapeamento global, a identificação das interações em múltiplos *loci* é difícil em função do baixo limiar de significância que resulta de comparações múltiplas (101). Essa questão tem sido resolvida através da restrição da análise para QTLs que apresentam efeitos principais significativos, o que pode deixar de lado a maioria das interações epistáticas. Embora existam novos métodos de computação para identificar interações entre os genes (102), continua difícil determinar a importância da interação entre os genes em conjunto de dados de grandes dimensões. Além do problema das comparações múltiplas, as interações entre os genes são difíceis de detectar em populações não consanguíneas, especialmente em alelos que possuem efeitos pequenos ou em baixas frequências (103).

Um estudo recente utilizando uma cruz entre duas linhagens de levedura gerou uma estimativa da importância das interações epistáticas em 46 traços complexos herdados (104). Os autores realizaram um desfecho massivo para análise do tamanho da colônia, a qual foi realizada através de uma ampla diversidade de condições (como diferentes pH, tipos de nutrientes e temperaturas) para o desenvolvimento de determinados traços. Os QTLs identificados explicaram praticamente toda a contribuição aditiva para a variação dos traços herdados. Os autores quantificaram a epistasia através da diferença entre a hereditariedade em sentido amplo (que é estimada através da reprodutibilidade dos traços medidos) e a hereditariedade de senso estrito (que é estimada através da similaridade fenotípica para diferentes graus de relação).

Eles observaram que os traços demonstraram que a epistasia variou de quase zero até 50%. Os resultados têm implicações no problema da hereditariedade ausente, já que as interações epistáticas afetariam a estimativa da hereditariedade (101). O nível das interações nesse estudo poderia ser limitado em comparação aos estudos com mamíferos, já que as leveduras são haploides e as interações fisiológicas poderiam ser mais complexas em organismos multicelulares.

### **2.3.6.2 Interações dos Genes com o Ambiente**

A maior parte dos traços complexos apresentam um significativo componente ambiental, sendo que as interações dos genes com o ambiente parecem ser difusas (96)(105). De fato, quase todas as doenças comuns resultam da combinação de fatores genéticos e ambientais. A frequência e a natureza das interações entre os genes e o ambiente podem ser convenientemente estudadas através da análise global da expressão gênica. Os estudos em leveduras (106), humanos (107), células endoteliais (92) e macrófagos de camundongos (91) observaram uma alta frequência de interações entre os genes e o ambiente. As alterações ambientais são muito mais propensas em modular o efeito de um eQTL distal em comparação a um eQTL local. Por exemplo, um estudo analisou a expressão de um gene em macrófagos peritoneais em 10 linhagens de camundongos em cultura isolada ou em cultura que continha um mediador inflamatório de uma bactéria lipossacarídea (91). De um total de 2.802 eQTL significativos detectados, 2.607 (93%) mostraram evidência significativa de interações dos genes com o ambiente. Nesse estudo, um exemplo impressionante de interação entre o gene e o ambiente foi o achado de “pontos quentes” que regulavam centenas de genes nos macrófagos somente quando eram estimulados por polissacarídeos (91).

O fato de que as interações dos genes entre si e com o ambiente parecem ser extremamente comuns tem implicações no GWAS humano, pois essas interações podem levar a um aumento da estimativa da taxa de hereditariedade (101). Já que os estudos em humanos apresentam baixo poder para identificar essas interações, modelos experimentais serão essenciais para um entendimento mais amplo.

### **2.3.7 Modelos de Rede**

As análises dos sistemas biológicos por modelos matemáticos entre os fenótipos moleculares têm sido desenvolvidas para entender como eles interagem entre si e influenciam os traços complexos (108)(109). As análises em rede têm sido muito informativas. Redes são representações gráficas de interações entre os traços moleculares. As moléculas são representadas por pontos e a relações entre elas como linhas. Essas análises podem ser divididas em três categorias: aquelas baseadas no conhecimento atual, como rotas metabólicas, oriundas de dados experimentais com base nas interações físicas, como entre proteínas de leveduras, e dados inferidos através de análises massivas. Embora essas rotas possam analisar de forma experimental o conhecimento, geralmente não são abrangentes. Para descobrir novos relacionamentos e interações regulatórias, existem novos métodos de construção de redes através de diversos algoritmos. Esses algoritmos podem ser baseados em modelos de regressão, teoria da informação, correlação linear e não linear, maximização da entropia, modelos gráficos gaussianos, redes bayesianas ou uma combinação de todas essas (110).

A avaliação desses conhecimentos, que são disponibilizados através desses métodos, ainda continua a ser desafiante, pois não existe uma técnica experimental para criar uma verdadeira estrutura de rede e ser comparada através de previsões computacionais. O projeto *Dialogue on Reverse Engineering Assessment and Methods* (DREAM) tem procurado avaliar redes biológicas através de dados experimentais e simulados de forma objetiva por meio de métodos de engenharia reversa. Eles avaliaram a performance de mais de 30 métodos de implementação de inferência de redes, utilizando expressão gênica por *microarray* de células de *Escherichia coli*, *Staphylococcus* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados mostraram que nenhuma rede foi superior às restantes nos diversos conjuntos de dados. Padrões diferenciais de conectividade de redes foram estimados através de diferentes técnicas com níveis diferentes de sucesso. Por exemplo, as cascatas lineares de regulação foram mais precisamente estimadas por métodos de regressão e pela rede bayesiana. A rede regulatória de inferência de eucariontes foi menos bem-sucedida que a rede regulatória de bactérias, o que sugere a necessidade de dados adicionais para uma estimativa de precisão em sistemas complexos. A conclusão foi a de que uma rede criada com base na inferência de diferentes técnicas demonstrou a performance mais robusta nos diversos conjuntos de dados.

A integração da informação genética com modelos de rede tem sido utilizada para refinar as inferências, destacar rotas que contribuem para traços clínicos e identificar genes que são os prováveis responsáveis pelos processos biológicos (111)(112). Nesses sistemas, os eQTLs são considerados como os âncoras causais e são adicionados ao processo de construção da rede. Por exemplo, nas redes bayesianas, os genes que mostram evidência de uma

regulação em *cis* podem ser modelados como os “pais” dos genes que não são regulados em *cis*. Assim, a direção da regulação pode ser estabelecida para determinados pares de genes através dos dados oriundos das informações da genética de sistemas. Uma forma integrada tem sido utilizada para identificar interações moleculares que são alteradas nos cérebros de pacientes com doença de Alzheimer. Nesse estudo, os autores construíram uma rede de coexpressão utilizando dados da expressão gênica de três diferentes regiões do cérebro em mais 500 indivíduos afetados e em controles. A comparação dessas redes demonstrou que a conectividade dos genes em diversos módulos foi reconfigurada em indivíduos afetados. Esses resultados dos *cis*-eQTLs, que foram identificados através de análises de expressão gênica no cérebro, foram utilizados com âncoras causais para construir as redes bayesianas e estimar os direcionadores da conectividade diferencial que resultaram na doença. O gene *TYRO protein tyrosine kinase-binding* (TYROBP) foi identificado como o direcionador do módulo do gene enriquecido para expressão no sistema imune e na micróglia. Esse módulo foi reconfigurado no estado de doença e foi correlacionado de forma significativa com a progressão da doença. Uma sobreexpressão do TYROBP nas células da micróglia levou a alterações na expressão que validaram diversas estimativas de redes. Outro estudo de genética de sistemas também estudou as redes integradas de coexpressão de ratos e humanos e identificou o mecanismo de ação do fator de transcrição em um *locus* que está associado ao diabetes tipo 1.

As interações causais entre as traços clínicos e moleculares podem ser estimadas através das análises da genética de sistemas e através da utilização de diversos algoritmos (73)(113)(114). Por exemplo, numa população em que foi

estudado os níveis globais de transcritos e traços clínicos, pode ser questionado se o relacionamento entre os níveis de transcrito e os traços clínicos é causal, reativo ou independente. Como uma variação genética natural na população é aleatoriamente distribuída entre os indivíduos, esses algoritmos de causalidade levam em consideração os efeitos de perturbações genéticas multifatoriais em diversos desfechos fenotípicos. Essas estimativas causais são retratadas como linhas diretas em modelos gráficos que representam o relacionamento entre os traços moleculares. Entretanto, esses métodos têm algumas deficiências, como o uso de modelos lineares para inferir relações que não são necessariamente lineares (115)(61). Além disso, a rede construída, oriunda de análises de genética de sistema, não pode prever as alças de retroalimentação, a não ser que os dados relativos ao tempo de percursos estejam disponível. Embora existam deficiências, as análises integrativas têm sido utilizadas para inferir relações causais entre os fenótipos (73)(116)(117).

#### **2.4 Estudos de Associação do Genoma Inteiro na Orelha Interna**

O primeiro GWAS foi realizado em humanos e publicado no ano de 2009 (118). Esse estudo avaliou a associação para surdez relacionada ao envelhecimento (presbiacusia). O estudo foi realizado utilizando 846 casos e 846 controles selecionados a partir de 3.434 indivíduos selecionados em oito centros em seis países europeus. O DNA dos casos e controles foi avaliado e separado através do método de *Affymetrix 500K GeneChip* em cada centro separadamente. Os 252 polimorfismos melhores classificados identificados numa amostra europeia (1.332 amostras) de não finlandeses e os 177 polimorfismos melhores classificados em um grupo finlandês (360 amostras) foram confirmados utilizando genotipagem específica. Subsequentemente, os 23 polimorfismos



mais importantes foram genotipados de forma individual num grupo europeu independente (138 amostras). Isso resultou na identificação de um polimorfismo replicado e altamente significativo no gene *GRM7* (glutamate receptor, metabotropic, 7), sendo o gene que codifica o *metabotropic glutamate receptor type 7 (mGluR7)*. Além disso, na amostra do grupo finlandês, dois polimorfismos *GRM7* foram significativos, mas em diferentes regiões do gene. Considerando que os finlandeses são diferentes do restante dos europeus, isso pode ser devido à heterogeneidade alélica. Estudos histoquímicos em humanos e camundongos mostraram que o *mGluR7* é expresso nas células ciliadas e nas células do gânglio espiral na orelha interna. Esses dados em conjunto indicam que os alelos comuns do *GRM7* contribuem para o risco individual de desenvolver presbiacusia, possivelmente através de um mecanismo de alteração da susceptibilidade à excitotoxicidade ao glutamato.

Um estudo subsequente (119) avaliou a otosclerose através de método semelhante. A otosclerose é tipo comum de perda auditiva progressiva, caracterizada por um remodelamento anormal do osso na cápsula ótica. A etiologia da doença é desconhecida, e tanto fatores genéticos como ambientais têm sido envolvidos. Para a identificação de fatores genéticos envolvidos na otosclerose, foi utilizado um estudo de caso-controle para a descoberta de uma associação do genoma inteiro através de 555.000 polimorfismos, utilizando amostras agrupadas de DNA. Através da genotipagem dos principais 250 polimorfismos de forma sequencial, foi possível identificar dois polimorfismos altamente significativos que foram replicados em duas populações adicionais independentes. Foram genotipados 79 polimorfismos marcados para um mapeamento fino das duas regiões genômicas definidas pelos polimorfismos

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

Foi realizado um GWAS (120) acerca da presbiacusia numa população finlandesa pequena. Essa população é conhecida como Saami e vive na Finlândia de forma isolada há dezenas de gerações. A escolha dessa população foi motivada pela alta extensão do desequilíbrio de ligação, sendo poderosa para estudos de associação. As amostras de DNA e a avaliação audiométrica foram coletadas de 352 indivíduos finlandeses da etnia Saami (50-75 anos). Foi aplicada uma análise do componente principal para o fenótipo audiométrico multivariável. Os primeiros três componentes principais capturaram 80% da variação nos limiares auditivos. Todos os indivíduos foram genotipados pelo *Affymetrix 100K chip*. Para levar em conta os níveis de relação entre os indivíduos, assim como a estratificação populacional, os testes de associação foram realizados utilizando modelos de regressão. Foram identificados os sinais de associação melhores colocados para os três traços em estudo. O principal polimorfismo (rs457717,  $p=3.55 \times 10^{-7}$ ) foi associado com o componente principal 3 e foi localizado num intron da proteína *IQ motif-containing GTPase-activating-like* (*IQGAP2*). De forma surpreendente, o polimorfismo rs161927 ( $p=0.000149$ ), que foi o sétimo polimorfismo melhor posicionado, esteve

imediatamente abaixo do gene *GRM7*, como foi apontado no estudo prévio realizado pelo mesmo grupo (118).

Em 2011, foi realizado um GWAS dentro do *International Consortium G-EAR* (121). Uma meta-análise de GWAS foi realizada através de seis populações europeias isoladas de ancestralidades europeias, envolvendo um número total de 3.417 indivíduos. Um total de oito *loci* significativos foram detectados ( $p < 10^{-7}$ ), com diversos genes expressos na orelha interna, como *DCLK1*, *PTPRD*, *GRM8* e *CMIP*. Diversos candidatos biológicos adicionais indicados por um SNP com associação sugestiva ( $p < 10^{-6}$ ) foram identificados. Além disso, foram identificados diversos *loci* em regiões sem genes, genes de função desconhecida e genes sem uma função estabelecida na orelha interna. Foram disponibilizados dados para construir rotas altamente significativas *in silico* para fisiologia auditiva, relacionando 49 genes, sendo 34 desses expressos na orelha interna. Esses resultados geram conclusões acerca das bases moleculares da fisiologia auditiva e podem sugerir novos alvos para prevenção e tratamento da perda auditiva.

No ano seguinte (2012), o mesmo grupo (118) complementou o estudo acerca da presbiacusia (122). O estudo anterior focou somente na audição através da avaliação auditiva por meio da medida dos limiares tonais. Alguns *loci* foram identificados com base no fenótipo do ouvido com melhor limiar auditivo. Foi identificado somente o gene *GRM7*. Avaliou-se a associação de variantes do *GRM7* em uma população americana com origem europeia de Rochester, NY (n=687), sendo utilizados novos fenótipos para presbiacusia. Análises multivariadas foram utilizadas para explorar a relação entre o haplótipo *GRM7* e os polimorfismos através de diversas medidas de percepção auditiva.

Foi demonstrado que os alelos do *GRM7* estão associados de forma primária a medidas periféricas de perda auditiva, especialmente discriminação auditiva em adultos.

Os GWAS relacionados à orelha interna estão cada vez maiores nos últimos anos. De forma complementar ao estudo publicado pelo *International Consortium G-EAR* (121), foram analisados os polimorfismos desse GWAS para identificar uma associação genuína com a função auditiva através de técnicas alternativas (123). Em primeiro lugar, foi gerada uma lista dos 19 genes publicados nos GWAS prévios. Posteriormente, foi realizada imunohistoquímica para avaliar a expressão desses 19 genes na orelha interna dos camundongos. Um total de 12 desses genes demonstraram padrões de expressão coclear distintas. Um total de quatro genes demonstraram uma expressão restrita às células ciliadas sensoriais (*Csmd1*, *Arsg*, *Slc16a6* e *Gabrg3*), um gene na célula da estria vascular (*Dclk1*) e os genes restantes em diversos tipos celulares da cóclea (*Ptprd*, *Grm8*, *GlyBP*, *Evi5*, *Rimbp2*, *Ank2*, *Cdh13*). Finalmente, foram testados os 12 genes para a replicação da associação numa amostra independente de caucasianos e asiáticos. Nove desses genes demonstraram uma associação significativa, sendo quatro desses replicados no mesmo polimorfismo com mesma direção de efeito e cinco genes demonstraram uma associação significativa na testagem direta. A fim de analisar o relacionamento genótipo-fenótipo, foram avaliados os perfis audiométricos para os três genótipos das variantes gênicas mais fortemente associados. Um total de sete desses nove genes replicados (*CDH13*, *GRM8*, *ANK2*, *SLC16A2*, *ARSG*, *RIMBP2* e *DCLK1*) demonstraram um padrão audiométrico com diferenças entre os genótipos. Isso aumenta a sustentação do seu papel na função auditiva. Além disso, esses dados

demonstram a utilidade da técnica passo a passo em gerar conhecimento acerca das bases moleculares da audição e pode sugerir novos alvos para o tratamento e a prevenção da surdez.

## **2.5 Perda Auditiva Induzida por Ruído**

A PAIR é uma diminuição progressiva da acuidade auditiva em função da exposição continuada a elevados níveis de pressão sonora (124). Enquanto, no trauma acústico, a perda auditiva é causada por um som abrupto de grande intensidade, na PAIR, a exposição é prolongada e de menor intensidade. A PAIR frequentemente está relacionada à atividade ocupacional, mas também pode ocorrer em atividades recreativas (discotecas, shows de música). A PAIR representa a doença profissional irreversível mais prevalente em todo mundo (125).

Existe suspeita de que a associação entre perda auditiva e ruído tenha iniciado há pelo menos 2 mil anos. Bernardino Ramazzini (1633-1714) descreveu a surdez dos bronzistas, os quais apresentavam comprometimento auditivo proporcional à exposição ocupacional ao ruído. Posteriormente, Habermann e Witmark (1906-1907) identificaram o impacto do ruído diretamente no órgão de Corti (126).

### **2.5.1 Fisiopatologia da PAIR**

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

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

Na PTS, as alterações são irreversíveis e incluem perda de células ciliadas externas, degeneração das fibras nervosas cocleares e formação de tecido cicatricial (zonas mortas) no órgão de Corti. Hirose & Liberman (127) demonstraram que pode ocorrer degeneração neural irreversível induzida pelo ruído mesmo na ausência de alterações nos limiares auditivos e com preservação de células ciliadas externas.

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

Existem alguns fatores que podem predispor à ocorrência de PAIR. Ainda não há resultados conclusivos acerca da predisposição genética a PAIR, mas em modelos animais essa associação já foi demonstrada (128).

Já no caso do trauma acústico, o ruído pode gerar dano físico imediato à orelha interna, proporcional à intensidade sonora. Impulsos sonoros de alta intensidade podem comprometer fisicamente a membrana timpânica, a cadeia

ossicular, as membranas da orelha interna e o órgão de Corti. A ruptura da membrana timpânica pode absorver parte da energia que seria transferida completamente para a orelha interna.

### **2.5.2 Quadro Clínico**

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

A perda auditiva é do tipo neurosensorial (por lesão no órgão de Corti), de evolução lenta e caráter progressivo. A hipoacusia costuma ser bilateral e simétrica, sendo dificilmente de caráter profundo. Os escores de discriminação auditiva estão dentro dos níveis normais ou pouco alterados. Assim como na perda auditiva, o zumbido tem intensidade variável, frequentemente é bilateral e pode estar presente em pelo menos metade dos pacientes com PAIR (129).

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

Além do comprometimento do sistema auditivo, podem ocorrer repercussões extra-auditivas, como: comportamentais (isolamento social, irritabilidade, dificuldade de concentração), neurológicas (sono, tremores, cefaleia e náusea), digestivas (dor abdominal e gastrites) e alterações

vestibulares. O exame clínico pode demonstrar alterações cardiovasculares (aumento da pressão arterial e taquicardia) e metabólicas (aumento do cortisol, glicemia e adrenalina) (130).

### **2.5.3 Investigação Diagnóstica**

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

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

Na anamnese ocupacional, deve-se questionar sobre todas as atividades profissionais realizadas, tipos de máquinas usadas, exposição a produtos químicos, histórico de acidentes e utilização de proteção auditiva individual (130).

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



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

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

De forma isolada, a PAIR, dificilmente produz uma perda auditiva superior a 75 dB nas altas frequências e 40 dB nas baixas frequências. Entretanto, quando combinada a outros tipos de perda auditiva (presbiacusia), pode ocorrer um agravamento desses limiares. A velocidade de perda auditiva em função da

PAIR é maior nos primeiros 10-15 anos de exposição, reduzindo essa velocidade à medida em que há um agravamento da perda auditiva.

#### **2.5.4 Diagnóstico Diferencial da PAIR**

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

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

#### **2.5.5 Tratamento**

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

No ambiente do trabalho, é importante a formação de uma equipe com diversos profissionais (médicos, fonoaudiólogas, técnicos de segurança) para detecção dos níveis de ruído nos diferentes ambientes e promover um programa de educação e monitoramento para proteção auditiva.

A fim de evitar a instalação da doença, programas de prevenção são fundamentais. Por isso, órgãos governamentais instituíram o Programa de Conservação Auditiva (PCA) (124). Esse programa envolve o reconhecimento e a avaliação dos riscos para a audição, gerenciamento audiométrico, medidas de proteção coletiva, medidas de proteção individual (EPI), educação e motivação, gerenciamento de dados e avaliação do programa.

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

## **2.6 A Genética da Perda Auditiva Induzida por Ruído**

### **2.6.1 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 trabalharam por muitos anos na mesma atividade são os indivíduos ideais para esses 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 a 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 susceptibilidade 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.

Os GWAS têm sido utilizados de forma bem-sucedida nos últimos 5 anos para identificar múltiplos genes que interagem e contribuem para o fenótipo da doença. Até hoje, ainda não existem GWAS verdadeiros que avaliam a susceptibilidade ao ruído em humanos. Isso ocorre em função das limitações em identificar um número suficiente de indivíduos susceptíveis e controles com resistência ao ruído submetidos a um mesmo ambiente. Em estudos de associação do genoma inteiro de larga escala, o DNA de milhares de indivíduos diagnosticados com uma doença específica e o DNA de indivíduos não afetados (controles) são rastreados e pareados, utilizando chips de DNA que contém entre 3.000 e 5.000 dos polimorfismos mais informativos no genoma humano. Isso possibilita ao pesquisador identificar polimorfismos associados a doenças específicas. Essas novas ferramentas facilitam a identificação de genes para doenças complexas, já que pequenas alterações em diversos genes podem contribuir para o fenótipo final (25).

A confiabilidade desses achados pode ser verificada através da replicação dessa descoberta em uma segunda população, não relacionada (31). 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](http://www.hapmap.org)) e a disponibilidade de métodos de genotipagem massiva (como os chips de DNA) tornam os GWAS mais factíveis.

Nos últimos 10 anos, tem sido observado um grande aumento no número de GWAS com o objetivo de identificar genes relacionados a susceptibilidade à PAIR. Centenas de polimorfismos foram rastreados em genes envolvidos em diferentes mecanismo e estruturas da orelha interna. Nesse sentido, foram classificados em genes de estresse oxidativo, rotas de reentrada de potássio, genes monogênicos de surdez e genes das proteínas *heat shock*.

Até hoje, os resultados mais promissores na PAIR foram obtidos com os genes *KCNE1* e *KCNQ4* na reentrada de potássio na orelha interna (131)(132); *CAT*, *PCDH15* e *MYH14* (133) e *Hsp70* (134)(133). Esses genes foram replicados em diferentes populações e apresentaram tamanho de amostra suficiente para um poder de detecção de um alelo causal.

#### **2.6.1.1 Genes de Estresse Oxidativo**

A cóclea é um órgão metabolicamente ativo. O estresse oxidativo apresenta um papel central na patomecânica 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 glutathione, incluindo a glutathione S-transferase (*GST*), glutathione peroxidase

(*GPXI*) e a glutathiona redutase (*GSR*). As classes *GST* compreendem os genes *GSTMI* e *GSTTI*, que demonstram uma grande variabilidade genética em humanos. Até 50% da população caucasiana não apresenta o genótipo para o gene *GSTTI* (135).

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.

Rabinowitz et al. (135) analisaram os polimorfismos de deleção *GSTMI* e *GSTTI* em 58 trabalhadores na indústria. Descobriram que os portadores do gene *GSTMI* eram menos susceptíveis à PAIR. Essa associação foi considerada espúria, já que esse estudo não apresentava poder suficiente em função do pequeno tamanho de amostra. Um outro estudo com pequeno tamanho de amostra (94 trabalhadores homens expostos ao ruído) analisou os polimorfismos nos genes *PON1*, *PON2* e *SOD2*. Os genes *PON2* e *SOD2* apresentaram uma associação estatisticamente significativa com a PAIR. Entretanto, esses resultados devem ser interpretados com cautela, pois não apresentam poder suficiente para detectar essa associação com o gene causal (136).

Em um estudo mais abrangente realizado em 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 (*GSTMI*, *GSSTI*, *CAT*, *SOD*, *GPX*, *GSR* e *GSTPI*) foram associados à

PAIR (137). 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 (137).

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 e 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 (138).

Estudos mais recentes suportam o papel dos polimorfismos dos genes do estresse oxidativo no desenvolvimento da PAIR. Demonstrou-se que o polimorfismo do gene *SOD2* na sequência mitocondrial alvo estava associado com a PAIR em trabalhadores chineses. Além disso, esse efeito foi intensificado em níveis maiores de exposição ao ruído (139). Um estudo duplo-cego com 53 trabalhadores tratados com n-acetilcisteína apoia a hipótese de que indivíduos portadores dos genótipos nulos nos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* são mais susceptíveis à PAIR (140). Por outro lado, a ototoxicidade por aminoglicosídeos, que parece ter o mesmo mecanismo de estresse oxidativo, mostrou ser independente dos polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* (141).



### 2.6.1.2 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* (142).

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 (143)(144). 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 (145)(146). 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 (137). 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 (147).

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 ovarinas 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 (131).

Uma análise semelhante, porém com maior número de polimorfismos (99), foi realizada numa população polonesa (132). 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.

### **2.6.1.3 Formas Monogênicas de Surdez**

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*) (133). 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 (148). Foi demonstrado que a mutação da *CDH23* quebra a organização dos esterocílios, gerando perda auditiva e disfunção vestibular in camundongos *waltzer*. A variante 753<sup>a</sup> desse gene foi correlacionada com a susceptibilidade à PAIR (149). Em humanos, as mutações dos genes *PCDH15* e *CDH23* estão associadas tanto com a perda auditiva síndrômica como não síndrômica.

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).

#### **2.6.1.4 Genes *Hsp70***

As *heat-shock proteins* (HSPs) formam um grupo de proteínas que atuam na síntese, construção e transporte celular de diversas outras proteínas. As HSPs são expressas no corpo celular em condições fisiológicas e patológicas. A expressão aumenta durante condições de estresse, como exposição ao ruído (150). Quando induzidas por exposição a níveis sonoros moderados, podem proteger o ouvido da exposição excessiva ao ruído (151)(152). 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*.

As variações dos genes *HSP70-1*, *HSP70-2* e *HSP70-hom* demonstraram ser associadas à PAIR, e esses resultados foram replicados em três populações independentes (chinesa, sueca e polonesa)(134). Em uma população chinesa de 194 trabalhadores, não houve diferença estatisticamente significativa no genótipo e na distribuição de alelos entre os 93 indivíduos que desenvolveram perda auditiva comparados aos 101 indivíduos sem perda auditiva. Entretanto, mesmo que o polimorfismo não fosse suficientemente informativo em uma doença complexa, a análise do haplótipo foi realizada. Foi demonstrado que dois haplótipos (GGC e GGT) dentre seis foram significativamente mais frequentes no grupo com PAIR em comparação aos controles. Utilizando uma metodologia semelhante e uma análise dos dados para os mesmos polimorfismos dos genes, o

estudo foi repetido nos grupos com 206 trabalhadores suecos e 238 poloneses. Um polimorfismo no *HSP70-hom* resultou numa associação significativa com a PAIR em ambas as amostras. O restante dos polimorfismos em *HSP70-1* e *HSP70-2* foram somente significativos na amostra sueca.

A análise dos haplótipos compostos por três polimorfismos revelaram associações significativas entre a PAIR e o haplótipo GAC em ambas as amostras, e com o haplótipo CGT na amostra sueca. Embora a comparação dos haplótipos nas populações asiáticas e europeias tenham revelado haplótipos significativamente associados à PAIR, na população chinesa, isso foi infrequente e ausente na população polonesa e sueca. Isso não exclui a possibilidade de uma associação verdadeira do polimorfismo do gene *HSP70* com a susceptibilidade ao ruído, o que pode ser explicado pelas diferenças étnicas entre as amostras. Esse estudo replicou a associação dos genes do *HSP70* com a PAIR numa terceira e quarta amostras expostas ao ruído, demonstrando evidência de que os genes do *HSP70* estão associados com a susceptibilidade à PAIR.

### **2.6.2 Descoberta dos Genes da PAIR em Camundongos**

Os camundongos geraram a primeira evidência da influência genética da PAIR. Isso ocorreu em função da recente identificação de genes que aumentam a susceptibilidade ao trauma sonoro (153). 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 (154)(155)(156). Além disso, diversos camundongos

*knockout*, como *SOD1*<sup>-/-</sup> (157), *GPXI*<sup>-/-</sup> (158), *PMCA2*<sup>-/-</sup> (159) e *CDH23*<sup>+/-</sup> (160), 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 (156). 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 (161). 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 (162).

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 (163)(164). Uma mutação *missense* da mutação *Cdh23A2210T* 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 (119).

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 (165). 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 (166)(167)(168). 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 (155)(156)(149).



Em estudo publicado em 2009 (169) 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 utilizada 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 (155)(170). Esse *locus* foi originalmente conhecido por *Ahl*, e posteriormente renomeado como *Ah11*, sendo o primeiro *locus* relacionado à perda auditiva pela idade. Testes de complementação genética mostraram que o *Ahl* e o *Nih1* são alélicos, ou seja, estão localizados na mesma posição do cromossomo e são indistinguíveis entre si (171). 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* (172)(149). 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* (173)(174). A expressão fenotípica do mutante recessivo com surdez (*dfw*) inativa a *PMCA2* (175). 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 *Ahl* (176). 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 (177). 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 (177).

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 (178). 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 (179)(157). 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 (180).

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 (181)(157). 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 (182)(183)(184). Em comparação ao *SOD1*, o SOD mitocondrial (*Mn-SOD, SOD2*) pode exercer um papel importante. Os camundongos *knockout Sod2*<sup>-/-</sup> morrem dentro das primeiras 2 semanas de vida, enquanto os camundongos *Sod2*<sup>+/-</sup> parecem não apresentar patologia (185) e possuem audição normal na idade jovem (186). A sobreexpressão de *SOD2* não protege a audição e as células ciliadas de forma efetiva pela ototoxicidade por aminoglicosídeos (182). 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 *GPXI* apresentam elevados limiares auditivos e são mais susceptíveis ao ruído (158)(187). As glutathione peroxidases (codificadas pela *GPXI-6*) utilizam a glutathione 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 glutathione dissulfato (*GSSG*). A *GSSG* pode ser reduzida para gerar o *GSH* através da glutathione redutase (codificada pela *GSR*). A biossíntese da glutathione necessita de duas enzimas (glutamylcisteína ligase e glutathione sintetase) dependentes de ATP (trifosfato de adenosina). Além disso, a *GSH* pode formar conjugados através da ação da glutathione S-transferase (*GST*) ou reagir com componentes eletrofílicos de forma não enzimática. De fato, a conjugação da glutathione apresenta um aspecto essencial tanto para o metabolismo normal como para o xenobiótico. A formação da proteína-S-SG dissulfídica, conjugação da glutathione e da excreção da *GSSG*, pode reduzir a disponibilidade de *GSH* e aumentar a demanda para restabelecer a capacidade antioxidante (188). Um baixo nível de glutathione 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 (189). 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 (151)(190). Os camundongos com ausência do HSF1 (*Hsf1 knockouts*) são frequentemente mais sensíveis a estressores, especialmente no sistema auditivo. O camundongo *Hsf1*<sup>-/-</sup> é viável (191) e apresenta limiares auditivos normais (190)(192). Entretanto a resposta do tipo selvagem a um ruído leve produz somente uma perda auditiva temporária, o camundongo *Hsf1*<sup>-/-</sup> apresenta uma maior perda auditiva e de células ciliadas externas (192). Durante o estresse térmico, seja por choque térmico do corpo inteiro (151) ou por hipertermia localizada (190), 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 (128). 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.

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 (193). 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.

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 (194). 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 (195). 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.

## 2.7 A Família NOX

A família nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase não fagocítica (NOX NADPH) é composta por proteínas que transferem elétrons através de membranas biológicas. De uma forma geral, o elétron que recebe é o oxigênio e o produto da reação de transferência de elétrons é o superóxido. A função biológica das enzimas NOX é, portanto, a geração de espécies reativas de oxigênio.

Todos os membros da família NOX são proteínas transmembrana que transportam elétrons através de membranas biológicas para reduzir oxigênio a superóxido. De acordo com essa função, existem propriedades estruturais conservadas das enzimas NOX que são comuns entre todos os membros da família. Através do terminal COOH, esses traços estruturais incluem: um local de ligação para a NADPH na extremidade do COOH, região de ligação com o dinucleótido de flavina-adenina (FAD) na proximidade do domínio transmembrana da extremidade COOH (carboxilo protonado), seis domínios transmembrana e quatro histidinas *heme-binding*, duas histidinas no terceiro e duas histidinas no quinto domínio transmembrana. Em função do domínio transmembrana adicional NH<sub>2</sub>, as histidinas estão no quarto e sexto domínio transmembrana de proteínas DUOX (dual oxidases). Alguns traços adicionais são limitados a alguns membros da família, como um domínio transmembrana NH<sub>2</sub>-terminal e o domínio homólogo à peroxidase.

### 2.7.1 Espécies Reativas de Oxigênio na Família NOX

As espécies reativas de oxigênio são pequenas moléculas derivadas do oxigênio, incluindo radicais do oxigênio (superóxido, hidroxil, peroxil e alcoxil) e alguns não radicais que podem ser agentes oxidantes e/ou facilmente convertidos em radicais, como ácido hipocloroso, ozônio e peróxido de hidrogênio. Os oxidantes que contêm nitrogênio, como óxido nítrico, são conhecidos por espécies reativas de nitrogênio. A geração de espécies reativas de oxigênio ocorre através de uma cascata de reações que inicia com a produção do superóxido. O superóxido rapidamente altera o peróxido de hidrogênio de forma espontânea, especialmente num pH baixo ou é catalisado pelo superóxido dismutase. Outros elementos da cascata da geração de espécies reativas de oxigênio incluem a reação do superóxido com o óxido nítrico para formar o peróxido nitrito, a formação catalisada pela peroxidase para formar ácido hipocloroso a partir do peróxido de hidrogênio e a reação catalisada por ferro com a geração do radical hidroxil (196).

As espécies reativas de oxigênio interagem com um grande número de moléculas, especialmente pequenas moléculas inorgânicas, como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos. Através dessas interações, as espécies reativas de oxigênio podem destruir de forma irreversível ou somente alterar a função da molécula alvo. Conseqüentemente, as espécies reativas de oxigênio têm sido cada vez mais identificadas como principais responsáveis pelo dano aos organismos biológicos. Em 1956, Harman analisou o importante papel das espécies reativas de oxigênio no envelhecimento (197) e gerou o conceito de que as espécies reativas de oxigênio são agentes do dano celular, sendo então amplamente aceitas nas teorias sobre envelhecimento (198). Recentemente, pelo

menos uma função benéfica da produção de espécies reativas de oxigênio foi publicada, sendo conhecida pela importância na defesa do hospedeiro. Essa questão se tornou bem clara através da relação estabelecida entre a deficiência na geração de espécies reativas de oxigênio e a redução da capacidade de atacar nos leucócitos. Entretanto, nas últimas décadas, um segundo importante conceito sobre as espécies reativas de oxigênio foi estabelecido. De fato, as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas não somente no dano celular e na morte de patógenos, mas também em diversos processos regulatórios reversíveis em virtualmente todas as células e tecidos.

### **2.7.2 NOX3**

A NOX3 foi descrita em 2000 com base na similaridade da sua sequência em relação a outras isoformas da família NOX (199). Os primeiros estudos sobre a função dessa proteína foram publicados somente em 2004 (200). A NOX3 compartilha uma semelhança de 56% dos aminoácidos com a NOX2. O gene humano para a NOX3 está localizado no cromossomo 6. Por alinhamento da sequência e análise de *hydropathy plot*, acredita-se que a estrutura global da NOX3 é altamente similar à estrutura da NOX1 e da NOX2, especialmente em relação aos domínios transmembrana, ao comprimento das alças extracelulares, aos sítios de ligação NADPH e FAD e à localização das histidinas (201)(199). Até hoje, não foram publicadas variantes de ligação para a NOX3.

Atualmente, ainda não existem publicações sobre a região promotora da NOX3. Entretanto, em função da restrita distribuição tecidual, parece ser provável que a expressão é controlada por um conjunto distinto de fatores regulatórios. De forma semelhante, não se conhece a localização subcelular da

NOX3. Entretanto, já se conhece a dependência da NOX3 em relação às suas subunidades:

- 1) P22PHOX: a NOX3 é dependente da enzima p22phox. A proteína p22phox estabiliza a expressão da NOX3 (202) e gera a translocação da p22phox para a membrana plasmática (203). Em estudos funcionais, a p22phox é necessária para a ativação da NOX3 (204)(202), e o corte da p22phox inibe a geração de espécies reativas de oxigênio pela NOX3 (204). Ainda existem algumas dúvidas sobre a relevância *in vivo* da p22phox na função da NOX3, já que os pacientes com deficiência de p22phox não apresentam disfunção vestibular.
- 2) Ausência de subunidades citosólicas: na ausência de subunidades citosólicas, a NOX3 é heterogeneamente expressa e inativa (201), pouco ativa (200)(203) ou substancialmente ativa (202).
- 3) NOXO1: foi observado um aumento da atividade de NOX3 na presença de NOXO1 em todos os estudos (200)(201)(202)(203). O argumento mais forte para o papel crucial da NOXO1 na ativação de NOX3 advém de estudos *in vivo*, os quais demonstram que a inativação de NOXO1 mimetiza o fenótipo do camundongo deficiente para NOX3 (205). Assim, parece ser inquestionável o fato de que a NOXO1 é uma parceira essencial da NOX3 *in vivo*.
- 4) NOXA1: os resultados sobre a necessidade de NOXA1 são contraditórios. Enquanto alguns estudos encontraram um aumento da atividade da NOX3 através da NOXA1 (200)(203), outros não encontraram o mesmo resultado (201)(202). Então, os resultados dos estudos de expressão dependem de

condições experimentais. Por isso, será importante dados *in vivo* de animais deficientes em NOXA1 para um maior esclarecimento.

- 5) P47PHOX e P67PHOX: Em estudos de expressão, P47PHOX e P67PHOX são capazes de ativar NOX3 (200)(201)(202)(203). Entretanto, a relevância fisiológica desses achados é questionável, pelo menos em relação à P47PHOX. A perda da função da NOXO1 em camundongos é suficiente para mimetizar a deleção do fenótipo NOX3 e não foram demonstrados sintomas vestibulares em camundongos e pacientes deficientes para P47PHOX.
- 6) RAC: A dependência da NOX3 sobre a RAC é ainda uma questão em debate. Dois estudos sugerem independência da RAC (201)(202), enquanto um terceiro estudo sugere um certo efeito (203). As diferenças desses achados podem ser devido a um menor rigor para a RAC ativar NOX3, ou a presença de uma RAC endógena em células que seriam independentes de RAC.

Existe dúvida se a ativação do sistema NOX3 é dependente ou constitucionalmente ativa. A evidência bioquímica atual indica a favor de uma ativação constitucional. A NOXO1, a subunidade-chave para a ativação de NOX3, ativa NOX3 de forma intrínseca em sistemas reconstituídos. Entretanto, existe dúvida, do ponto de vista fisiológico, sobre o motivo pelo qual seria necessário um sistema ativo de geração de espécies reativas de oxigênio na orelha interna.

Em humanos, NOX1, NOX3 e NOX4 apresentam, de forma específica, um polimorfismo não sinônimo codificado. O polimorfismo *Lys171Thr* no NOX3 tem sido validado através de dados de frequência e genótipo. Ocorre

com maior frequência na população do leste da Ásia (40%) do que em indivíduos descendentes de europeus e africanos (3%).

### **2.7.3 O *Nox3* e a Orelha Interna**

O camundongo com o gene *Nox3* codifica a NADPH oxidase, que é primariamente expressa na orelha interna e é necessária para o desenvolvimento e a função apropriada do sistema vestibular (200)(201)(206). De forma específica, se acredita que as seis proteínas de ligação transmembrana NADPH codificadas pelo gene *Nox3* interagem com as duas proteínas transmembranas codificados pela *Cyba* e pela proteína citosólica codificada pela NOXO1. Isso ocorre para formar, parcial ou completamente, um complexo funcional de NADPH oxidase que é capaz de transportar elétrons através de membranas biológicas. Dessa forma, o oxigênio forma o superóxido e gera uma cascata subsequente de espécies reativas de oxigênio.

A geração de espécies reativas de oxigênio pelas células da orelha interna tem sido demonstrada em resposta a agentes ototóxicos e ao ruído (207)(208)(209). Estudos com o RNA mensageiro do gene *Nox3* demonstraram uma alta expressão na orelha interna (200)(206), tanto no sistema vestibular como no sistema coclear.

Diferentes aspectos geraram a definição do gene *Nox3* como a NADPH oxidase da orelha interna. Foi caracterizado o camundongo mutante de “cabeça inclinada” através de genética reversa, sendo reveladas mutações subjacentes no gene *Nox3* (206). Em função da constatação de que o camundongo de cabeça

inclinada realmente apresenta déficit vestibular, foi estabelecido o papel funcional do gene *Nox3* na orelha interna.

Baseado em um clone derivado da orelha interna, um estudo realizou uma análise detalhada da distribuição do gene *Nox3* através de PCR em tempo real e hibridização *in situ*. Encontraram uma alta expressão do gene *Nox3* na orelha interna, especialmente no epitélio sensorial coclear e vestibular e no gânglio espiral (210). Baixos níveis de *Nox3* podem ser também detectados em outros tecidos, como no baço fetal (199), rim fetal (200), osso do crânio e cérebro (200).

A expressão do *Nox3* não é observada em camadas não sensoriais, como na estria vascular. Existe a possibilidade de que as células que expressam o *Nox3* apresentem uma mesma origem embriológica, já que o epitélio sensorial coclear e vestibular se desenvolvem a partir de um espessamento ectodérmico comum (200). A localização celular precisa do *Nox3* (células sensoriais ou de suporte) e subcelular (vesículas ou membrana plasmática) é ainda desconhecido.

O papel do *Nox3* no sistema coclear é ainda desconhecido. O “camundongo de cabeça inclinada” parece apresentar audição normal (206). Entretanto, como esses estudos foram realizados nos camundongo C57BL/6J, os quais são caracterizados por uma perda auditiva severa e precoce (211)(212), mais estudos sobre esse tópico devem ser realizados.

Existe forte evidência de que as espécies reativas de oxigênio participam da fisiopatologia da perda auditiva associada a envelhecimento, ruído e drogas. Dessa forma, a enzima NOX3, geradora de espécies reativas de oxigênio, deve

estar envolvida na perda auditiva. Até hoje, poucos dados experimentais estão disponíveis sobre esse tema.

Existem dois pontos que sugerem o papel do gene *Nox3* na perda auditiva. Em primeiro lugar, a localização do *Nox3* na orelha interna (200), que corresponde aos sítios anatômicos de dano oxidativo na perda auditiva, como descrito anteriormente (213)(214). Em segundo lugar, as drogas ototóxicas, como a cisplatina, ativam o *Nox3 in vitro* (200).

Em função da natureza reativa, as espécies reativas de oxigênio interagem com uma variedade de pequenas moléculas inorgânicas e macromoléculas biológicas. Isso pode causar dano oxidativo irreversível nesses alvos específicos e em outras células e tecidos (215). De fato, as espécies reativas de oxigênio têm sido amplamente associadas à perda auditiva induzida por envelhecimento, ruído e drogas (216)(217)(218). Além disso, a descoberta do gene *Nox3* na orelha interna tem levantado a possibilidade de que a NADPH oxidase dependente de *Nox3* seja uma das principais fontes de espécies reativas de oxigênio potencialmente danosas.

Um estudo recente (219) sugere que isso pode de fato ocorrer. Nesse estudo, os autores conseguiram inibir a perda auditiva induzida pela cisplatina em chinchilas através da administração transtimpânica de siRNA diretamente contra o *Nox3*. Em outros estudos, a perda completa de função do *locus* do *Nox3* pode gerar proteção contra a perda auditiva em algumas linhagens susceptíveis. Ainda é necessário um maior entendimento sobre a função dos componentes da NADPH oxidase e de seus alelos mutantes na orelha interna. Também há necessidade de um maior entendimento sobre o papel construtor na estrutura e



na função do sistema vestibular e sobre o papel deletério na perda auditiva relacionada a envelhecimento, ruído e drogas.

### **2.7.3.1 O *Nox3* e o Sistema Vestibular**

O *Nox3* tem um papel fundamental na formação das otocônias. As otocônias são pequenos cristais encontrados no aparelho vestibular, as quais contribuem para a detecção da aceleração linear e da gravidade. As otocônias são compostas de uma combinação de material orgânico, especialmente a proteína *otocin 90* (OC90) e o sal inorgânico carbonato de cálcio. A importância do *Nox3* para a formação das otocônias está claramente demonstrado em camundongos mutantes com perda de função do *Nox3*.

Esses camundongos são incapazes de formar otocônia e, portanto, sofrem de um distúrbio de equilíbrio conhecido por fenótipo de “cabeça inclinada” (206). Existe uma linhagem de camundongo com perda de função por mutação na subunidade NOXO1 do *Nox3*, o qual apresenta um fenótipo muito semelhante (205). O papel do *Nox3* na formação da otocônia não foi ainda completamente entendido, já que falta o conhecimento de como ocorre efetivamente a formação da otocônia. O modelo predominante sugere os seguintes elementos: vesículas enriquecidas por cálcio são liberadas das células de suporte do epitélio sensorial em uma camada gelatinosa dentro da endolinfa. O epitélio não sensorial secreta o componente orgânico OC90 (220). Dentro da endolinfa, o OC90 é submetido a mudança na forma e interage com vesículas de cálcio. Finalmente, as vesículas acumulam uma endolinfa enriquecida por carbonato e bicarbonato e a cristalização ocorre gerando a formação da otocônia.

De forma específica, se acredita que as seis proteínas de ligação transmembrana com a NADPH (codificadas pelo *Nox3*) interajam com as duas proteínas transmembrana (codificadas pela *Cyba*) e com a proteína citosólica (codificada pela NOXO1) para formar em parte, ou completamente, um complexo funcional de NADPH oxidase que é capaz de transportar elétrons através de membranas biológicas. Isso permite que o oxigênio forme superóxido e gere uma subsequente cascata de espécies reativas de oxigênio.

A mutação em qualquer um desses componentes tem um efeito profundo na capacidade do camundongo de detectar a aceleração e a gravidade. Esses déficits são demonstrados através de anormalidades no comportamento (205)(206). Um comportamento aberrante pode incluir postura oblíqua da cabeça e, em graus variados, hiperatividade e movimentos circulares. As anormalidades no comportamento são mais aparentes quando esses camundongos são desafiados. Essas anormalidades incluem deficiência de reflexos no contato com o ar e com o solo, performance fraca no teste do bastão rotatório, anormalidade nos testes de equilíbrio estático na barra e inabilidade em nadar.

Tem sido desenvolvido um método não invasivo para detectar os potenciais evocados vestibulares (VsEPs) em camundongos (221)(222). Através desse teste, foi demonstrado que a perda da função nos mutantes *NOX3*, *Cyba* e *NOXO1* gera a completa ausência dos VsEPs (222). Assim, parece claro que a produção de espécies reativas de oxigênio participa de forma construtiva para o desenvolvimento e a função do sistema vestibular.

O papel do *Nox3* na biossíntese da otocônia não está claro. Existem algumas hipóteses, como: 1) a expressão do *NOX3* dentro do epitélio sensorial poderia

influenciar no enchimento das vesículas de cálcio (205); 2) as espécies reativas de oxigênio derivadas do *Nox3* poderiam induzir uma mudança na conformação da proteína OC90; 3) as espécies reativas de oxigênio derivado do *Nox3*, em combinação com a lactoperoxidase, poderiam induzir a peroxidação lipídica, alterando as propriedades da membrana das vesículas contendo cálcio e, conseqüentemente, permitindo uma interação com a OC90.

### **2.7.3.2 O *Nox3* e o Dano Auditivo**

A cisplatina é um agente quimioterápico amplamente utilizado que pode causar perda auditiva significativa. Estudos prévios têm demonstrado que a exposição à cisplatina está associada a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio na cóclea.

O *knockdown* do *Nox3*, através do pré-tratamento com *siRNA*, preveniu a ototoxicidade pela cisplatina, como demonstrado pela preservação dos limiares auditivos e das células sensoriais da orelha interna. O *Nox3 siRNA* transtimpânico reduziu a expressão de *Nox3* e biomarcadores de dano coclear, especialmente o canal receptor de potencial transiente vaniloide do tipo 1 (*TRPV1*) e a molécula de lesão renal-1 (*KIM-1*) nos tecidos cocleares. Além disso, o *siRNA* contra o *Nox3* reduziu a apoptose, como demonstrado pela coloração TUNEL, preveniu o aumento da expressão da proteína associada a bcl-2 (BAX)/do gene *BAX* e anulou a redução da expressão da proteína linfoma de células B 2/do gene *BCL2* seguida da administração de cisplatina.

A administração transtimpânica de *siRNA*, diretamente contra o *Nox3*, pode ser um método útil na atenuação da ototoxicidade à cisplatina. O *Nox3* parece participar da mediação na produção e no dano causado pela

administração da cisplatina sobre a cóclea. O *knockdown* desse gene pela administração de *siRNA* na orelha média protege a cóclea contra dano celular, morte celular e perda auditiva que pode ser causada pelas espécies reativas de oxigênio geradas em função da *upregulation* de *Nox3*.

Essa estratégia pode abrir caminhos para novos tratamentos e prevenir a perda auditiva causada pela cisplatina. Outros danos na orelha interna causados por ruído, antibióticos aminoglicosídeos, envelhecimento e toxinas ambientais podem danificar a cóclea através da ativação de *Nox3*. Todos esses insultos têm sido envolvidos no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio.

O único estudo que explorou o efeito da PAIR na família NOX (incluindo o gene *Nox3*) foi realizado em ratos (223). Esse estudo não indicou se o gene *Nox3* aumentou ou reduziu a susceptibilidade ao ruído. Esse estudo somente avaliou os níveis de expressão do *Nox3* após a exposição ao ruído. Alguns membros da família NADPH oxidase (*NOX1* E *DUOX2*) sofreram uma *upregulation* na cóclea dos ratos após a exposição ao ruído. Isso sugere que essas isoformas poderiam estar relacionadas ao dano coclear. Por outro lado, a isoforma *Nox3* sofreu uma *downregulation* após a exposição a um ruído de 100 dB e 110 dB (7 e 5 vezes, respectivamente). Isso poderia representar um mecanismo protetor endógeno contra o estresse oxidativo.

## **2.8 Referências Bibliográficas da Base Teórica**

1. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010 Oct 28;467(7319):1061–73.

2. Griffith OL, Montgomery SB, Bernier B, Chu B, Kasaian K, Aerts S, et al. ORegAnno: an open-access community-driven resource for regulatory annotation. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan;36(Database issue):D107–13.
3. International HapMap 3 Consortium, Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Altshuler DM, Gibbs RA, et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature.* 2010 Sep 2;467(7311):52–8.
4. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science.* 1989 Sep 8;245(4922):1073–80.
5. MacDonald ME, Novelletto A, Lin C, Tagle D, Barnes G, Bates G, et al. The Huntington's disease candidate region exhibits many different haplotypes. *Nat Genet.* 1992 May;1(2):99–103.
6. Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet.* 2005 Feb;6(2):95–108.
7. Jimenez-Sanchez G, Childs B, Valle D. Human disease genes. *Nature.* 2001 Feb 15;409(6822):853–5.
8. Pritchard JK. Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases? *Am J Hum Genet.* 2001 Jul;69(1):124–37.
9. Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, et al. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature.* 2001 May 10;411(6834):199–204.
10. Reich DE, Lander ES. On the allelic spectrum of human disease. *Trends Genet TIG.* 2001 Sep;17(9):502–10.

11. Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association *loci* for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 9;106(23):9362–7.
12. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005 Oct 27;437(7063):1299–320.
13. Ritchie MD, Denny JC, Crawford DC, Ramirez AH, Weiner JB, Pulley JM, et al. Robust replication of genotype-phenotype associations across multiple diseases in an electronic medical record. *Am J Hum Genet*. 2010 Apr 9;86(4):560–72.
14. Wang X, Elston RC, Zhu X. The meaning of interaction. *Hum Hered*. 2010;70(4):269–77.
15. Distefano JK, Taverna DM. Technological issues and experimental design of gene association studies. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2011;700:3–16.
16. Devlin B, Risch N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics*. 1995 Sep 20;29(2):311–22.
17. Li M, Li C, Guan W. Evaluation of coverage variation of SNP chips for genome-wide association studies. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2008 May;16(5):635–43.
18. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 1980 May;32(3):314–31.
19. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996 Sep 13;273(5281):1516–7.

20. Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science*. 1996 Oct 25;274(5287):536–9.
21. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860–921.
22. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):928–33.
23. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2002 Apr;4(2):45–61.
24. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet*. 2003 Feb;33(2):177–82.
25. 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.
26. Visscher PM, Hill WG, Wray NR. Heritability in the genomics era--concepts and misconceptions. *Nat Rev Genet*. 2008 Apr;9(4):255–66.
27. Cupples LA, Arruda HT, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Demissie S, DeStefano AL, et al. The Framingham Heart Study 100K SNP genome-wide association study

- resource: overview of 17 phenotype working group reports. *BMC Med Genet.* 2007;8 Suppl 1:S1.
28. Mitchell AA, Cutler DJ, Chakravarti A. Undetected genotyping errors cause apparent overtransmission of common alleles in the transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet.* 2003 Mar;72(3):598–610.
  29. Clayton DG, Walker NM, Smyth DJ, Pask R, Cooper JD, Maier LM, et al. Population structure, differential bias and genomic control in a large-scale, case-control association study. *Nat Genet.* 2005 Nov;37(11):1243–6.
  30. Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet.* 2006 Oct;7(10):781–91.
  31. 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.
  32. Kazeem GR, Farrall M. Integrating case-control and TDT studies. *Ann Hum Genet.* 2005 May;69(Pt 3):329–35.
  33. Silver, LM. *Mouse Genetics: Concepts and Applications.* Oxford Univ. Press; 1995.
  34. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest.* 2008 May;118(5):1590–605.
  35. Burke DT, Kozloff KM, Chen S, West JL, Wilkowski JM, Goldstein SA, et al. Dissection of complex adult traits in a mouse synthetic population. *Genome Res.* 2012 Aug;22(8):1549–57.



36. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009 Oct 8;461(7265):747–53.
37. Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, et al. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*. 2011 Jun 16;474(7351):337–42.
38. Gunderson KL, Steemers FJ, Lee G, Mendoza LG, Chee MS. A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat Genet*. 2005 May;37(5):549–54.
39. Matsuzaki H, Dong S, Loi H, Di X, Liu G, Hubbell E, et al. Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays. *Nat Methods*. 2004 Nov;1(2):109–11.
40. Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, White MA, Wong K, Yalcin B, et al. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature*. 2011 Sep 15;477(7364):289–94.
41. Yang H, Ding Y, Hutchins LN, Szatkiewicz J, Bell TA, Paigen BJ, et al. A customized and versatile high-density genotyping array for the mouse. *Nat Methods*. 2009 Sep;6(9):663–6.
42. Frazer KA, Eskin E, Kang HM, Bogue MA, Hinds DA, Beilharz EJ, et al. A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. *Nature*. 2007 Aug 30;448(7157):1050–3.

43. Churchill GA, Airey DC, Allayee H, Angel JM, Attie AD, Beatty J, et al. The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits. *Nat Genet.* 2004 Nov;36(11):1133–7.
44. Bennett BJ, Farber CR, Orozco L, Kang HM, Ghazalpour A, Siemers N, et al. A high-resolution association mapping panel for the dissection of complex traits in mice. *Genome Res.* 2010 Feb;20(2):281–90.
45. Zhang W, Korstanje R, Thaisz J, Staedtler F, Harttman N, Xu L, et al. Genome-wide association mapping of quantitative traits in outbred mice. *G3 Bethesda Md.* 2012 Feb;2(2):167–74.
46. Farber CR, Bennett BJ, Orozco L, Zou W, Lira A, Kostem E, et al. Mouse genome-wide association and systems genetics identify *Asxl2* as a regulator of bone mineral density and osteoclastogenesis. *PLoS Genet.* 2011 Apr;7(4):e1002038.
47. Park CC, Gale GD, de Jong S, Ghazalpour A, Bennett BJ, Farber CR, et al. Gene networks associated with conditional fear in mice identified using a systems genetics approach. *BMC Syst Biol.* 2011;5:43.
48. Aylor DL, Valdar W, Foulds-Mathes W, Buus RJ, Verdugo RA, Baric RS, et al. Genetic analysis of complex traits in the emerging Collaborative Cross. *Genome Res.* 2011 Aug;21(8):1213–22.
49. Bogue MA, Grubb SC, Maddatu TP, Bult CJ. Mouse Phenome Database (MPD). *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue):D643–9.
50. Payseur BA, Place M. Prospects for association mapping in classical inbred mouse strains. *Genetics.* 2007 Apr;175(4):1999–2008.

51. Kang HM, Zaitlen NA, Wade CM, Kirby A, Heckerman D, Daly MJ, et al. Efficient control of population structure in model organism association mapping. *Genetics*. 2008 Mar;178(3):1709–23.
52. Kang HM, Zaitlen NA, Wade CM, Kirby A, Heckerman D, Daly MJ, et al. Efficient control of population structure in model organism association mapping. *Genetics*. 2008 Mar;178(3):1709–23.
53. Philip VM, Sokoloff G, Ackert-Bicknell CL, Striz M, Branstetter L, Beckmann MA, et al. Genetic analysis in the Collaborative Cross breeding population. *Genome Res*. 2011 Aug;21(8):1223–38.
54. Threadgill DW, Churchill GA. Ten years of the Collaborative Cross. *Genetics*. 2012 Feb;190(2):291–4.
55. Collaborative Cross Consortium. The genome architecture of the Collaborative Cross mouse genetic reference population. *Genetics*. 2012 Feb;190(2):389–401.
56. Kelada SNP, Aylor DL, Peck BCE, Ryan JF, Tavarez U, Buus RJ, et al. Genetic analysis of hematological parameters in incipient lines of the collaborative cross. *G3 Bethesda Md*. 2012 Feb;2(2):157–65.
57. Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Burnett S, Klenerman P, Cookson WO, et al. Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice. *Nat Genet*. 2006 Aug;38(8):879–87.
58. Svenson KL, Gatti DM, Valdar W, Welsh CE, Cheng R, Chesler EJ, et al. High-resolution genetic mapping using the Mouse Diversity outbred population. *Genetics*. 2012 Feb;190(2):437–47.

59. Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Burnett S, Klenerman P, Cookson WO, et al. Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice. *Nat Genet.* 2006 Aug;38(8):879–87.
60. Marchini J, Howie B, Myers S, McVean G, Donnelly P. A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat Genet.* 2007 Jul;39(7):906–13.
61. Li Y, Tesson BM, Churchill GA, Jansen RC. Critical reasoning on causal inference in genome-wide linkage and association studies. *Trends Genet TIG.* 2010 Dec;26(12):493–8.
62. Zhang W, Korstanje R, Thaisz J, Staedtler F, Harttman N, Xu L, et al. Genome-wide association mapping of quantitative traits in outbred mice. *G3 Bethesda Md.* 2012 Feb;2(2):167–74.
63. Long AD, Mullaney SL, Mackay TF, Langley CH. Genetic interactions between naturally occurring alleles at quantitative trait *loci* and mutant alleles at candidate *loci* affecting bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 1996 Dec;144(4):1497–510.
64. Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M, Todd JA. Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science.* 2009 Apr 17;324(5925):387–9.
65. Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, Stevens C, Sharma Y, Zhang CK, et al. Deep resequencing of GWAS *loci* identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet.* 2011 Nov;43(11):1066–73.

66. Yalcin B, Willis-Owen SAG, Fullerton J, Meesaq A, Deacon RM, Rawlins JNP, et al. Genetic dissection of a behavioral quantitative trait *locus* shows that *Rgs2* modulates anxiety in mice. *Nat Genet.* 2004 Nov;36(11):1197–202.
67. Su Z, Ishimori N, Chen Y, Leiter EH, Churchill GA, Paigen B, et al. Four additional mouse crosses improve the lipid QTL landscape and identify *Lipg* as a QTL gene. *J Lipid Res.* 2009 Oct;50(10):2083–94.
68. Alberts B, et al. *Molecular Biology of the Cell.* 5th ed. New York: Garland Science; 2008.
69. Capecchi MR. Targeted gene replacement. *Sci Am.* 1994 Mar;270(3):52–9.
70. Mackay TFC. Complementing complexity. *Nat Genet.* 2004 Nov;36(11):1145–7.
71. Wilkie AOM. Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Apr;16(2):187–203.
72. Davis RC, Jin A, Rosales M, Yu S, Xia X, Ranola K, et al. A genome-wide set of congenic mouse strains derived from CAST/Ei on a C57BL/6 background. *Genomics.* 2007 Sep;90(3):306–13.
73. Schadt EE, Lamb J, Yang X, Zhu J, Edwards S, Guhathakurta D, et al. An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. *Nat Genet.* 2005 Jul;37(7):710–7.
74. Cooper GM, Shendure J. Needles in stacks of needles: finding disease-causal variants in a wealth of genomic data. *Nat Rev Genet.* 2011 Sep;12(9):628–40.

75. Verdugo RA, Farber CR, Warden CH, Medrano JF. Serious limitations of the QTL/microarray approach for QTL gene discovery. *BMC Biol.* 2010;8:96.
76. Musunuru K, Strong A, Frank-Kamenetsky M, Lee NE, Ahfeldt T, Sachs KV, et al. From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol *locus*. *Nature.* 2010 Aug 5;466(7307):714–9.
77. Ayroles JF, Carbone MA, Stone EA, Jordan KW, Lyman RF, Magwire MM, et al. Systems genetics of complex traits in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet.* 2009 Mar;41(3):299–307.
78. Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. *Introduction to Quantitative Genetics* 4th edn (Longman, 1996).
79. Huang W, Richards S, Carbone MA, Zhu D, Anholt RRH, Ayroles JF, et al. Epistasis dominates the genetic architecture of *Drosophila* quantitative traits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Sep 25;109(39):15553–9.
80. Burns, J. in *Towards a Theoretical Biology* Vol. 3 (ed. Waddington, C. H.) 47–51 (Edinburgh Univ. Press, 1970).
81. Waddington, C. H. *The Strategy of the Genes* 262 (Allen & Unwin, 1957).
82. Passador-Gurgel G, Hsieh W-P, Hunt P, Deighton N, Gibson G. Quantitative trait transcripts for nicotine resistance in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet.* 2007 Feb;39(2):264–8.
83. Petretto E, Sarwar R, Grieve I, Lu H, Kumaran MK, Muckett PJ, et al. Integrated genomic approaches implicate osteoglycin (*Ogn*) in the regulation of left ventricular mass. *Nat Genet.* 2008 May;40(5):546–52.

84. Huang W, Richards S, Carbone MA, Zhu D, Anholt RRH, Ayroles JF, et al. Epistasia dominates the genetic architecture of *Drosophila* quantitative traits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Sep 25;109(39):15553–9.
85. Ehrenreich IM, Bloom J, Torabi N, Wang X, Jia Y, Kruglyak L. Genetic architecture of highly complex chemical resistance traits across four yeast strains. *PLoS Genet*. 2012;8(3):e1002570.
86. Brem RB, Yvert G, Clinton R, Kruglyak L. Genetic dissection of transcriptional regulation in budding yeast. *Science*. 2002 Apr 26;296(5568):752–5.
87. Brem RB, Kruglyak L. The landscape of genetic complexity across 5,700 gene expression traits in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 1;102(5):1572–7.
88. Lappalainen T, Sammeth M, Friedländer MR, 't Hoen PAC, Monlong J, Rivas MA, et al. Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans. *Nature*. 2013 Sep 26;501(7468):506–11.
89. Van Nas A, Ingram-Drake L, Sinsheimer JS, Wang SS, Schadt EE, Drake T, et al. Expression quantitative trait *loci*: replication, tissue- and sex-specificity in mice. *Genetics*. 2010 Jul;185(3):1059–68.
90. Breitling R, Li Y, Tesson BM, Fu J, Wu C, Wiltshire T, et al. Genetical genomics: spotlight on QTL hotspots. *PLoS Genet*. 2008 Oct;4(10):e1000232.
91. Orozco LD, Bennett BJ, Farber CR, Ghazalpour A, Pan C, Che N, et al. Unraveling inflammatory responses using systems genetics and gene-environment interactions in macrophages. *Cell*. 2012 Oct 26;151(3):658–70.

92. Romanoski CE, Lee S, Kim MJ, Ingram-Drake L, Plaisier CL, Yordanova R, et al. Systems genetics analysis of gene-by-environment interactions in human cells. *Am J Hum Genet.* 2010 Mar 12;86(3):399–410.
93. Schaub MA, Boyle AP, Kundaje A, Batzoglou S, Snyder M. Linking disease associations with regulatory information in the human genome. *Genome Res.* 2012 Sep;22(9):1748–59.
94. Civelek M, Hagopian R, Pan C, Che N, Yang W, Kayne PS, et al. Genetic regulation of human adipose microRNA expression and its consequences for metabolic traits. *Hum Mol Genet.* 2013 Aug 1;22(15):3023–37.
95. Kumar V, Westra H-J, Karjalainen J, Zhernakova DV, Esko T, Hrdlickova B, et al. Human disease-associated genetic variation impacts large intergenic non-coding RNA expression. *PLoS Genet.* 2013;9(1):e1003201.
96. Flint J, Mackay TFC. Genetic architecture of quantitative traits in mice, flies, and humans. *Genome Res.* 2009 May;19(5):723–33.
97. Naya FJ, Black BL, Wu H, Bassel-Duby R, Richardson JA, Hill JA, et al. Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. *Nat Med.* 2002 Nov;8(11):1303–9.
98. Weiss JN, Karma A, MacLellan WR, Deng M, Rau CD, Rees CM, et al. “Good enough solutions” and the genetics of complex diseases. *Circ Res.* 2012 Aug 3;111(4):493–504.
99. Wu C, Kraft P, Zhai K, Chang J, Wang Z, Li Y, et al. Genome-wide association analyses of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese identify multiple



- susceptibility *loci* and gene-environment interactions. *Nat Genet.* 2012 Oct;44(10):1090–7.
100. Ghazalpour A, Bennett B, Petyuk VA, Orozco L, Hagopian R, Mungrue IN, et al. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genet.* 2011 Jun;7(6):e1001393.
  101. Zuk O, Hechter E, Sunyaev SR, Lander ES. The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jan 24;109(4):1193–8.
  102. Prabhu S, Pe'er I. Ultrafast genome-wide scan for SNP-SNP interactions in common complex disease. *Genome Res.* 2012 Nov;22(11):2230–40.
  103. Hill WG, Goddard ME, Visscher PM. Data and theory point to mainly additive genetic variance for complex traits. *PLoS Genet.* 2008 Feb;4(2):e1000008.
  104. Bloom JS, Ehrenreich IM, Loo WT, Lite T-LV, Kruglyak L. Finding the sources of missing heritability in a yeast cross. *Nature.* 2013 Feb 14;494(7436):234–7.
  105. Parks BW, Nam E, Org E, Kostem E, Norheim F, Hui ST, et al. Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice. *Cell Metab.* 2013 Jan 8;17(1):141–52.
  106. Smith EN, Kruglyak L. Gene-environment interaction in yeast gene expression. *PLoS Biol.* 2008 Apr 15;6(4):e83.
  107. Smirnov DA, Morley M, Shin E, Spielman RS, Cheung VG. Genetic analysis of radiation-induced changes in human gene expression. *Nature.* 2009 May 28;459(7246):587–91.

108. Pearl, J. *Causality* (Cambridge Univ. Press, 2009).
109. Schwartz SM, Schwartz HT, Horvath S, Schadt E, Lee S-I. A systematic approach to multifactorial cardiovascular disease: causal analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Dec;32(12):2821–35.
110. Marbach D, Costello JC, Küffner R, Vega NM, Prill RJ, Camacho DM, et al. Wisdom of crowds for robust gene network inference. *Nat Methods.* 2012 Aug;9(8):796–804.
111. Huan T, Zhang B, Wang Z, Joehanes R, Zhu J, Johnson AD, et al. A systems biology framework identifies molecular underpinnings of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Jun;33(6):1427–34.
112. Zhang B, Gaiteri C, Bodea L-G, Wang Z, McElwee J, Podtelezchnikov AA, et al. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer’s disease. *Cell.* 2013 Apr 25;153(3):707–20.
113. Hageman RS, Leduc MS, Korstanje R, Paigen B, Churchill GA. A Bayesian framework for inference of the genotype-phenotype map for segregating populations. *Genetics.* 2011 Apr;187(4):1163–70.
114. Neto EC, Broman AT, Keller MP, Attie AD, Zhang B, Zhu J, et al. Modeling causality for pairs of phenotypes in system genetics. *Genetics.* 2013 Mar;193(3):1003–13.
115. Blair RH, Kliebenstein DJ, Churchill GA. What can causal networks tell us about metabolic pathways? *PLoS Comput Biol.* 2012;8(4):e1002458.

116. Chaibub Neto E, Ferrara CT, Attie AD, Yandell BS. Inferring causal phenotype networks from segregating populations. *Genetics*. 2008 Jun;179(2):1089–100.
117. Li R, Tsaih S-W, Shockley K, Stylianou IM, Wergedal J, Paigen B, et al. Structural model analysis of multiple quantitative traits. *PLoS Genet*. 2006 Jul;2(7):e114.
118. Friedman RA, Van Laer L, Huentelman MJ, Sheth SS, Van Eyken E, Corneveaux JJ, et al. GRM7 variants confer susceptibility to age-related hearing impairment. *Hum Mol Genet*. 2009 Feb 15;18(4):785–96.
119. 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.
120. Van Laer L, Huyghe JR, Hannula S, Van Eyken E, Stephan DA, Mäki-Torkko E, et al. A genome-wide association study for age-related hearing impairment in the Saami. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2010 Jun;18(6):685–93.
121. Girotto G, Pirastu N, Sorice R, Biino G, Campbell H, d' Adamo AP, et al. Hearing function and thresholds: a genome-wide association study in European isolated populations identifies new *loci* and pathways. *J Med Genet*. 2011 Jun;48(6):369–74.
122. Newman DL, Fisher LM, Ohmen J, Parody R, Fong C-T, Frisina ST, et al. GRM7 variants associated with age-related hearing loss based on auditory perception. *Hear Res*. 2012 Dec;294(1-2):125–32.

123. Girotto G, Vuckovic D, Buniello A, Lorente-Cánovas B, Lewis M, Gasparini P, et al. Expression and replication studies to identify new candidate genes involved in normal hearing function. *PloS One*. 2014;9(1):e85352.
124. 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.
125. ACOEM Noise and Hearing Conservation Committee. ACOEM evidence-based statement: noise-induced hearing loss. *J Occup Environ Med Am Coll Occup Environ Med*. 2003 Jun;45(6):579–81.
126. Nudelman, A.A. et al. Perda Auditiva Induzida pelo Ruído Relacionada ao Trabalho; In: Lavinsky, L. *Tratamento em Otologia*. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.
127. 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.
128. Gratton MA, Eleftheriadou A, Garcia J, Verduzco E, Martin GK, Lonsbury-Martin BL, et al. Noise-induced changes in gene expression in the cochleae of mice differing in their susceptibility to noise damage. *Hear Res*. 2011 Jul;277(1-2):211–26.
129. McShane DP, Hyde ML, Alberti PW. Tinnitus prevalence in industrial hearing loss compensation claimants. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1988 Oct;13(5):323–30.

130. IBAÑEZ, R. N.; SCHNEIDER, I. O.; SELIGMAN, J. Anamnese dos trabalhadores expostos ao ruído. In: NUDELMANN, A. A. et al. *Perda Auditiva Induzida pelo Ruído: volume II*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
131. 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.
132. Pawelczyk M, Van Laer L, Fransen E, Rajkowska E, Konings A, Carlsson P-I, et al. Analysis of gene polymorphisms associated with K ion circulation in the inner ear of patients susceptible and resistant to noise-induced hearing loss. *Ann Hum Genet.* 2009 Jul;73(Pt 4):411–21.
133. 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.
134. Yang M, Tan H, Yang Q, Wang F, Yao H, Wei Q, et al. Association of hsp70 polymorphisms with risk of noise-induced hearing loss in Chinese automobile workers. *Cell Stress Chaperones.* 2006;11(3):233–9.
135. 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):164–71.
136. Fortunato G, Marciano E, Zarrilli F, Mazzaccara C, Intriери M, Calcagno G, et al. Paraoxonase and superoxide dismutase gene polymorphisms and noise-induced hearing loss. *Clin Chem.* 2004 Nov;50(11):2012–8.

137. 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.
138. 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.
139. Liu Y-M, Li X-D, Guo X, Liu B, Lin A-H, Ding Y-L, et al. SOD2 V16A SNP in the mitochondrial targeting sequence is associated with noise induced hearing loss in Chinese workers. *Dis Markers.* 2010;28(3):137–47.
140. 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.
141. Palodetto B, Postal M, Grignoli CRE, Sartorato EL, Oliveira CA de. Influence of glutathione s-transferase on the ototoxicity caused by aminoglycosides. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010 Jun;76(3):306–9.
142. Wangemann P. K<sup>+</sup> cycling and the endocochlear potential. *Hear Res.* 2002 Mar;165(1-2):1–9.
143. 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.

144. 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.
145. 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.
146. 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.
147. 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.
148. 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.
149. 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.
150. Lim HH, Jenkins OH, Myers MW, Miller JM, Altschuler RA. Detection of HSP 72 synthesis after acoustic overstimulation in rat cochlea. *Hear Res*. 1993 Sep;69(1-2):146–50.

151. 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.
152. 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.
153. Ohlemiller KK. Contributions of mouse models to understanding of age- and noise-related hearing loss. *Brain Res*. 2006 May 26;1091(1):89–102.
154. 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.
155. 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.
156. 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.
157. 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.



158. 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.
159. 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.
160. 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.
161. 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.
162. 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.
163. 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.
164. 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.

165. 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.
166. Hulcrantz 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.
167. Li HS, Borg E. Auditory degeneration after acoustic trauma in two genotypes of mice. *Hear Res.* 1993 Jun;68(1):19–27.
168. Li HS, Hulcrantz 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.
169. 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.
170. 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.
171. 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.
172. Davis RR, Kozel P, Erway LC. Genetic influences in individual susceptibility to noise: a review. *Noise Health.* 2003 Sep;5(20):19–28.

173. 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 Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 2. *J Biol Chem.* 1998 Jul 24;273(30):18693–6.
174. Street VA, McKee-Johnson JW, Fonseca RC, Tempel BL, Noben-Trauth K. Mutations in a plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase gene cause deafness in deafwaddler mice. *Nat Genet.* 1998 Aug;19(4):390–4.
175. 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.
176. 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.
177. Tabuchi K, Suzuki M, Mizuno A, Hara A. Hearing impairment in TRPV4 knockout mice. *Neurosci Lett.* 2005 Jul 15;382(3):304–8.
178. 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.
179. 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.

180. 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.
181. 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.
182. 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.
183. 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.
184. 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.
185. 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.
186. Le T, Keithley EM. Effects of antioxidants on the aging inner ear. *Hear Res.* 2007 Apr;226(1-2):194–202.

187. 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.
188. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol*. 2002 Sep;64(5-6):1019–26.
189. 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.
190. 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.
191. Xiao X, Zuo X, Davis AA, McMillan DR, Curry BB, Richardson JA, et al. 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.
192. Fairfield DA, Lomax MI, Dootz GA, Chen S, Galecki AT, Benjamin IJ, et al. Heat shock factor 1-deficient mice exhibit decreased recovery of hearing following noise overstimulation. *J Neurosci Res*. 2005 Aug 15;81(4):589–96.
193. Suzuki J, Oshima T, Yoshida N, Kimura R, Takata Y, Owada Y, et al. Preservation of cochlear function in Fabp3 (H-Fabp) knockout mice. *Neurosci Res*. 2014 May;81-82:64–8.
194. 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.
195. Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2009 Nov 11;29(45):14077–85.
196. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med*. 1980 Sep;93(3):480–9.
197. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956 Jul;11(3):298–300.
198. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*. 1998 Apr;78(2):547–81.
199. Kikuchi H, Hikage M, Miyashita H, Fukumoto M. NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene*. 2000 Aug 22;254(1-2):237–43.
200. Bánfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause K-H. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem*. 2004 Oct 29;279(44):46065–72.
201. Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*. 2001 May 16;269(1-2):131–40.
202. Ueno N, Takeya R, Miyano K, Kikuchi H, Sumimoto H. The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its

- regulation by oxidase organizers and activators. *J Biol Chem.* 2005 Jun 17;280(24):23328–39.
203. Ueyama T, Geiszt M, Leto TL. Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol Cell Biol.* 2006 Mar;26(6):2160–74.
204. Kawahara T, Ritsick D, Cheng G, Lambeth JD. Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *J Biol Chem.* 2005 Sep 9;280(36):31859–69.
205. Kiss PJ, Knisz J, Zhang Y, Baltrusaitis J, Sigmund CD, Thalmann R, et al. Inactivation of NADPH oxidase organizer 1 results in severe imbalance. *Curr Biol CB.* 2006 Jan 24;16(2):208–13.
206. Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, Jagla W, et al. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev.* 2004 Mar 1;18(5):486–91.
207. Clerici WJ, Hensley K, DiMartino DL, Butterfield DA. Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hear Res.* 1996 Sep 1;98(1-2):116–24.
208. Kopke RD, Liu W, Gabaizadeh R, Jacono A, Feghali J, Spray D, et al. Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *Am J Otol.* 1997 Sep;18(5):559–71.

209. Yamasoba T, Nuttall AL, Harris C, Raphael Y, Miller JM. Role of glutathione in protection against noise-induced hearing loss. *Brain Res.* 1998 Feb 16;784(1-2):82–90.
210. Bánfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause K-H. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem.* 2004 Oct 29;279(44):46065–72.
211. Mikaelian DO, Warfield D, Norris O. Genetic progressive hearing loss in the C57-b16 mouse. Relation of behavioral responses to cochlear anatomy. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1974 May;77(5):327–34.
212. Spongr VP, Flood DG, Frisina RD, Salvi RJ. Quantitative measures of hair cell loss in CBA and C57BL/6 mice throughout their life spans. *J Acoust Soc Am.* 1997 Jun;101(6):3546–53.
213. Ohinata Y, Miller JM, Altschuler RA, Schacht J. Intense noise induces formation of vasoactive lipid peroxidation products in the cochlea. *Brain Res.* 2000 Sep 29;878(1-2):163–73.
214. Takumida M, Anniko M. Simultaneous detection of both nitric oxide and reactive oxygen species in guinea pig vestibular sensory cells. *ORL J Oto-Rhino-Laryngol Its Relat Spec.* 2002 Apr;64(2):143–7.
215. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):245–313.
216. Darrat I, Ahmad N, Seidman K, Seidman MD. Auditory research involving antioxidants. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007 Oct;15(5):358–63.



217. Guthrie OW. Aminoglycoside induced ototoxicity. *Toxicology*. 2008 Jul 30;249(2-3):91–6.
218. Henderson D, McFadden SL, Liu CC, Hight N, Zheng XY. The role of antioxidants in protection from impulse noise. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Nov 28;884:368–80.
219. Mukherjea D, Jajoo S, Kaur T, Sheehan KE, Ramkumar V, Rybak LP. Transtympanic administration of short interfering (si)RNA for the NOX3 isoform of NADPH oxidase protects against cisplatin-induced hearing loss in the rat. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Sep 1;13(5):589–98.
220. Thalmann R, Ignatova E, Kachar B, Ornitz DM, Thalmann I. Development and maintenance of otoconia: biochemical considerations. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Oct;942:162–78.
221. Jones SM, Erway LC, Johnson KR, Yu H, Jones TA. Gravity receptor function in mice with graded otoconial deficiencies. *Hear Res*. 2004 May;191(1-2):34–40.
222. Jones TA, Jones SM. Short latency compound action potentials from mammalian gravity receptor organs. *Hear Res*. 1999 Oct;136(1-2):75–85.
223. Vljakovic SM, Lin SC-Y, Wong ACY, Wackrow B, Thorne PR. Noise-induced changes in expression levels of NADPH oxidases in the cochlea. *Hear Res*. 2013 Oct;304:145–52.

### **3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO**

O envolvimento genético da perda auditiva induzida por ruído (PAIR) tem sido claramente demonstrado em animais, já que diferentes linhagens de camundongos consanguíneos apresentam diferentes susceptibilidades ao ruído.

Está bem estabelecido que pessoas expostas ao ruído de forma semelhante apresentam variação no grau de perda auditiva, indicando um componente genético. Entretanto, a descoberta das interações entre o gene e o ambiente em humanos, como na susceptibilidade à PAIR, apresenta muitas dificuldades no controle da exposição.

Por isso, foi proposto um estudo de associação do genoma inteiro (“mapeamento genômico”) utilizando camundongos. O estudo com modelos animais permite que a exposição ao ruído seja cuidadosamente controlada, facilitando o estudo de traços complexos, como a PAIR. Essa análise de associação permite um mapeamento genético da susceptibilidade à PAIR e, subsequentemente, uma análise e confirmação de genes candidatos.

## **4. OBJETIVO**

### **4.1 Objetivo Geral**

- Apresentar um mapeamento genético da susceptibilidade à perda auditiva induzida pelo ruído (PAIR) em camundongos consanguíneos através de um estudo de associação do genoma inteiro.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Demonstrar a variação fenotípica de susceptibilidade à PAIR nas diferentes linhagens de camundongos consanguíneos.
- Analisar o gene candidato mapeado através da utilização de um modelo de camundongo mutante.
- Determinar o papel do gene candidato à PAIR através de estudos eletrofisiológicos e de imuno-histoquímica.

**Genome-wide association study identifies *Nox3* as a critical gene for susceptibility to noise-induced hearing loss.**

**Abstract**

In the United States, roughly 10% of the population is exposed daily to hazardous levels of noise in the workplace. Twin studies estimate heritability for noise-induced hearing loss (NIHL) of approximately 36% and strain specific variation in sensitivity has been demonstrated in mice. Based upon the difficulties inherent to the study of NIHL in humans we have turned to the study of this complex trait in mice. We exposed 5 week-old mice from the Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP) to a 10 kHz octave band noise at 108 dB for 2 hours and assessed the permanent threshold shift 2 weeks post exposure using frequency specific stimuli. These data were then used in a genome-wide association study (GWAS) using the Efficient Mixed Model Analysis (EMMA) to

control for population structure. In this manuscript we describe our GWAS, with an emphasis on a significant peak for susceptibility to NIHL on chromosome 17 within a haplotype block containing NADPH oxidase-3 (*Nox3*). Our peak was detected after an 8 kHz tone burst stimulus. *Nox3* mutants and heterozygotes were then tested to validate our GWAS. The mutants and heterozygotes demonstrated a greater susceptibility to NIHL specifically at 8 kHz both on measures of distortion product otoacoustic emissions (DPOAE) and on auditory brainstem response (ABR). We demonstrate that this sensitivity resides within the synaptic ribbons of the cochlea in the mutant animals specifically at 8 kHz. Our work is the first GWAS for NIHL in mice and elucidates the power of our approach to identify tonotopic genetic susceptibility to NIHL.

## Author Summary

Noise-induced hearing loss (NIHL) is the most common work-related disease in the world and the second cause of hearing loss. Although several candidate gene association studies for NIHL in humans have been conducted, each are underpowered, unreplicated, and account for only a fraction of the genetic risk. Buoyed by the prospects and successes of human association studies, several groups have proposed mouse genome-wide association studies. The environment can be carefully controlled facilitating the study of complex traits like NIHL. In this manuscript, we describe, for the first time, an association analysis with correction for population structure for the mapping of several loci for susceptibility to NIHL in inbred strains of mice. We identify *Nox3* as the associated gene for susceptibility to NIHL that the genetic susceptibility is frequency specific and that it occurs at the level of the cochlear synaptic ribbon.

## Introduction

Noise-induced hearing loss (NIHL) is a worldwide leading occupational health risk in industrialized countries and is the second most common form of sensorineural hearing impairment, after presbycusis [1]. In the United States, roughly 10% of the total population is exposed daily to hazardous levels of noise in the workplace [2]. The most extreme workplace environment for NIHL is the Armed Forces. According to the Department of Veterans Affairs, hearing loss is the most common disability among U.S. troops in the Middle East. The financial impact of these disability claims on the VA is staggering and likely will continue to grow. According to the American Tinnitus Association (<http://www.ata.org/>), the number of disability claims from hearing injury is expected to increase by 18% per year with a total cost of \$1.2 billion annually [3]. Risk could be reduced with a better understanding of the biological processes that modulate susceptibility to damaging noise. It is believed that NIHL is a complex disease resulting from the interaction between environmental and genetic factors and it is well recognized that people with similar exposures to noise show variation in the amount of hearing loss, indicative of a genetic component [4]. Twin studies estimate heritability for noise-induced hearing loss (NIHL) of approximately 36% [5].

The discovery of gene by environment interactions in human disease, such as susceptibility to NIHL, has many inherent difficulties, most notably, controlling for exposure. Although several candidate gene association studies for NIHL in humans have been conducted, each is underpowered, un-replicated, and accounts for only a fraction of the genetic risk. In addition, no heritability studies have been performed,

since families, where all subjects are exposed to identical noise conditions, are almost impossible to collect.

The genetic basis of NIHL has been clearly demonstrated in animals as different susceptibilities to noise have been seen in different inbred strains of mice [4]. Mouse strains (C57BL/6J) exhibiting age-related hearing loss (AHL) were shown to be more susceptible to noise than other strains [6]. Also, several knockout mice including SOD1<sup>-/-</sup> [7], GPX1<sup>-/-</sup> [8], PMCA2<sup>-/-</sup> [9] and CDH23<sup>+/-</sup> [10] were shown to be more sensitive to noise than their wild-type littermates. The mouse has been an essential animal model for studies in hearing loss, and advances in mouse genetics, including genome sequence and high density single-nucleotide polymorphism (SNP) maps, provide a suitable system for the study of a complex trait such as NIHL [6]. The identification of novel genes is crucial for the discovery of new pathways and gene networks that will improve our knowledge of basic hearing biology and identify new therapeutic targets with the potential to combat NIHL.

Due to the limitations of human genome-wide association study (GWAS) and quantitative trait locus (QTL) analyses in mice, we have chosen to use a genome-wide association strategy incorporating the Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP). The HMDP is a collection of classical inbred (CI) and recombinant inbred (RI) strains whose genomes have been sequenced and/or genotyped at high resolution [11]. Power calculations have demonstrated that this panel is superior to traditional linkage analysis and is capable of detecting loci responsible for 5% of the overall variance. Several studies have successfully mapped candidate loci for complex traits using this panel and we have recently published a meta-analysis for age-related hearing loss incorporating the HMDP [12] [13] [14] [15].

In this manuscript we describe, for the first time, an association analysis with correction for population structure in the mapping of several loci for susceptibility to NIHL in inbred strains of mice. After completing a preliminary screen of the HMDP, an intriguing locus appeared warranting further exploration. Herein, we describe a genome-wide significant peak on (Chr.) 17 within a haplotype block containing NADPH oxidase-3 (*Nox3*) and provide evidence supporting its role in susceptibility to NIHL. Furthermore, we demonstrate frequency-specific genetic susceptibility within the mouse cochlea.

## Materials and Methods

### Ethics statement

The Institutional Care and Use Committee (IACUC) at University of Southern California, Los Angeles, approved the animal protocol for the HMDP strains and the *Nox3<sup>het</sup>* mice (IACUC 12033). HMDP strains and C57BL/6J *Nox3<sup>het</sup>* (*Nox3<sup>het</sup>/Nox3<sup>het</sup>*, *Nox3<sup>het</sup>/+* and wild-type) were anesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (80 mg/kg body weight) and xylazine (16 mg/kg body weight).

### The Hybrid Mouse Diversity Panel

A detailed description of the HMDP (strain selection, statistical power and mapping resolution) is provided in Bennett BJ, et al. 2010. [11]. Approximately four female mice for each HMDP strain were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Only female mice were tested to avoid confounding effects of sex. Mice were 4 weeks



of age, and to ensure adequate acclimatization to a common environment, mice were aged until 5 weeks. 5-week-old mice were selected to eliminate the potential effects of age-related hearing loss contributing to our phenotype. All mice were maintained on a chow diet until sacrifice.

## **Genotyping**

Common and recombinant inbred strains were previously genotyped by the Broad Institute ([www.mousehapmap.org](http://www.mousehapmap.org)). Of the 140,000 SNPs available, 108,064 were informative (allele frequency  $\geq 5\%$  and less than 20% missing data) and were used for the association analysis.

## **Pre and Post Noise Exposure Hearing Thresholds**

Stainless-steel electrodes were placed subcutaneously at the vertex of the head and the right mastoid, with a ground electrode at the base of the tail. Body temperature was maintained and monitored. Artificial tear ointment was applied to the eyes. Each mouse was recovered on a heating pad at body temperature. Auditory signals were presented as tone pips with a rise and a fall time of 0.5 msec and a total duration of 5 msec at the frequencies 4, 8, 12, 16, 24, and 32 kHz. Tone pips were delivered below threshold and then increased in 5 dB increments until goal of 100 dB. Signals were presented at a rate of 30/second. Responses were filtered with a 0.3 to 3 kHz pass-band (x10,000 times). For each stimulus intensity 512 waveforms were averaged. Hearing threshold was determined by inspection of auditory brainstem response (ABR) waveforms and was defined as the minimum intensity at which wave 1 could be distinguished. Data was stored for offline analysis of peak-to-peak (P1-N1) values for wave 1 amplitudes. Post-exposure thresholds were evaluated by the same method 2 weeks post-exposure.

## **Pre and Post Exposure DPOAE Determination**

Distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) were analyzed as input/output (I-O) functions with  $2f_1 - f_2$  (primary measure). Primary tones were set at a ratio of  $f_2/f_1 = 1.2$  with the  $f_2$  between 8 to 32 kHz ( $f_2$  level set 10 dB less than the  $f_1$  level) and  $L_2$  ranging from 20 to 70 dB. The noise floor was measured by averaging 6 spectral points (above and below the  $2f_1 - f_2$ ). After both waveform and spectral averaging DPOAEs were extracted. Threshold was defined as the  $L_2$  level needed to produce a DPOAE of 0 dB SPL with a signal to noise ratio (SNR)  $\geq 3$  dB.

## **Noise exposure and audiometric equipment**

6 week-old mice were exposed for 2 hours to 10 kHz octave band noise (OBN) at 108 dB SPL using a method adapted from Kujawa and Liberman (2009) [16]. The OBN noise exposure was previously described [17]. For 2 hours, mice were placed in a circular  $\frac{1}{4}$ -inch wire-mesh exposure cage with four shaped compartments and were able to move about within the compartment. The cage was placed in a MAC-1 soundproof chamber designed by Industrial Acoustics (IAC, Bronx, NY) and the sound chamber was lined with soundproofing acoustical foam to minimize reflections. Noise recordings were played with a Fostex FT17H Tweeter Speaker built into the top of the sound chamber. Calibration of the damaging noise was done with a B&K sound level meter with a variation of 1.5 dB across the cage.

A data acquisition board from National Instruments (National Instruments Corporation, Austin, Texas) was regulated by custom software (used to generate the stimuli and to process the responses). Stimuli were provided by a custom acoustic system, made up of two miniature speakers, and sound pressure was measured by a

condenser microphone. Testing involved the right ear only. All hearing tests were performed in a separate MAC-1 soundproof chamber to eliminate both environmental and electrical noise.

## **Cochlear RNA Extraction**

For each HMDP strain, both cochleae from each 8-week-old mouse were removed. The inner ear was micro-dissected and the surrounding soft tissue and the vestibular labyrinth was removed. The dissected cochleae were then frozen in liquid nitrogen and then ground to powder. RNA was extracted and purified by placing cochlea samples in RNA lysis buffer (Ambion). The sample was incubated overnight (4°C), centrifuged (12,000g for 5 minutes) to pellet insoluble materials and RNA isolated (following manufacturer's recommendations). This procedure generates approximately 300 ng of total RNA per mouse.

## **Gene Expression Analysis**

Illumina's Mouse whole genome expression, BeadChips, was used for the gene expression measurements. Amplifications and hybridizations were performed according to Illumina's protocol (Southern California Genome Consortium microarray core laboratory at UCLA). RNA was reverse transcribed to cDNA using Ambion cDNA synthesis kit (AMIL1791) and then converted to cRNA and labeled with biotin. Further, 800ng of biotinylated cRNA product was hybridized to prepare whole genome arrays and was incubated overnight (16-20 hrs) at 55°C. Arrays were washed and then stained with Cy3 label. Excess stain was removed by washing and then arrays were scanned on an Illumina BeadScan confocal laser scanner.

## **Efficient Mixed-Model Association (EMMA)**

EMMA is a statistical test for association mapping correcting for genetic relatedness and population structure and consider the mean per strain and also individual measurement per mouse to increase the statistical power. We have previously demonstrated that  $p < 0.05$  genome-wide equivalent for GWA using EMMA in the HMDP is  $P = 4.1 \times 10^{-6}$  ( $-\log_{10}P = 5.39$ )[18]. An R package implementation of EMMA is available online at <http://mouse.cs.ucla.edu/emma>.

## Candidate Gene Characterization

RefSeq genes were downloaded from the UCSC genome browser (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) using the NCBI Build37 genome assembly to characterize genes located in each association. EMMA was used to calculate association (P-values) for the probes corresponding to the RefSeq genes. The confidence interval (95%) for the distribution of distances between the most significant and the true causal SNPs, for simulated associations that explain 5% of the variance in the HMDP, is 2.6 Mb [11]. Only SNPs mapping to each associated region were used in this analysis. We selected SNPs that were variant in at least one of the HMDP classical inbred strains. Non-synonymous SNPs within each region were downloaded from the Mouse Phenome Database ([http:// phenome.jax.org/](http://phenome.jax.org/)).

## Characterizing the *Nox3*<sup>het</sup> mice

The generation and initial characterization of *Nox3*<sup>het</sup> allele was previously described [19]. The *Nox3*<sup>het</sup> allele arose spontaneously (endogenous retroviral insertion into intron 12) on the GL/Le strain, but has since been made congenic onto the C57BL/6JeiJ strain. To circumvent the probability of additional alleles from the donor strain this congenic region was backcrossed for more than 10 generations. Since the *downless* mutant allele

is not present in this strain the congenic interval containing *Nox3* is likely less than 5 centimorgans (<http://jaxmice.jax.org/strain/002557.html>). *Nox3<sup>het</sup>* (known as the *head-tilt* or *het* mice) carry autosomal recessive, spontaneous mutations that lead to otoconial absence with no apparent abnormalities in other organs. The otoconia deficit results in head-tilting behavior and absent vestibular-evoked potentials (VsEPs) but normal thresholds ABR [20].

Pre exposure ABR, DPOAE and VsEP in male and female mice (5 weeks old) of varying *Nox3<sup>het</sup>* genotype (*Nox3<sup>het</sup>/Nox3<sup>het</sup>* and *Nox3<sup>het</sup>/+*) and wild-type (C57BL/6JEiJ strain) was measured as described above. Pre-exposure threshold levels were obtained at 1 week prior to noise exposure and the animals were assessed for noise damage 2 weeks after exposure. The ABR permanent threshold shift (PTS) was defined as the difference between pre-exposure and post-exposure thresholds at each tested frequency. One-way ANOVA was used to test the significance and *post hoc* Tukey test for multiple comparisons.

## **Cochlear Whole Mount Preparation**

Mice were sacrificed less than 24 hours after the post exposure ABR. Cochleae were dissected from the surrounding tissues and openings were made into the coils by piercing the apex and rupturing both the oval and the round windows. The dissection was done in cold PBS. After dissection, cochleae were fixed in 4% paraformaldehyde for overnight at 4°C and then washed with PBS. Further dissection was done to expose the organ of Corti. For permeabilization and blocking, tissue was immersed for 1 hour in PBS containing 0.2% Triton X-100 (Sigma Chemical) and 16% normal goat serum (SouthernBiotech). Samples were incubated overnight at room temperature with primary antibodies (rabbit anti-myosin6, 1:500, Proteus Biosciences and purified mouse

anti-CtBP2, 1:500, BD Biosciences) for doubled-staining. Secondary antibody was then applied and tissue was incubated in the dark overnight (Alexa 594 donkey anti-rabbit, 1:500, Life technologies and Alexa Fluor-488 anti-mouse, 1:500, Life technologies). After, samples were washed three times in PBS and mounted on glass slides using Fluoromount G (SouthernBiotech). Microscopy was carried out with a laser confocal microscope (Olympus IX81) with epifluorescence light (Olympus Fluoview FV1000). Outer hair cell loss (% per 100µm) was counted and plotted as cytocochleogram by relating distance of cochlear apex to the tonotopic map of mice of strain CBA [21]. Percentages indicate the normalized location of the inner and outer hair cells in the cochlea (0%, apical and 100%, basal end) in 10% steps.

Synaptic ribbon density was plotted for each correspondent ABR frequency (4, 8, 12, 16, 24 and 32 kHz) against the same tonotopic map. Inner hair cells were analyzed in a row (50 µm) for each frequency. CtBP2 immunofluorescence spots were counted in z-stacks and divided by the number of inner hair cells (measured as the quantity of nuclei) in the sample.

### ***Nox3*<sup>het</sup> PCR**

Polymerase chain reaction (PCR) was performed for *Nox3* using the following primers: *Nox3*-int12F, GTTCTGGAGCACCTTGT; *Nox3*-int12R CCCATAGGGAGCCAAGAAAT; and ERV-R, TGTCAAGCTGACTCCACCAG [19]. PCR products were separated on a 1.5% agarose gel containing 0.5 mg/ml ethidium bromide.

## **Results**

## **There exists phenotypic variation in susceptibility to NIHL within the HMDP.**

In an effort to identify genomic regions associated with NIHL susceptibility, we phenotyped 5-week old female mice (n=297) from 64 HMDP strains (n= 4-5/strain) for thresholds after noise exposure using Auditory Brainstem Response thresholds at specific ABR stimulus frequencies. The stimuli consisted of 4, 8, 12, 16, 24 and 32 kHz tone bursts.

A wide range of ABR thresholds were observed across the HMDP with differences of 3.22-fold between the lowest and the highest strains for thresholds at 8 kHz post-noise exposure (Fig 1). Frequencies of 4, 12, 16, 24 and 32 kHz demonstrated differences of 1.55, 3.25, 3.57, 2.74 and 3.75-fold, respectively.

## **Genome-wide association analysis of NIHL reveals frequency specific genetic susceptibility.**

EMMA algorithm was applied to each phenotype separately to identify genetic associations for the six tone-burst stimuli [18]. Adjusted association p-values were calculated for 108,064 SNPs with minor allele frequency of > 5% ( $p < 0.05$  genome-wide equivalent for GWA using EMMA in the HMDP is  $p=4.1 \times 10^{-6}$ ,  $-\log_{10}P=5.39$ ).

At this threshold, genome-wide significant associations on Chr. 2 (rs27972902;  $p=8.6 \times 10^{-7}$ ) and Chr. 17 (rs33652818;  $p=2.3 \times 10^{-6}$ ) were identified for the 8 kHz stimuli (Table 1, Fig 2). Additionally, a significant association signal on Chr. 15 (rs32934144;  $p=1.7 \times 10^{-6}$ ) was identified for the 16 kHz tone burst and two significant regions on Chr.

3 (rs30795209;  $p=5.5 \times 10^{-7}$ ) and Chr. 15 (rs32278602;  $p=5.9 \times 10^{-7}$ ) were identified at 32 kHz.

## **Characterization of NIHL GWAS peaks.**

Within each association peak there were 4 (Chr. 15), 11 (Chr. 3), 10 (Chr. 17) and 2 (Chr. 2) unique RefSeq genes. We next identified genes within each of the five intervals possessing functional alterations. Genes were selected based upon their regulation by a local expression QTL (eQTL) in the HMDP or if they harbored a non-synonymous (NS) SNP that was predicted to have functional consequences. For the eQTL analysis, we generated gene expression microarray profiles using RNA isolated from cochleae in 64 HMDP strains ( $n=3$  arrays per strain). EMMA was then used to perform an association analysis between all SNPs and array probes mapping within each region. A total of 18,138 genes were represented by at least one probe, after excluding probes that overlapped SNPs, present among the classical inbred strains used in the HMDP (see Methods). Of these, 6 genes (4 within Chr. 3 association and 2 within Chr. 17 association) were identified with at least one probe whose expression was regulated by a local eQTL (Table 2). However, the only probe whose expression was regulated by a significant local eQTL in the cochlea was located on Chr. 17.

We determined whether any of the 27 genes implicated in our preliminary GWAS had a defined role in the inner ear. The associations on Chr. 2, 3 and 15 did not harbor known cochlear genes. Only NADPH oxidase 3 (*Nox3*) on Chr. 17 had been implicated in inner ear biology with mutants lacking otoconia in the utricular and saccular maculae [22] and its high expression in the inner ear [23].



## **Detailed analysis of the Chr 17 association highlights *Nox3* as a candidate gene.**

Of all genes at the chromosome 17 locus, one gene, *Tfblm*, had a significant ( $1.08 \times 10^{-6}$ ) eQTL (Fig 3). Of note, *Nox3*, the gene in which our peak GWAS SNP is located, does not have an eQTL in the cochlea; however, there was a clear demonstration [23] that *Nox3* is highly expressed (at least 50-fold higher than in any other tissues) in specific portions of the inner ear. Based on these data and the location of our peak GWAS SNP (rs33652818), we focused on *Nox3* as a plausible candidate gene for NIHL at the chromosome 17 locus.

### ***Nox3*<sup>het</sup> mice are more susceptible to NIHL.**

To directly test the hypothesis that *Nox3* was associated with susceptibility to NIHL we characterized previously generated *Nox3*<sup>het</sup> mice for pre- and post-noise exposure ABR thresholds and PTS after 4, 8, 12, 16, 24 and 32 kHz tone-burst stimuli. Consistent with our original GWAS finding, this analysis revealed a statistically significant reduction in the PTS in wild-type mice (C57BL/6JEtJ strain) compared to *Nox3*<sup>het/+</sup> and *Nox3*<sup>het/Nox3</sup><sup>het</sup> at 8 kHz (Fig 4). As a comparison, the effects of the peak SNP (rs33652818) at the *Nox3* locus on ABR at various frequencies is shown in Fig 5. Interestingly, there were significant differences as a function of genotype at both the 4 kHz and the 8kHz test frequencies, although the level of significance at 4 kHz ( $p=1.1 \times 10^{-4}$ ) is only suggestive (Fig S1) and does not reach genome-wide significance (Table 1). Thus, the significant and highly suggestive association of rs33652818 with ABR at 8 and 4 kHz, respectively, in the HMDP, as well as the frequency-specific

phenotype exhibited by the *Nox3<sup>het</sup>/Nox3<sup>het</sup>* mice, suggests that *Nox3* may be involved in NIHL at the lower end of the frequency spectrum.

For a detailed analysis of the entire auditory pathway, we next evaluated outer hair cell (OHC) activity using DPOAE and the inner hair cell (IHC) and neuronal responses by ABR wave I peak-to-peak amplitudes. Despite the absence of a statistically significant difference in DPOAE thresholds (Fig 6A) at 8, 16, 22 and 32 kHz, there was a pronounced difference at 8 kHz in the wave 1 ABR peak-to-peak amplitudes (Fig 6B).

The DPOAE (Fig 7A) suprathreshold amplitudes (dB SPL) and ABR wave 1 amplitudes ( $\mu$ V) (Fig 7B) for the 8 kHz tone burst were compared at different stimulus intensities. Both analyses demonstrated statistically significantly less noise damage in the wild-type in comparison to the heterozygous and mutant mice.

To confirm these electrophysiological findings, we collected cochleae from pre- and post-noise exposure *Nox3<sup>het</sup>* mice and wild-type. First, we assessed OHC loss throughout the entire cochlea by creating a cytochleogram (Fig 8A) of immunolabeled (Fig 8B) whole-mount organs of Corti to correlate with the DPOAE findings. Subsequently, the IHC afferent synaptic density (Fig 9) was analyzed as a marker of the neuronal responses (suprathreshold ABR wave 1 amplitude).

Despite the absence of a statistical significance in OHC loss, the *Nox3<sup>het/+</sup>* and *Nox3<sup>het</sup>/Nox3<sup>het</sup>* mice demonstrated a significantly reduced post-noise exposure density of synaptic ribbons (at the 8kHz tonotopic location).

# Discussion

## NIHL Genome-wide Association Study

We have, for the first time, used association analysis with correction for population structure to map several loci for hearing traits in inbred strains of mice. Our results identify a number of novel loci for susceptibility to NIHL. Additionally, our study demonstrates frequency-specific genetic susceptibilities to noise within the cochlea and the power of our GWAS to detect frequency-specific loci that are precisely recapitulated in a mutant mouse model.

Mouse GWAS has revolutionized the field of genetics and has led to the discovery of hundreds of genes that are involved in complex traits [24]. Our successful mapping largely came from the initial observation that there was a clear strain variation at all post noise exposure hearing phenotypes, reiterating the contribution of genetic factors to NIHL susceptibility. This wide distribution of phenotypes and genotypes facilitated our high-resolution genetic mapping.

We used a combined set of 64 classic inbred and recombinant inbred strains, a portion of the HMDP, as an extension of the classical inbred strain association. This increased the statistical power of the classical association studies by including a set of recombinant inbred strains in the mapping panel [25]. The HMDP provided significant statistical power and resolution to identify a locus for NIHL susceptibility that was precisely modeled in a mutant strain [26]. Although this panel is composed of 100 commercially available inbred strains, with roughly two-thirds of this panel we were able to map 5 loci, reflecting the power to detect loci with moderate effect. In addition to the power present in this resource, the resolution of this panel is, in some cases, two

orders of magnitude better than that achieved with linkage analysis, as we have recently demonstrated in our mouse GWAS for age-related hearing loss [27].

In an unprecedented manner, this new paradigm was applied to the first high-resolution mapping of candidate genes for NIHL susceptibility. Our GWAS generated significant associations in at least five loci at three different post-noise exposure stimulus frequencies, corresponding to a total 27 candidate genes. All of these candidate genes require adequate characterization, but the first gene to be validated by a genetic mutant mouse model was *Nox3*. *Nox3* was selected for further investigation based upon its relatively restricted expression in the cochleo-vestibular epithelium and spiral ganglion neurons [23].

### ***Nox3* and the Inner Ear.**

The *Nox3* gene was described in 2000 based upon its sequence similarity to other *Nox* isoforms (encodes an NADPH oxidase) [28]. The overall structure of *Nox3* is highly similar to that of *Nox1* and *Nox2* [29] and *Nox3* shares 56% amino acid with *Nox2* [30]. Encoded by *Nox3*, the six-transmembrane NADPH-binding protein interacts with a two-transmembrane protein (encoded by *Cyba*) and a cytosolic protein (encoded by *Noxo1*). This activation releases a functional NADPH oxidase complex that is able to transporting electrons across membranes towards oxygen ( $O_2$ ) generating superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ) and subsequent reactive oxygen species (ROS) [19].

First studies on the *Nox3* function were published in 2004 and generated the definition of *Nox3* as an NADPH oxidase of the inner ear [23][22]. Banfi, et al., performed analysis of *Nox3* distribution (real time PCR and *in situ* hybridization) and

reported high *Nox3* expression in the inner ear (cochlear/vestibular sensory epithelia and the spiral ganglion). Following exposure to cisplatin, HEK293 cells transfected with *Nox3* produced  $O_2^{\bullet-}$  spontaneously and generated a dramatic increase in  $O_2^{\bullet-}$  production [23]. Paffenholz et al. [22] reported that mutations of the *het* locus affect *Nox3* and that these head tilt mice (*het*) have impaired otoconial formation in the utricle and saccule resulting in balance defects, such as the inability to detect linear acceleration or gravity. Based upon this finding we chose to pursue interrogation of *Nox3*, a gene within our locus on Chr. 17.

Subsequent studies have established a role for the *Nox3* gene as the primary source of ROS generation in the cochlea, especially induced by cisplatin ototoxicity [31]. The knockdown of *Nox3* (pretreatment with siRNA) prevented cisplatin ototoxicity with preservation of hearing thresholds and hair cells. Also, it reduced the expression of *Nox3* and biomarkers of damage (TRPV1 and KIM-1) in cochlear tissues [32]. siRNA-mediated gene silencing of *Nox3* alleviated cisplatin-induced hearing loss in rats and reduced apoptosis of the sensory hair cells in the cochlea [33]. Although there was no similar evidence regarding NIHL, this key role for *Nox3* in the development of cisplatin ototoxicity confirming its role in regulatory mechanisms of cochlear damage encouraged us to validate this candidate gene for NIHL.

The only study exploring NIHL and the NOX family (including *Nox3*) was completed in rats [34]. This study did not indicate whether the *Nox3* gene decreased or increased the susceptibility to noise, but instead it evaluated *Nox3* expression levels after noise exposure. Some members of the NADPH oxidase family (*Nox1* and *Duox2*) were up-regulated in the rat cochlea after noise exposure, suggesting that these isoforms could be linked to cochlear injury. In contrast, the *Nox3* isoform was down-regulated after exposure to 100 dB SPL and 110 dB SPL by seven and fivefold respectively,

which could represent an endogenous protective mechanism against oxidative stress. This protective mechanism may have decreased the impact of the noise among wild-type rats by reducing the expression of *Nox3* and decreasing the difference related to mutants. However, the *in vivo* data was based on the use of a non-specific Nox inhibitor that targeted multiple members of this enzyme without conclusively demonstrating that *Nox3* plays a role in NIHL. Our study, by contrast, has used animal models with naturally occurring genetic variation and specific genetic perturbation of *Nox3* to directly implicate this oxidative stress enzyme in hearing.

According to our study, noise exposure might have an opposite effect to cisplatin on *Nox3* expression, suggesting differential involvement of *Nox3* on noise and cisplatin-induced cochlear damage. Based upon this literature we hypothesized that the absence or reduction of the *Nox3* gene product, responsible for the production of ROS in the cochlea, would reduce susceptibility to noise and were startled by our findings. A review of the literature shows there are several key protective mechanisms attributed to the Nox family of genes. These mechanisms include: host defense and inflammation (ROS-dependent killing, inactivation of microbial virulence factors, regulation of pH and ion concentration in the phagosome and anti-inflammatory activity), regulation of gene expression (TNF-alpha, TGF-beta1 and angiotensin II), cellular redox potential, cellular signaling (inhibition of phosphatases, activation of kinases, regulation of ion channels and Ca<sup>2+</sup> signaling), oxygen sensing (kidney, carotid body and lungs), biosynthesis, regulation of blood pressure, cell growth, angiogenesis, differentiation and senescence [30]. These protective mechanisms may very well play a role in the findings of susceptibility to NIHL in the wild-type animals.

### **Validation of *Nox3*'s role in NIHL.**

We were able to validate our frequency-specific GWAS findings in isolation by studying *Nox3*<sup>het</sup> mutant mice. After noise exposure there was a statistically significant difference between the wild-type mice in comparison to the homozygous mutants and the heterozygotes on several measures of auditory function specifically and solely after the 8 kHz exposure. Contrary to the initial expectations, the presence of the *Nox3* gene was clearly protective against noise damage. Also we were able to demonstrate the genotypic effect of the peak SNP at the same GWAS phenotype at 8 kHz. We also show genotypic effect on 4 kHz, but this finding was only suggestive in GWAS and not confirmed in *Nox3*<sup>het</sup> mutants.

We dissected this phenotype in detail physiologically by assessing OHC function using DPOAEs and IHC/auditory nerve function using ABR. Although there was no statistically significant difference in DPOAE thresholds amongst the genotypes, there was a marked difference in the amplitude of wave 1 of the ABR after suprathreshold stimulation with the 8 kHz tone burst. This suggested that the mechanism of hearing loss, in relation to *Nox3*, resided in the spiral ganglion neurons and likely at 8 kHz along the cochlear place map.

There are many genes differentially expressed along the tonotopic axis of the cochlea, and this has been shown for *Nox3* [35]. It is likely that our frequency specific finding of variation in susceptibility to NIHL is the result of this tonotopic expression pattern.

Considering that all of the results pointed to the area of 8 kHz, we initiated a thorough electrophysiological and histological dissection at this particular frequency. The evaluation of the DPOAEs and suprathreshold wave 1 ABR amplitudes was performed at multiple stimulus intensity levels. For each study, the wild-type were more

resistant to NIHL at only at 8 kHz. We performed immunohistochemistry two weeks after the noise exposure. Although the difference in OHC loss was not significant, we demonstrated a significantly higher density of synaptic ribbons in wild-type mice. Thus, the electrophysiological findings were verified by the immunohistochemistry, demonstrating that the presence of *Nox3* is protective at the neuronal level and that the sensory neural hearing loss after noise exposure occurred at this level of the peripheral auditory system.

The absence of differences in outer hair cell count was also verified by its corresponding electrophysiological measure of DPOAE thresholds. However, through the evaluation of DPOAE suprathreshold amplitudes, we were able to observe a statistically significant higher amplitude in the wild-type mice. These three different measures of the integrity of the outer hair cells (outer hair cell count, DPOAE thresholds and DPOAE suprathreshold amplitudes) have different sensitivity profiles to demonstrate the impact of noise. Probably DPOAE suprathreshold amplitude is the most sensitive measurement, since there is greater signal-noise ratio. This metric indicates that there is significantly less impact on the activity of the outer hair cells in wild-type mice.

### ***Nox3* Plays a Protective Role in the Cochlea of Mice.**

Although *Nox3* is associated with production of  $O_2^{\bullet-}$  in the inner ear, the *Nox* family has several physiological and potentially protective mechanisms. Definitely, this protective role explains the fact that the absence of *Nox3* increased susceptibility to NIHL in our mouse models. However, there is a lack of specific studies about the mechanisms of the *Nox3* gene due to this very focal expression in the inner ear and functional data on *Nox3* have been only gathered in overexpression systems [36]. Most



evidence regarding these mechanisms is derived from other isoforms, like *Nox2*, which is functionally similar to *Nox3* [29]. Thus, due to the limited literature, we relied on the other isoforms to formulate hypotheses about the mechanisms of susceptibility to NIHL.

Since ROS are commonly related to inflammation, an anti-inflammatory activity of NOX enzymes would seem illogical. However, over recent years there has been a striking number of publications pointing in the opposite direction. Most of the data about the anti-inflammatory activity of *Nox* enzymes comes from studies using mice deficient in the phagocyte NADPH oxidase *Nox2* as demonstrated by a decreased capacity to degrade phagocytized material in *Nox2*-deficient cells leading to the accumulation of debris [37]. Also, this hyperinflammation might be due to a lack of ROS-dependent signaling in *Nox2*-deficient phagocytes and ROS-dependent attenuation of Ca<sup>2+</sup> signaling contributing to enhanced inflammation. Lastly, impairment of oxidative inactivation of proinflammatory mediators leads to a prolongation of the inflammatory response [30].

Hyperinflammation in NADPH oxidase-deficient mice was demonstrated in mouse models of *Helicobacter* gastritis [38][39], arthritis [40], demyelinating disease [41], and sunburn [42]. In experimental lung influenza infection, *Nox2* deficient mice demonstrated larger inflammatory infiltrates [43]. Also, by studying endothelial dysfunction, the absence of *Nox4* resulted in reduction of endothelial nitric oxide synthase expression, nitric oxide production, and heme oxygenase-1 expression, which was associated with apoptosis and inflammatory activation [44].

There is mounting evidence that NOX enzymes have a role in limiting the inflammatory response and we have shown this to be true in noise-induced cochlear damage. This anti-inflammatory activity of NOX enzymes is poorly understood in the

cochlea. So far, as described in other isoforms, our initial hypothesis is that there are important protective mechanisms, such as an anti-inflammatory response resulting from noise exposure. This anti-inflammatory mechanism would be crucial to protect the cochlea against noise injury, overcoming its potential for damage caused by the release of ROS.

## Conclusion

In this manuscript we report the first functional validation of a gene of the auditory system arising from a GWAS. We demonstrate *Nox3* is involved in susceptibility to NIHL and mice deficient in *Nox3* are the most susceptible. This finding was specific to 8 kHz both physiologically (ABR threshold and DPOAE/ABR suprathreshold measures) and histologically at the level of the hair cell/auditory neuron synaptic ribbon. Our findings validate the power of the HMDP for detecting NIHL susceptibility genes and the tonotopic genetic susceptibilities present within the mouse cochlea.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the technical contributions of Robert Rainey and Litao Tao (USC). This research comprises Joel Lavinsky's doctoral dissertation. We thank Yesha W. Lundberg, PhD (Boys Town National Research Hospital) for providing *Nox3<sup>het</sup>* mice (*Nox3<sup>het</sup>/Nox3<sup>het</sup>* and *Nox3<sup>het</sup>/+*).

## References

1. Stucken EZ, Hong RS (2014) Noise-induced hearing loss: an occupational medicine perspective. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 22: 388–393. doi:10.1097/MOO.0000000000000079.
2. Dobie RA (2008) The burdens of age-related and occupational noise-induced hearing loss in the United States. *Ear Hear* 29: 565–577. doi:10.1097/AUD.0b013e31817349ec.
3. Yankaskas K (2013) Prelude: noise-induced tinnitus and hearing loss in the military. *Hear Res* 295: 3–8. doi:10.1016/j.heares.2012.04.016.
4. Sliwinska-Kowalska M, Pawelczyk M (2013) Contribution of genetic factors to noise-induced hearing loss: a human studies review. *Mutat Res* 752: 61–65. doi:10.1016/j.mrrev.2012.11.001.
5. Heinonen-Guzejev M, Vuorinen HS, Mussalo-Rauhamaa H, Heikkilä K, Koskenvuo M, et al. (2005) Genetic component of noise sensitivity. *Twin Res Hum Genet Off J Int Soc Twin Stud* 8: 245–249. doi:10.1375/1832427054253112.
6. Erway LC, Shiau YW, Davis RR, Krieg EF (1996) Genetics of age-related hearing loss in mice. III. Susceptibility of inbred and F1 hybrid strains to noise-induced hearing loss. *Hear Res* 93: 181–187.
7. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Flood DG, Reaume AG, et al. (1999) Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (Sod1) increases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Audiol Neurootol* 4: 237–246. doi:13847.

8. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Lear PM, Ho YS (2000) Targeted mutation of the gene for cellular glutathione peroxidase (Gpx1) increases noise-induced hearing loss in mice. *J Assoc Res Otolaryngol JARO* 1: 243–254.
9. 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.
10. Holme RH, Steel KP (2004) 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* 5: 66–79. doi:10.1007/s10162-003-4021-2.
11. Bennett BJ, Farber CR, Orozco L, Kang HM, Ghazalpour A, et al. (2010) A high-resolution association mapping panel for the dissection of complex traits in mice. *Genome Res* 20: 281–290. doi:10.1101/gr.099234.109.
12. Farber CR, Bennett BJ, Orozco L, Zou W, Lira A, et al. (2011) Mouse genome-wide association and systems genetics identify *Asxl2* as a regulator of bone mineral density and osteoclastogenesis. *PLoS Genet* 7: e1002038. doi:10.1371/journal.pgen.1002038.
13. Park CC, Gale GD, de Jong S, Ghazalpour A, Bennett BJ, et al. (2011) Gene networks associated with conditional fear in mice identified using a systems genetics approach. *BMC Syst Biol* 5: 43. doi:10.1186/1752-0509-5-43.
14. Smolock EM, Ilyushkina IA, Ghazalpour A, Gerloff J, Murashev AN, et al. (2012) Genetic locus on mouse chromosome 7 controls elevated heart rate. *Physiol Genomics* 44: 689–698. doi:10.1152/physiolgenomics.00041.2012.

15. Davis RC, van Nas A, Bennett B, Orozco L, Pan C, et al. (2013) Genome-wide association mapping of blood cell traits in mice. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 24: 105–118. doi:10.1007/s00335-013-9448-0.
16. Kujawa SG, Liberman MC (2009) Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29: 14077–14085. doi:10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009.
17. White CH, Ohmen JD, Sheth S, Zebboudj AF, McHugh RK, et al. (2009) Genome-wide screening for genetic loci associated with noise-induced hearing loss. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 20: 207–213. doi:10.1007/s00335-009-9178-5.
18. Kang HM, Zaitlen NA, Wade CM, Kirby A, Heckerman D, et al. (2008) Efficient control of population structure in model organism association mapping. *Genetics* 178: 1709–1723. doi:10.1534/genetics.107.080101.
19. Flaherty JP, Fairfield HE, Spruce CA, McCarty CM, Bergstrom DE (2011) Molecular characterization of an allelic series of mutations in the mouse *Nox3* gene. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 22: 156–169. doi:10.1007/s00335-010-9309-z.
20. Zhao X, Jones SM, Yamoah EN, Lundberg YW (2008) Otoconin-90 deletion leads to imbalance but normal hearing: a comparison with other otoconia mutants. *Neuroscience* 153: 289–299. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.055.
21. Müller M, von Hünenbein K, Hoidis S, Smolders JWT (2005) A physiological place-frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse. *Hear Res* 202: 63–73. doi:10.1016/j.heares.2004.08.011.

22. Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, et al. (2004) Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev* 18: 486–491. doi:10.1101/gad.1172504.
23. Bánfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, et al. (2004) NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem* 279: 46065–46072. doi:10.1074/jbc.M403046200.
24. Civelek M, Lusk AJ (2014) Systems genetics approaches to understand complex traits. *Nat Rev Genet* 15: 34–48. doi:10.1038/nrg3575.
25. Flint J, Eskin E (2012) Genome-wide association studies in mice. *Nat Rev Genet* 13: 807–817. doi:10.1038/nrg3335.
26. Ghazalpour A, Rau CD, Farber CR, Bennett BJ, Orozco LD, et al. (2012) Hybrid mouse diversity panel: a panel of inbred mouse strains suitable for analysis of complex genetic traits. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 23: 680–692. doi:10.1007/s00335-012-9411-5.
27. Ohmen J, Kang EY, Li X, Joo JW, Hormozdiari F, et al. (2014) Genome-wide association study for age-related hearing loss (AHL) in the mouse: a meta-analysis. *J Assoc Res Otolaryngol JARO* 15: 335–352. doi:10.1007/s10162-014-0443-2.
28. Kikuchi H, Hikage M, Miyashita H, Fukumoto M (2000) NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene* 254: 237–243.
29. Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD (2001) Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 269: 131–140.

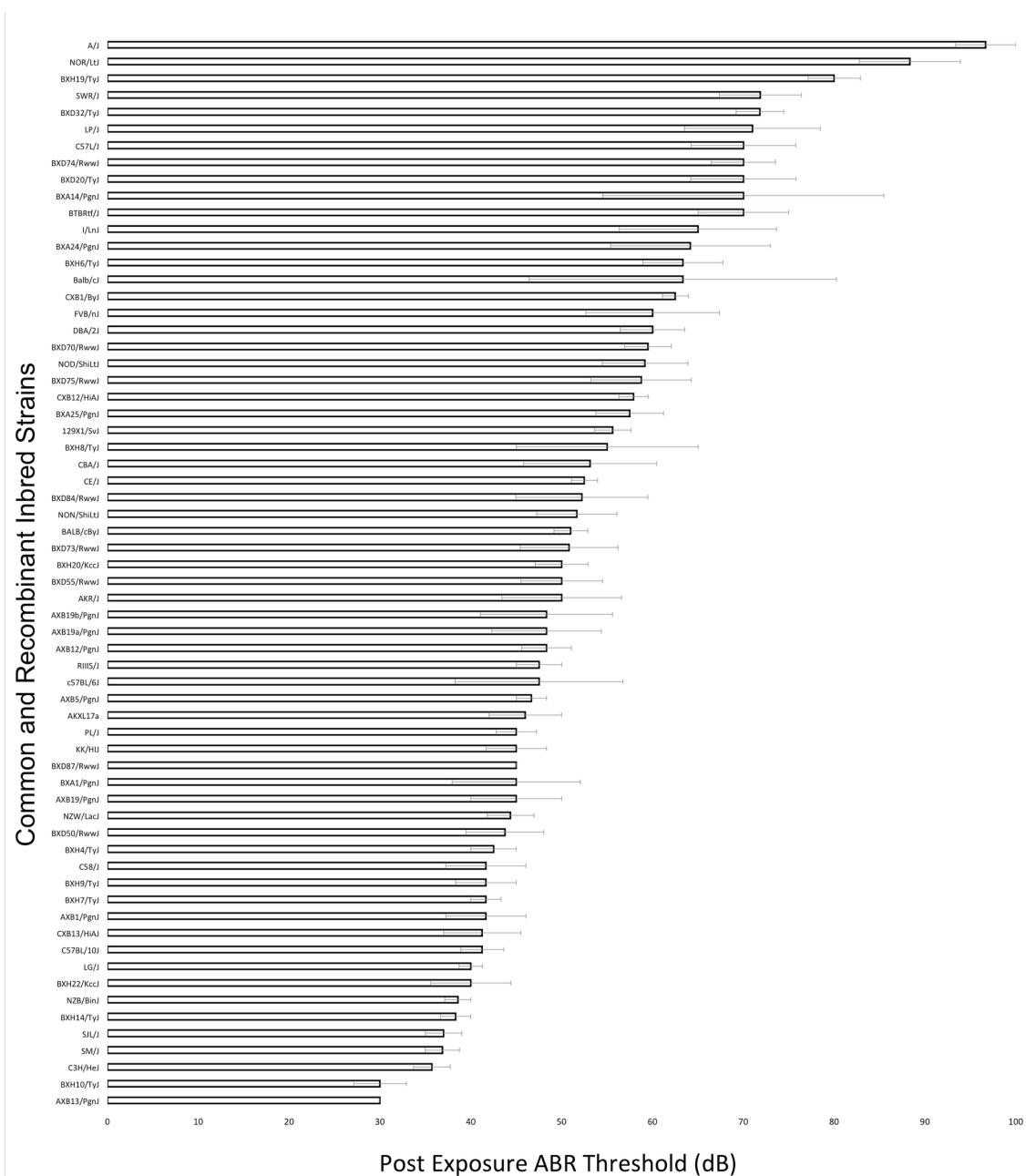
30. Bedard K, Krause K-H (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245–313. doi:10.1152/physrev.00044.2005.
31. Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Kaur T, Ramkumar V (2012) siRNA-mediated knock-down of NOX3: therapy for hearing loss? *Cell Mol Life Sci CMLS* 69: 2429–2434. doi:10.1007/s00018-012-1016-3.
32. Mukherjea D, Whitworth CA, Nandish S, Dunaway GA, Rybak LP, et al. (2006) Expression of the kidney injury molecule 1 in the rat cochlea and induction by cisplatin. *Neuroscience* 139: 733–740. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.12.044.
33. Mukherjea D, Jajoo S, Kaur T, Sheehan KE, Ramkumar V, et al. (2010) Transtympanic administration of short interfering (si)RNA for the NOX3 isoform of NADPH oxidase protects against cisplatin-induced hearing loss in the rat. *Antioxid Redox Signal* 13: 589–598. doi:10.1089/ars.2010.3110.
34. Vljakovic SM, Lin SC-Y, Wong ACY, Wackrow B, Thorne PR (2013) Noise-induced changes in expression levels of NADPH oxidases in the cochlea. *Hear Res* 304: 145–152. doi:10.1016/j.heares.2013.07.012.
35. Son EJ, Wu L, Yoon H, Kim S, Choi JY, et al. (2012) Developmental gene expression profiling along the tonotopic axis of the mouse cochlea. *PloS One* 7: e40735. doi:10.1371/journal.pone.0040735.
36. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K (2014) Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med*. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046.

37. Brown JR, Goldblatt D, Buddle J, Morton L, Thrasher AJ (2003) Diminished production of anti-inflammatory mediators during neutrophil apoptosis and macrophage phagocytosis in chronic granulomatous disease (CGD). *J Leukoc Biol* 73: 591–599.
38. Blanchard TG, Yu F, Hsieh C-L, Redline RW (2003) Severe inflammation and reduced bacteria load in murine helicobacter infection caused by lack of phagocyte oxidase activity. *J Infect Dis* 187: 1609–1615. doi:10.1086/374780.
39. Keenan JI, Peterson RA, Hampton MB (2005) NADPH oxidase involvement in the pathology of *Helicobacter pylori* infection. *Free Radic Biol Med* 38: 1188–1196. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.12.025.
40. Olofsson P, Holmberg J, Tordsson J, Lu S, Akerström B, et al. (2003) Positional identification of *Ncf1* as a gene that regulates arthritis severity in rats. *Nat Genet* 33: 25–32. doi:10.1038/ng1058.
41. Hultqvist M, Olofsson P, Holmberg J, Bäckström BT, Tordsson J, et al. (2004) Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the *Ncf1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12646–12651. doi:10.1073/pnas.0403831101.
42. Komatsu J, Koyama H, Maeda N, Aratani Y (2006) Earlier onset of neutrophil-mediated inflammation in the ultraviolet-exposed skin of mice deficient in myeloperoxidase and NADPH oxidase. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al* 55: 200–206. doi:10.1007/s00011-006-0071-3.
43. Snelgrove RJ, Edwards L, Rae AJ, Hussell T (2006) An absence of reactive oxygen species improves the resolution of lung influenza infection. *Eur J Immunol* 36: 1364–1373. doi:10.1002/eji.200635977.

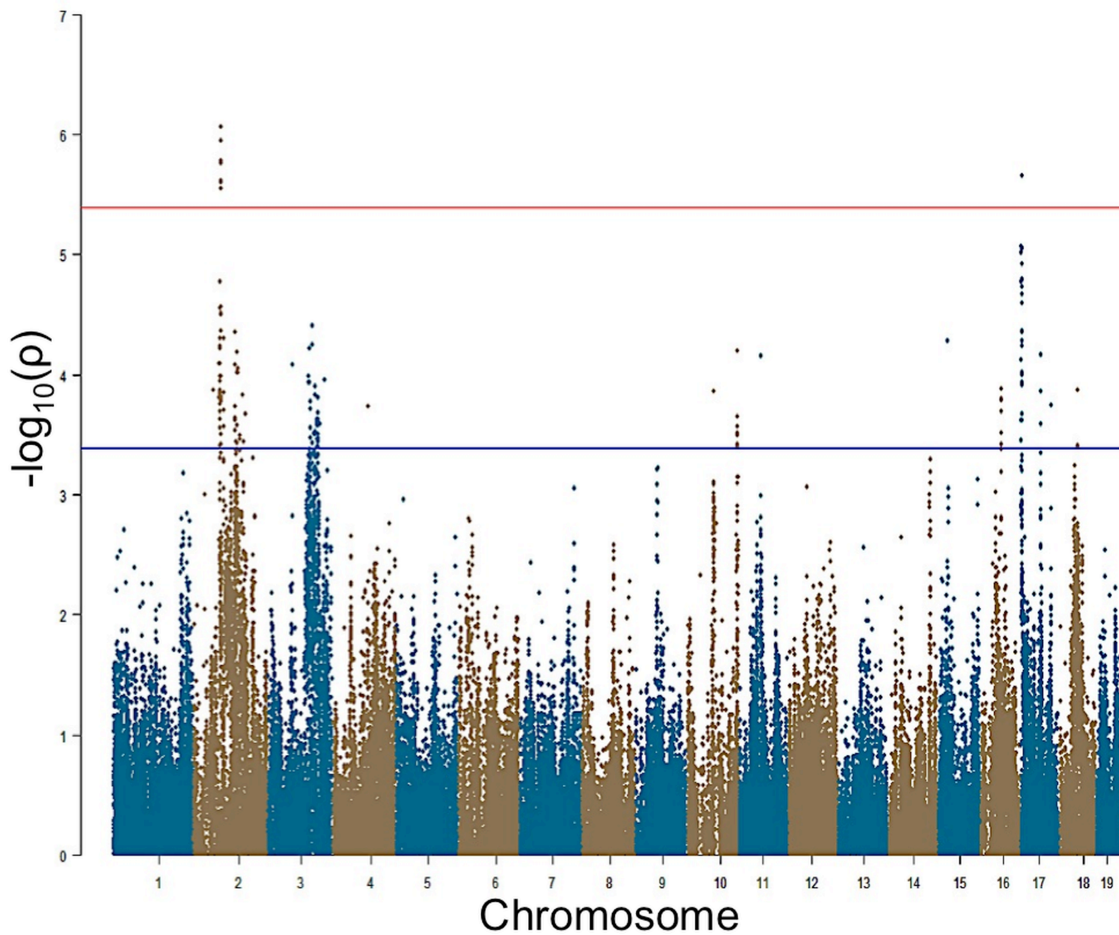


44. Schröder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, et al. (2012) Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ Res* 110: 1217–1225. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.267054.

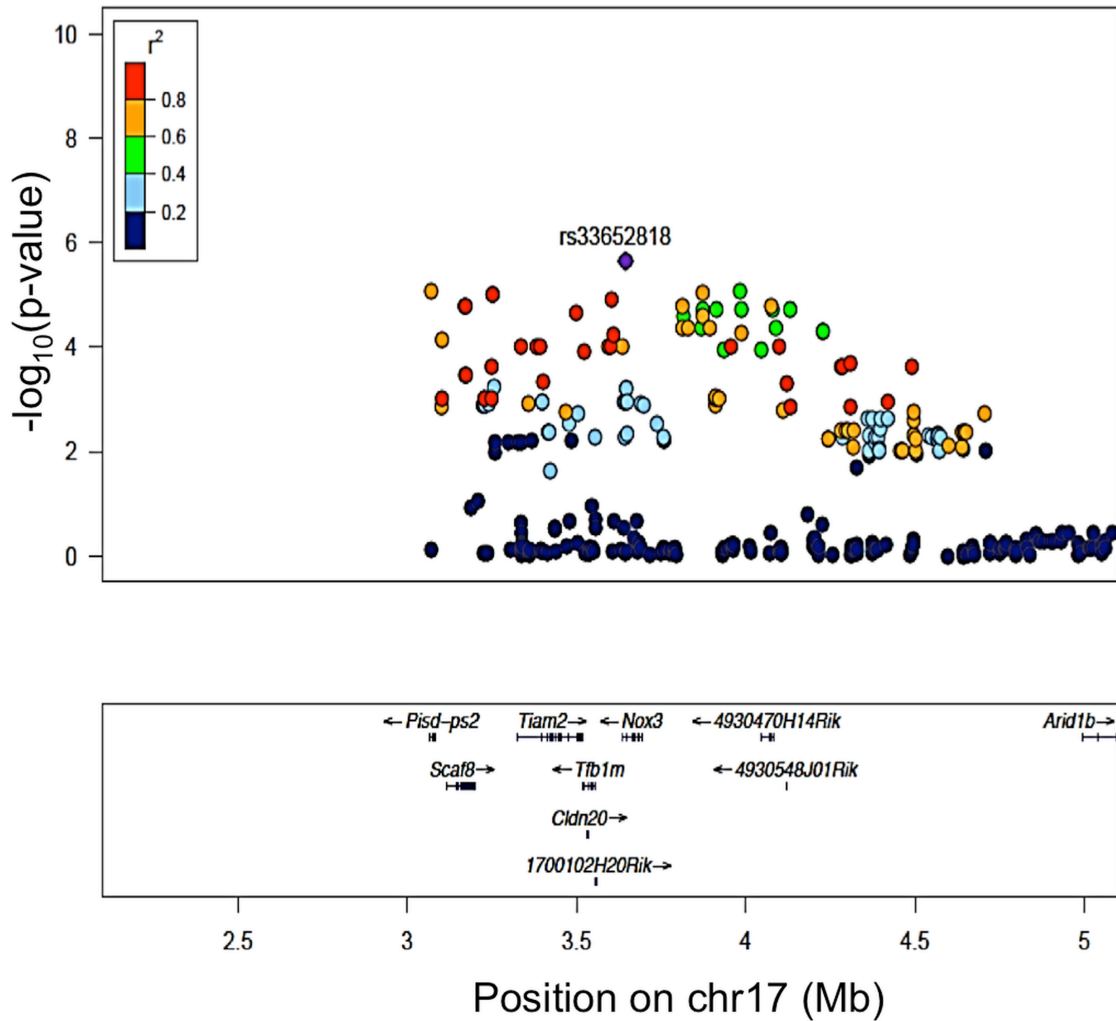
# Figure Legends



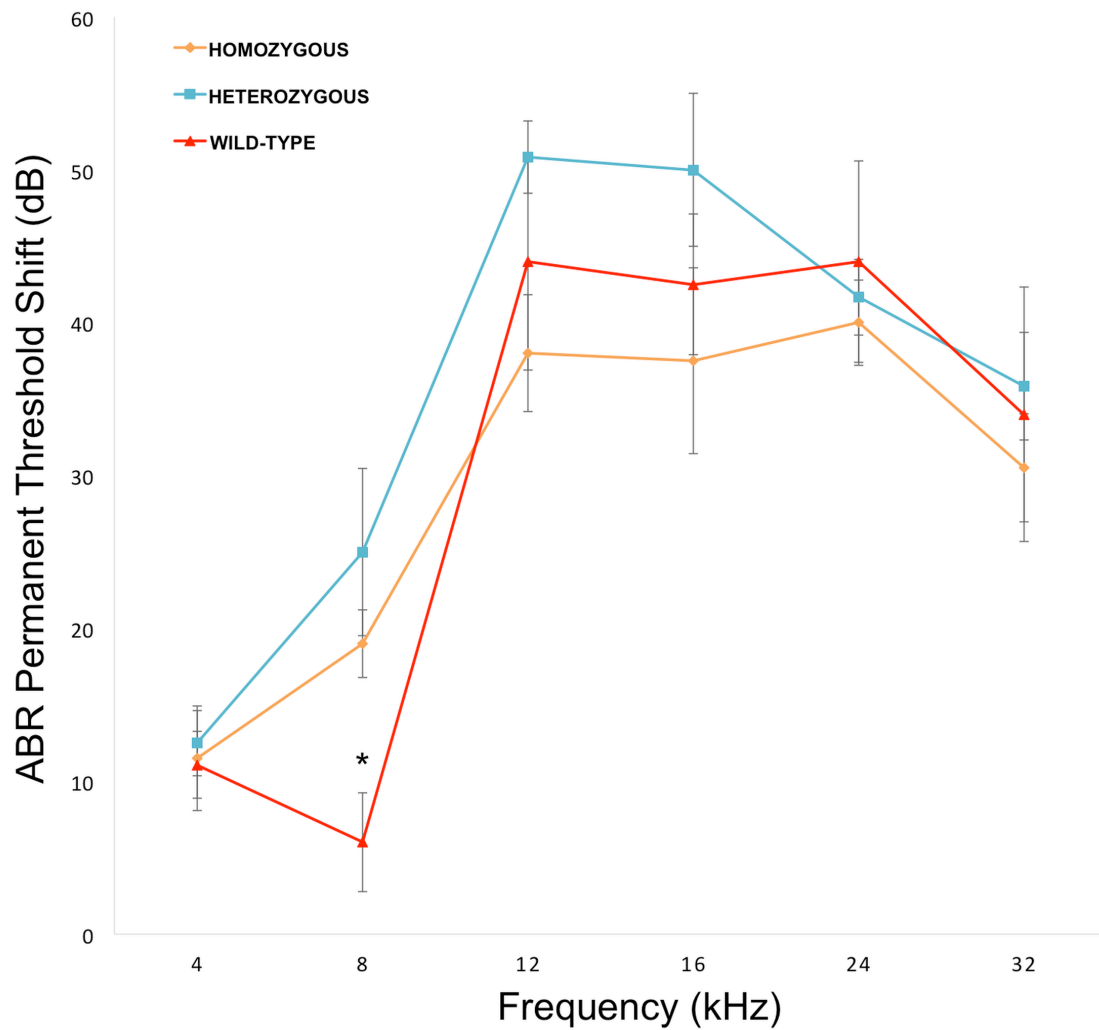
**Figure 1. Characterization of post-exposure thresholds in the HMDP.** Mean  $\pm$  SEM for 8 kHz post-noise exposure hearing thresholds in 64 HMDP inbred mouse strains. The difference between the strains with the lowest and the highest values were 3.22-fold.



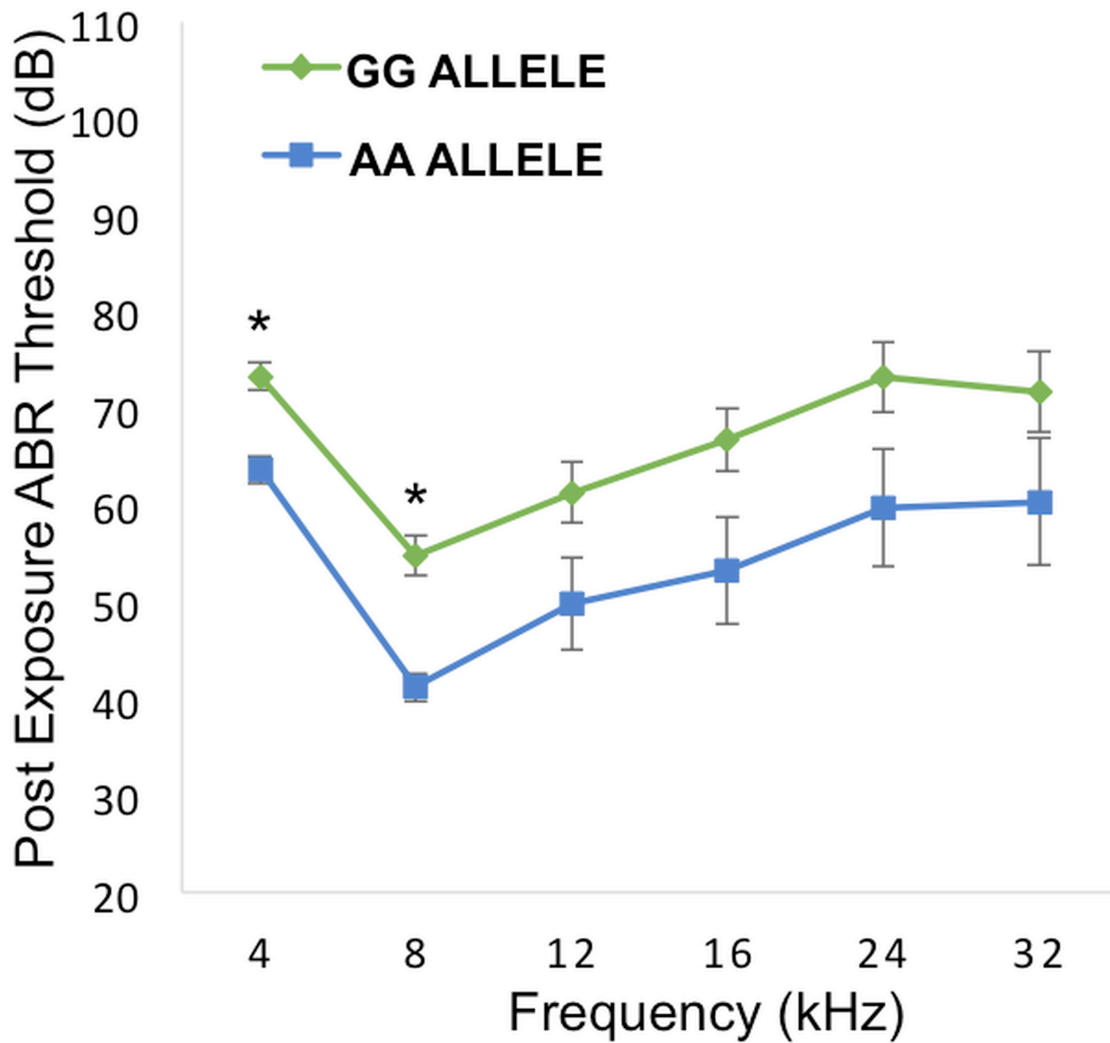
**Figure 2. GWAS results for post-noise exposure thresholds in the HMDP.** Manhattan plot showing the association ( $-\log_{10}$ ) p-values ( $-\log P$ ) for 8 kHz in 64 HMDP inbred mouse strains. The analysis was performed using 108,064 SNPs with a minor allele frequency  $> 5\%$ . Each chromosome is plotted on the x-axis in alternating brown and blue colors. SNPs on Chr. 2 and Chr. 17 for 8 kHz exceeded the predetermined genome-wide significance threshold ( $-\log P = 5.39$ ).



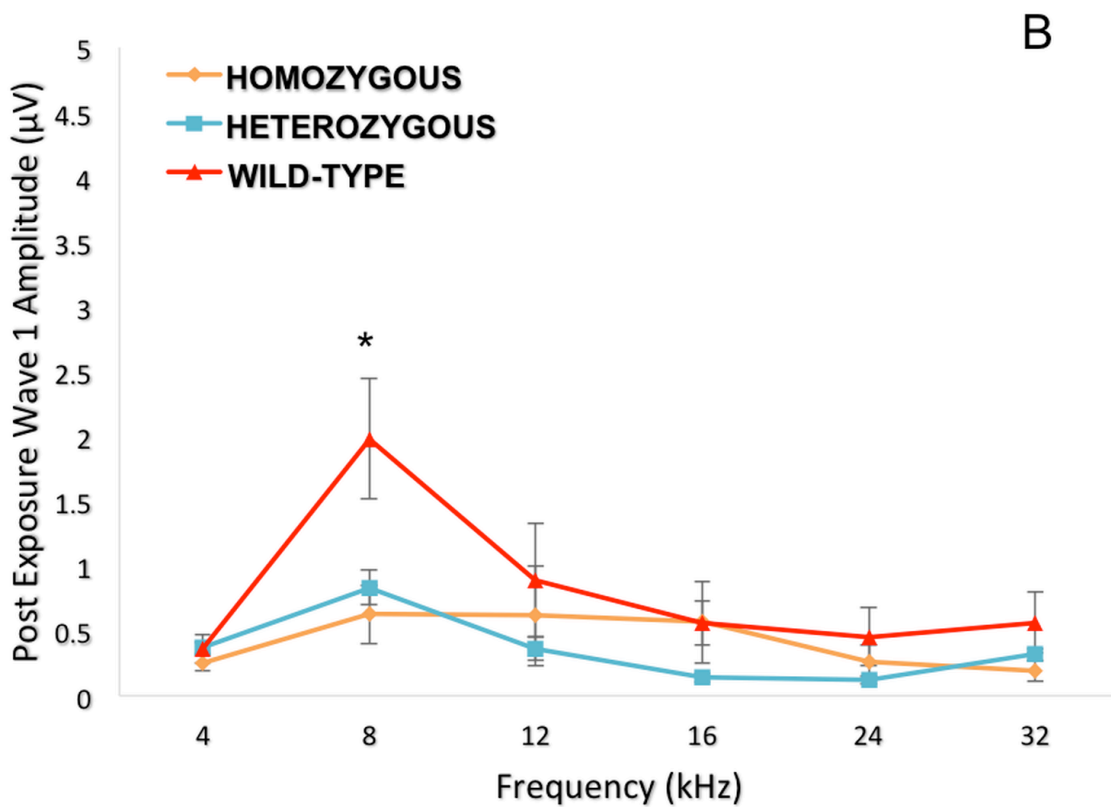
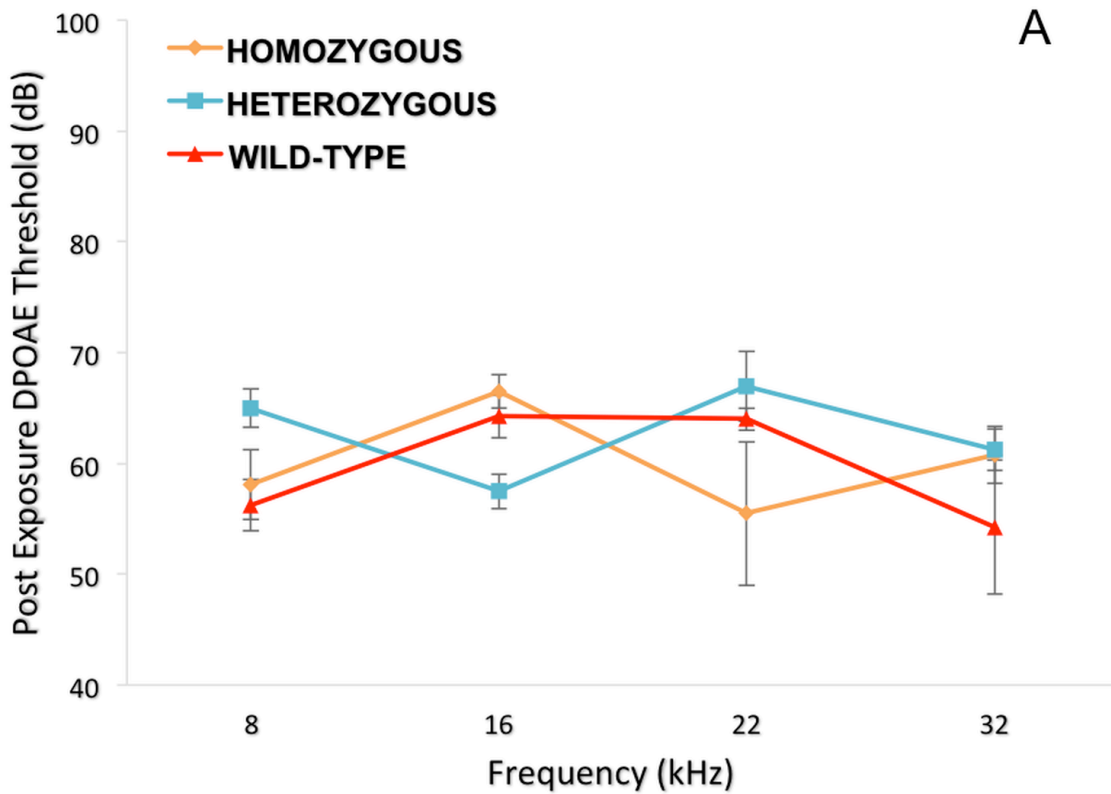
**Figure 3. Regional plot of the 8 kHz ABR post noise-exposure at Chr 17 association in the HMDP centered on the lead SNP at the *Nox3* locus (rs33652818).** The blue diamond represents the most significant SNP ( $p = 9.63\text{E-}06$ ) and SNPs are colored based on their LD with the most significant SNP being: red SNPs in LD at  $r^2 > 0.8$ , orange SNPs in LD at  $r^2 > 0.6$  and green SNPs in LD at  $r^2 > 0.4$ . The positions of all RefSeq genes are plotted using genome locations (NCBI's Build37 genome assembly).



**Figure 4.  $Nox3^{het}$  mice have greater PTS (permanent threshold shift) for 8 kHz.**  $Nox3^{het}/Nox3^{het}$  and  $Nox3^{het}/+$  display significantly greater PTS in comparison to wild-type controls. Data shown are mean comparisons analyzed by one-way ANOVA (post hoc Tukey test for multiple comparisons). \* $p < 0.05$ . Homozygous =  $Nox3^{het}/Nox3^{het}$ ; Heterozygous =  $Nox3^{het}/+$ ; Wild-type = C57BL/6JEiJ strain.



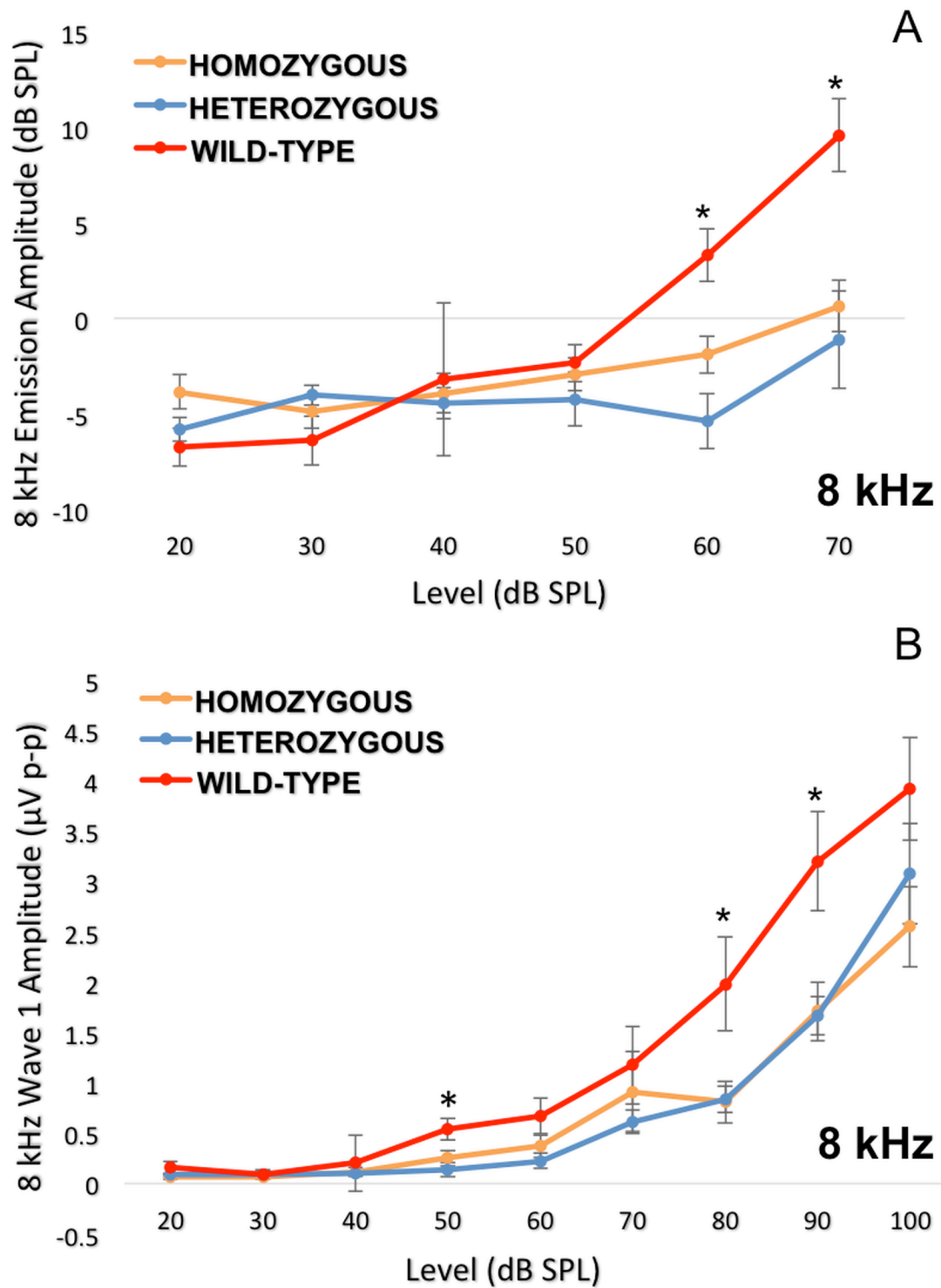
**Figure 5. Genotypic effects of the peak SNP (rs33652818) at the *Nox3* locus.** Comparison between alleles GG and AA across the various frequencies. There is a statistically significant difference between the alleles at 4 and 8 kHz. \* = p value < 0.001. Error bars +/- 1 SE.



**Figure 6. Topographical analysis of the auditory pathway at different frequencies (post-noise exposure).** Although no significant difference was seen for the DPOAE

thresholds (6A), the wild-type controls show a higher wave 1 amplitude ( $p = 0.010$ ) only at 8 kHz compared to  $Nox3^{het/+}$  and  $Nox3^{het}/Nox3^{het}$  (6B). One-way ANOVA (Tukey test for multiple comparisons). \* =  $p < 0.05$ . Homozygous =  $Nox3^{het}/Nox3^{het}$ : Heterozygous =  $Nox3^{het}/+$  : Wild-type = C57BL/6JEiJ strain.

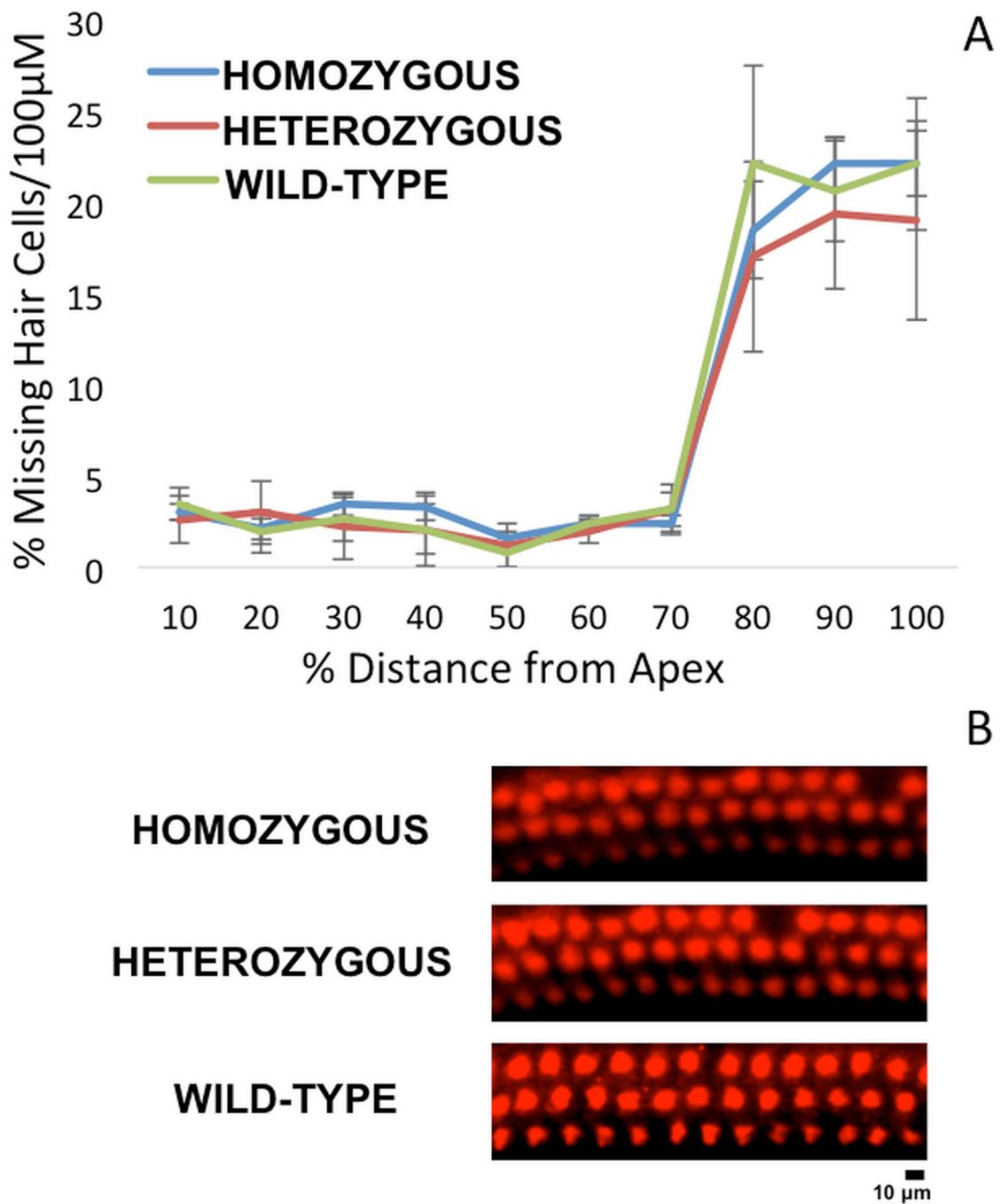




**Figure 7. Detailed analysis of the 8 kHz frequency stimulus.** Dissection of the 8 kHz frequency by DPOAE I/O function (7A) and ABR wave 1 amplitudes (7B) consistently indicate more impairment in the *Nox3<sup>het</sup>/Nox3<sup>het</sup>* and *Nox3<sup>het</sup>/+* than wild-type. One-way

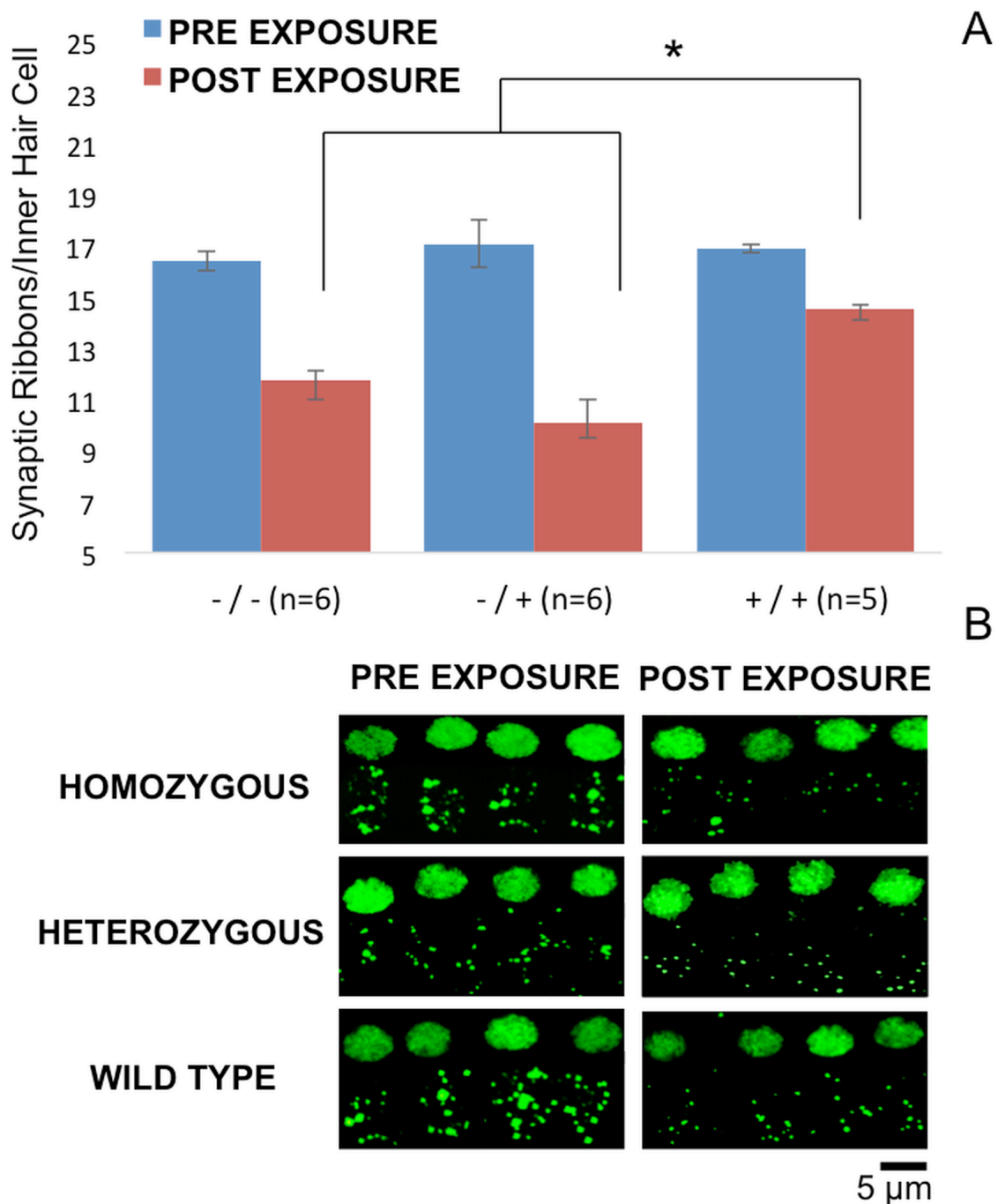
ANOVA (Tukey multiple comparisons). \* =  $p < 0.05$ . Homozygous =  $Nox3^{het}/Nox3^{het}$ .

Heterozygous =  $Nox3^{het}/+$  : Wild-type = C57BL/6JEiJ strain.



**Figure 8.** Cytocochleogram of wild-type and mutant *Nox3* mice (8A). No significant difference in OHC counts were detected among wild-type, *Nox3<sup>het/+</sup>* and *Nox3<sup>het/Nox3<sup>het</sup></sup>*. OHC preparations of immunostained (40x) post-noise exposure cochleae (8B) at the 8 kHz tonotopic location (red, rabbit anti-myosin6) demonstrate a

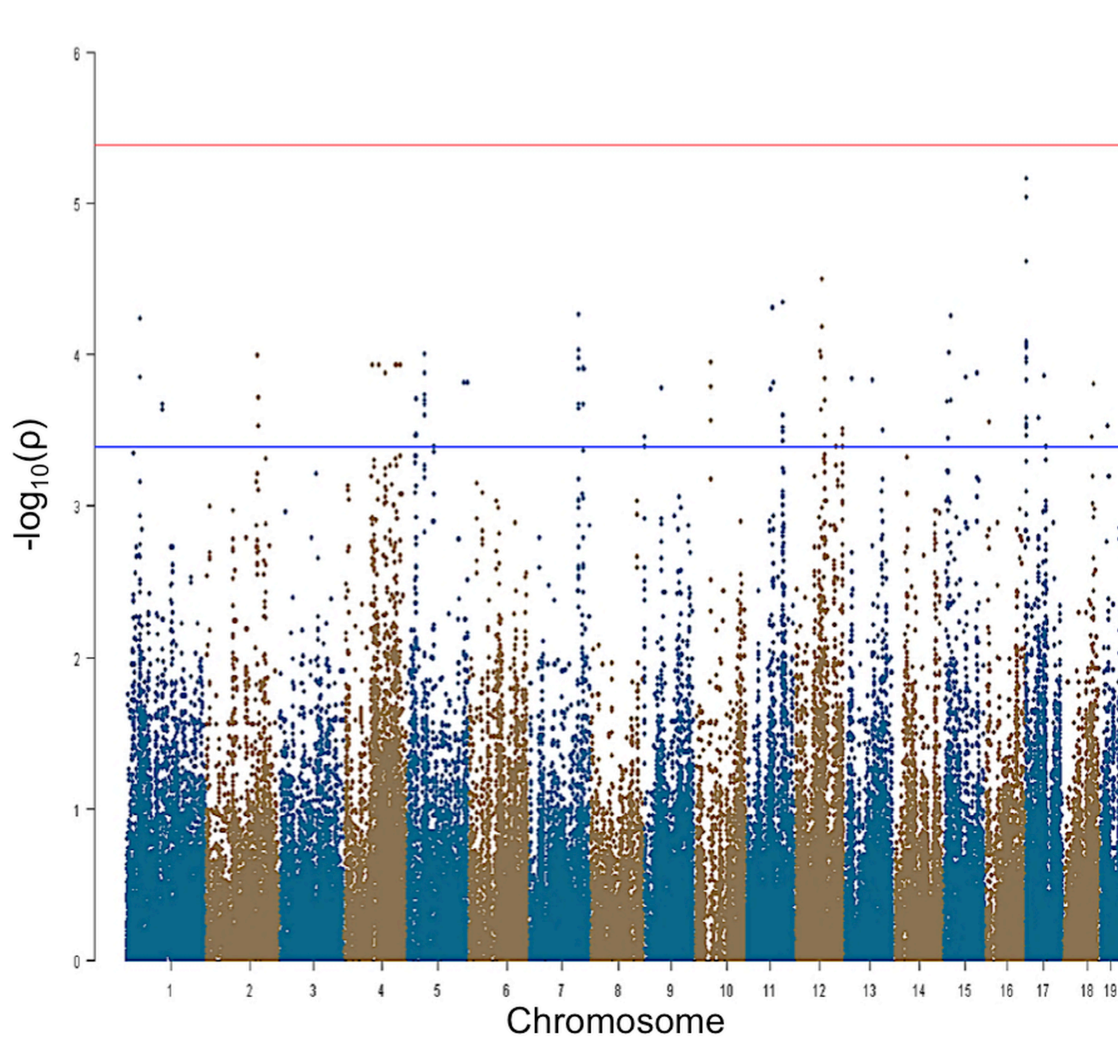
small impact with the loss of apical OHC (2 weeks post-noise exposure). Homozygous  
=  $Nox3^{het}/Nox3^{het}$ : Heterozygous =  $Nox3^{het}/+$ : Wild-type = C57BL/6JEiJ strain.



**Figure 9. 8 kHz Synaptic Cochleogram.** Synaptic ribbon count measured at the 8 kHz tonotopic position within the cochlea. Despite the absence of a statistical difference in OHC counts, the wild-type mice demonstrated significantly greater post-noise exposure synaptic ribbon density per IHC (9A). Projections (60x, 3x zoom, oil immersed) of confocal stacks (9B) of immunostained pre and post-noise exposure mouse IHC

synaptic ribbons (green, mouse anti-CtBP2). -/- = *Nox3<sup>het</sup>/Nox3<sup>het</sup>*; -/+ = *Nox3<sup>het</sup>/+*; +/+ = wild-type.

## Supporting Information



**Figure S1. GWAS results for 4 kHz post-noise exposure thresholds in the HMDP.**

Manhattan plot showing the association ( $-\log_{10}$ ) p-values ( $-\log P$ ) for 4 kHz in 64 HMDP inbred mouse strains. The analysis was performed using 108,064 SNPs with a minor allele frequency  $> 5\%$ . The level of significance at 4 kHz (rs33652818) is suggestive and does not reach genome-wide significance ( $p=1.1 \times 10^{-4}$ ).

## Tables

**Table 1. GWA results for NIHL in the HMDP.**

Trait <sup>a</sup>	Chr	SNP	Position (Mb) <sup>b</sup>	-logP	MAF <sup>c</sup>	No. of Genes <sup>d</sup>	Human Region (Chr: Start Mb – End Mb)
4 kHz	17	rs33652818	3.8	1.1E -04	0.222	10	Chr6:155.0-155.7
8 kHz	2	rs27972902	68.1	8.58E-07*	0.222	2	Chr2:168.8-169.6
8 kHz	17	rs33652818	3.8	2.25E-06*	0.222	10	Chr6:155.0-155.7
16 kHz	15	rs32934144	28.2	1.74E-06*	0.389	2	Chr5:13.6-14.8
32 kHz	3	rs30795209	96.7	1.95E-07*	0.278	11	Chr1:145.6-147.4
32 kHz	15	rs32278602	22.3	5.86E-07*	0.389	2	Chr5:19.4-22.2

<sup>a</sup>Post noise-exposure hearing thresholds in different frequencies.

<sup>b</sup>Locations based on genome assembly (NCBI's Build37)

<sup>c</sup>MAF, minor allele frequency

<sup>d</sup>Number of RefSeq genes (NCBI's Build37 assembly) located in the mouse association confidence interval (2.6 Mb)

\* Genome-wide significant ( $p < 4.1E-6$ )

**Table 2. Genes within NIHL 5 association peaks regulated by local eQTL in the cochlea.**

Gene	RefSeq	Chr	txStart (bp) <sup>a</sup>	txEnd (bp) <sup>b</sup>	Local eQTL P <sup>c</sup>
<b>Pias3</b>	ILMN_2631014	3	96696384	96706070	6.78E-02
<b>CD160</b>	ILMN_2707181	3	96798763	96829351	1.49E-02
<b>Gja8</b>	ILMN_2625168	3	96918863	96926020	3.09E-01
<b>Gja5</b>	ILMN_2678477	3	97032416	97053634	4.07E-01
<b>Tiam2</b>	ILMN_2836875	17	3326573	3519397	3.71E-01



<b>Tfb1m</b>	ILMN_2690441	17	3519263	3557713	1.08E-06
--------------	--------------	----	---------	---------	----------

<sup>a</sup>txStart, location of transcription (NCBI Build37 genome assembly) start.

<sup>b</sup>txEnd, location of transcription (NCBI Build37 genome assembly) end.

<sup>c</sup>Statistically significant p value  $\leq 5.1E-04$  (Bonferroni corrected for the number of probes tested)



## 6. VERSÃO DO ARTIGO EM LÍNGUA PORTUGUESA

# **Estudo de associação do genoma inteiro identifica *Nox3* como um gene crítico para a susceptibilidade à perda auditiva induzida por ruído.**

## **Resumo**

Nos Estados Unidos, aproximadamente 10% da população é exposta diariamente a níveis perigosos de ruído no ambiente de trabalho. Estudos com gêmeos estimam que a herdabilidade para a perda auditiva induzida por ruído (PAIR) é de aproximadamente 36%, e tem sido demonstrada variação da sensibilidade ao ruído em linhagens específicas de camundongos. Devido à dificuldade inerente do estudo da PAIR em humanos, optou-se por estudar esse traço complexo em camundongos. Camundongos do *Hybrid Mouse Diversity Panel* (HMDP) com 5 semanas de idade foram expostos a um ruído de banda na oitava de 10 kHz por 2 horas a 108 dB. A mudança permanente no limiar foi avaliada após 2 semanas da exposição ao ruído, através de estímulos com frequência-específica. Esses dados foram então aplicados em um estudo de associação do genoma inteiro através do *Efficient Mixed Model Analysis* (EMMA) a fim de controlar para estrutura populacional. Neste manuscrito será descrito o estudo de associação do genoma inteiro com ênfase num pico de associação significativo para susceptibilidade à PAIR. Esse pico está no cromossomo 17 e em um bloco de haplótipo contendo a NADPH oxidase-3 (*Nox3*). Esse pico foi

detectado em um fenótipo com estímulo de 8 kHz (*tone-burst*). Os mutantes homozigotos e os heterozigotos *Nox3* foram então testados para validar o achado identificado no estudo de associação do genoma inteiro. Os mutantes e heterozigotos demonstraram uma maior susceptibilidade à PAIR, especialmente em 8 kHz, tanto através das medidas de emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPD) quanto por potenciais evocados auditivos de tronco cerebral (PEATE). Foi demonstrado por imuno-histoquímica que essa sensibilidade reside nas bandas sinápticas cocleares dos animais mutantes, especialmente em 8 kHz. Este é o primeiro estudo de associação do genoma inteiro para PAIR em camundongos e demonstra o poder dessa estratégia em identificar, de forma tonotópica, a susceptibilidade genética à PAIR.

## **Resumo do Autor**

A perda auditiva induzida por ruído (PAIR) é a causa mais comum de doença relacionada ao trabalho no mundo e a segunda causa de perda auditiva. Embora diversos estudos de associação tenham sido conduzidos em humanos na busca de genes candidatos à PAIR, esses estudos apresentam baixo poder estatístico, não são replicados e consideram somente uma fração do risco genético. Com base nas perspectivas e nos sucessos dos estudos de associação em humanos, diversos grupos têm proposto estudos de associação do genoma inteiro com camundongos. O ambiente pode ser cuidadosamente controlado, facilitando o estudo de traços complexos, como a PAIR. Neste manuscrito, será descrita, pela primeira vez, uma análise da associação com correção da estrutura populacional para o mapeamento de diversos *loci* envolvidos com a susceptibilidade à PAIR, sendo utilizadas linhagens de camundongos consanguíneos. O *Nox3* foi identificado como o gene associado

com a susceptibilidade à PAIR. Além disso, demonstrou-se que a susceptibilidade genética é frequência-específica e ocorre ao nível das bandas sinápticas cocleares.

## Introdução

A PAIR é a líder mundial no risco à saúde ocupacional em países industrializados e a segunda forma mais comum de deficiência auditiva neurossensorial, após a presbiacusia (1). Nos Estados Unidos, aproximadamente 10% da população total é exposta, diariamente, a níveis perigosos de ruído no ambiente de trabalho (2). O ambiente de trabalho mais extremo para o desenvolvimento da PAIR é nas Forças Armadas. De acordo com o *Department of Veterans Affairs*, a perda auditiva é a seqüela mais comum entre as tropas americanas no Oriente Médio. O impacto financeiro dessas reivindicações por seqüelas auditivas é progressivo e, provavelmente, continuará crescendo. De acordo com a *American Tinnitus Association* ([www.ata.org](http://www.ata.org)), espera-se que o número de pedidos de auxílio por seqüelas auditivas aumente 18% ao ano, gerando um custo total de US\$ 1,2 bilhões por ano (3). O risco poderia ser reduzido através de um melhor entendimento dos processos biológicos que modulam a susceptibilidade ao ruído danoso. Acredita-se que a PAIR é uma doença complexa que resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais. Está bem estabelecido que pessoas expostas ao ruído de forma semelhante apresentam variação no grau de perda auditiva, indicando um componente genético (4). Estudos com gêmeos estimam que a herdabilidade da PAIR seja de aproximadamente 36% (5).

A descoberta das interações entre o gene e o ambiente nas doenças humanas, como na susceptibilidade à PAIR, apresenta muitas dificuldades inerentes, especialmente, no controle da exposição. Embora diversos estudos de associação de genes candidatos para PAIR em humanos tenham sido conduzidos, esses estudos

apresentam baixo poder estatístico, não são replicados e consideram somente uma fração do risco genético. Além disso, nenhum estudo de herdabilidade foi realizado, já que é praticamente impossível coletar dados de famílias em que todos os indivíduos tenham sido expostos a condições idênticas de ruído.

A base genética da PAIR tem sido claramente demonstrada em animais, já que diferentes linhagens de camundongos consanguíneos apresentam diferentes susceptibilidades ao ruído (4). Algumas linhagens de camundongos (C57BL/6J) que apresentam perda auditiva relacionada à idade, também se mostraram mais susceptíveis ao ruído que outras linhagens (6). Além disso, diversos camundongos mutantes, como SOD1<sup>-/-</sup> (7), GPX1<sup>-/-</sup> (8) e PMCA2<sup>-/-</sup> (9)(10), se mostraram ser mais sensíveis ao ruído do que o tipo selvagem. O camundongo tem sido um modelo animal essencial para estudos em perda auditiva. Os avanços na genética dos camundongos, incluindo o sequenciamento do genoma e o mapa altamente denso de polimorfismos de base única (SNPs), têm gerado um sistema adequado para o estudo de um traço complexo como a PAIR (6). A identificação de novos genes é crucial para a descoberta de novas vias e redes de genes. Isso aumentará nosso conhecimento sobre a biologia auditiva básica e será possível identificar novos potenciais alvos terapêuticos para combater a PAIR.

Em função das limitações dos estudos humanos de associação do genoma inteiro e das análises de *locus* de traço quantitativo (QTL) em camundongos, optou-se por utilizar a estratégia de associação do genoma inteiro através da incorporação do *Hybrid Mouse Diversity Panel* (HMDP). O HMDP é uma coleção de linhagens de camundongos consanguíneos clássicos e recombinantes, cujos genomas têm sido sequenciados e/ou genotipados em alta resolução (11). O cálculo de poder tem demonstrado que esse painel é superior à análise de ligação tradicional (*linkage*) e é

capaz de detectar *loci* responsáveis por 5% da variância global. Diversos estudos, de forma bem-sucedida, têm mapeado *loci* candidatos em traços complexos através desse painel e, mais recentemente, foi publicado uma meta-análise com a incorporação do HMDP para o mapeamento da perda auditiva relacionada à idade (12)(13)(14)(15).

Nesse manuscrito, é descrito, de forma inédita, uma análise de associação com correção da estrutura populacional para o mapeamento de diversos *loci* envolvidos na susceptibilidade à PAIR, utilizando linhagens de camundongos consanguíneos. Ao completar o rastreamento preliminar do HMDP, um interessante *locus* mereceu uma exploração adicional. Dessa forma, foi detalhado um pico com associação significativa no cromossomo 17, dentro de um bloco de haplótipo que contém a NADPH oxidase-3 (*Nox3*), e fornece evidência que apoia o papel desse gene na susceptibilidade à PAIR. Além disso, foi demonstrada uma susceptibilidade genética à PAIR, frequência-específica, na cóclea dos mutantes.

## **Materiais e Métodos**

### **Aspectos Éticos**

O *Institutional Care and Use Committee* (IACUC) da *University of Southern California*, Los Angeles, aprovou o protocolo para uso animal dos camundongos das linhagens do HMDP e dos camundongos *Nox3<sup>het</sup>* (IACUC 12033). As linhagens do HMDP e C57BL/6JEiJ *Nox3<sup>het</sup>* (*Nox3<sup>het</sup>/Nox3<sup>het</sup>*, *Nox3<sup>het</sup>/+* e tipo selvagem) foram anestesiadas com uma injeção intraperitoneal de uma mistura de quetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (16 mg/kg de peso corporal).

### **O *Hybrid Mouse Diversity Panel* (HMDP)**

Uma descrição detalhada do HMDP (seleção de linhagens, poder estatístico e resolução do mapeamento) está disponível em Bennett BJ, et al. 2010 (11). Aproximadamente, quatro camundongos fêmeas de cada linhagem do HMDP foram adquiridos do *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME). Somente camundongos fêmeas foram testados para evitar a influência do sexo no fenótipo. Todos os camundongos apresentavam 4 semanas de vida. A fim de garantir uma adequada aclimatização em um ambiente comum, os camundongos não foram testados até completar as 5 semanas de vida. Foram testados camundongos com 5 semanas para eliminar os potenciais efeitos da idade no fenótipo. Todos os camundongos foram mantidos em uma dieta com ração até serem sacrificados.

## **Genotipagem**

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

## **Limiares Auditivos Pré- e Pós-Exposição ao Ruído**

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



Corporation, Austin, TX, EUA). Os *tone pips* foram apresentados abaixo do limiar e aumentados com incrementos de 5 dB até o alvo de 100 dB. Os sinais foram apresentados numa taxa de 30/segundo. As respostas foram filtradas com banda de passagem de 0,3 até 3 kHz ( $\times 10.000$ ). Em cada intensidade de estímulo, foi calculada a média de 512 registros de onda. O limiar auditivo foi determinado através da inspeção das ondas do potencial evocado auditivo de tronco cerebral e foi definido como a intensidade mínima em que a onda 1 pode ser ainda identificada. Os dados foram armazenados para uma posterior avaliação dos valores de amplitude da onda 1 através da análise pico-a-pico (P1-N1).

### **Determinação Pré- e Pós-Exposição das emissões otoacústicas por produtos de distorção**

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

### **Equipamento audiométrico e de exposição ao ruído**

Os camundongos com 6 semanas de vida foram expostos, por 2 horas, a um ruído de banda na oitava de 10 kHz e na intensidade de 108 dB NPS. Esse método foi

adaptado de Kujawa e Liberman (2009) (16). A exposição ao ruído de banda na oitava de 10 kHz foi previamente descrita (17). Durante 2 horas, os camundongos foram colocados numa jaula de exposição com formato circular e dividida em quatro compartimentos. A jaula permitia a movimentação livre dos camundongos dentro de cada compartimento. A jaula foi colocada numa câmara MAC-1 à prova de som criada pela *Industrial Acoustics* (IAC, Bronx, NY, EUA). A câmara sonora foi forrada com espuma acústica à prova de som para diminuir os reflexos sonoros. As gravações de ruído foram geradas num alto-falante Fostex FT17H Tweeter inserido no topo da câmara de som. A calibração do ruído danoso foi realizada através do medidor do nível sonoro B&K com uma variação de 1,5 dB na área da jaula.

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

## **Extração do RNA Coclear**

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

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

## **Análise da Expressão Gênica**

Os *BeadChips* da *Illumina* foram utilizados para as medidas de expressão gênica. As amplificações e hibridizações foram realizadas de acordo com o protocolo *Illumina (Southern California Genome Consortium microarray core laboratory* na UCLA). O RNA foi transcrito de forma reversa para cDNA através da utilização do kit de síntese (AMIL1791). Finalmente, foi convertido para cRNA e marcado com biotina. De forma complementar, 800 ng do produto do cRNA marcado com biotina foi hibridizado para preparar as matrizes do genoma inteiro, sendo incubado durante a noite (16 a 20 horas) na temperatura de 55 °C. As matrizes foram lavadas e marcadas com a coloração Cy3. O excesso de coloração foi removido através de lavagens. Finalmente, as matrizes foram analisadas num *scanner* de laser confocal *Illumina BeadScan*.

## ***Efficient Mixed-Model Association (EMMA)***

O EMMA é um teste estatístico para o mapeamento de associações, sendo corrigido para parentesco genético e estrutura populacional. Esse teste avalia a média de cada linhagem e também as medidas individuais de cada camundongo para aumento do poder estatístico. Demonstrou-se previamente que o valor  $p < 0,05$  equivale, num estudo de associação do genoma inteiro do HMDP através do EMMA, a um valor de  $p = 4,1 \times 10^{-6}$  ( $-\log_{10}P = 5,39$ ) (18). A implementação do pacote R do EMMA está disponível online em <http://mouse.cs.ucla.edu/emma>.

## **Caracterização dos Genes Candidatos**

As sequências de referência dos genes (*RefSeq*) foram obtidos através do *UCSC genome browser* (<https://genome.ucsc.edu>) utilizando a montagem do genoma *NCBI Build37* para caracterizar os genes localizados em cada região cromossômica associada com o fenótipo. O EMMA foi utilizado para calcular as associações (valores p) das sondas correspondes a cada um dos genes da *RefSeq*. O intervalo de confiança (95%) para a distribuição das distâncias entre o polimorfismo mais significativo e o polimorfismo verdadeiramente causal, em associações simuladas que explicam 5% da variância do HMDP, é 2.6 Mb (11). Somente polimorfismos mapeados em cada região cromossômica associada foram utilizados nessa análise. Foram selecionados polimorfismos que foram variantes em pelo menos uma das linhagens consanguíneas clássicas do HMDP. Os polimorfismos não sinônimos, dentro de cada região, foram disponibilizados através do *Mouse Phenome Database* ([www.phenome.jax.org](http://www.phenome.jax.org)).

### **Caracterização do Camundongo Mutante *Nox3<sup>het</sup>***

A geração e caracterização inicial do alelo *Nox3<sup>het</sup>* foi previamente descrita (19). O alelo *Nox3<sup>het</sup>* foi gerado espontaneamente (inserção retroviral endógena no intron 12) numa linhagem GL/Le. Porém, desde então, tem sido mantido numa linhagem congênica C57BL/6JEiJ. Para contornar a possibilidade de alelos adicionais na linhagem doadora, essa região foi retrocruzada por mais de 10 gerações. Já que o alelo mutante não está presente nessa linhagem, o intervalo congênico contendo o *Nox3* é provavelmente menor que 5 centimorgans (<http://jaxmice.jax.org/strain/002557.html>). O *Nox3<sup>het</sup>* (conhecido como camundongo de “cabeça inclinada” ou *het*) é autossômico recessivo e portador de mutações espontâneas. Isso gera a ausência de otocônia, porém sem aparente anormalidade em outros órgãos. A deficiência de otocônia resulta num

comportamento de inclinação da cabeça e ausência completa de potenciais evocados vestibulares (VsEPs), porém com limiares auditivos normais no PEATE (20).

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

## **Preparação da Montagem Inteira da Cóclea**

Os camundongos foram sacrificados com menos de 24 horas após o PEATE (pós-exposição). As cócleas foram dissecadas dos tecidos adjacentes, sendo realizada aberturas nas espiras através da perfuração do ápice e da ruptura das janelas oval e redonda. A dissecção foi realizada em PBS (*phosphate-buffered saline*) gelado. Após a dissecção, as cócleas foram fixadas durante a noite a uma temperatura de 4 °C com paraformaldeído a 4%. No dia seguinte, foram lavadas com PBS. Uma dissecção adicional foi realizada para expor o órgão de Corti. A fim de promover a perfusão e o bloqueio apropriado, o tecido foi imerso por 1 hora em PBS contendo 0,2% de *Triton X-100* (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) e 16% de soro normal de cabra (SouthernBiotech, Birmingham, AL, EUA). As amostras foram incubadas, durante a noite, em temperatura ambiente, com os anticorpos primários (anti-miosina 6 de coelho, 1:500, Proteus Biosciences e anti-CtB2 de camundongo, 1:500, BD Biosciences) para uma coloração dupla. Os anticorpos secundários foram então

utilizados e o tecido foi incubado durante a noite e no escuro (Alexa 594, jumento anti-coelho, 1:500, Life Technologies e Alexa Fluor-488 anti-camundongo, 1:500, Life Technologies). Posteriormente, as amostras foram lavadas três vezes em PBS e montadas em slides de vidro utilizando o *Fluoromount G* (SouthernBiotech). A microscopia foi realizada com microscópio confocal com laser (Olympus IX81) e com luz epifluorescente (Olympus Fluoview FV1000). A morte de células ciliadas externas (% por 100µm) foi quantificada e analisada através de um citococleograma que analisa a distância relativa do ápice da cóclea num mapa tonotópico (do camundongo da linhagem CBA) (21). Os percentuais indicam a localização das células ciliadas internas e externas na cóclea (0% corresponde à extremidade apical e 100% à extremidade basal) em intervalos de 10%.

A densidade de bandas sinápticas cocleares foi analisada em cada área correspondente à frequência do PEATE (4, 8, 12, 16, 24 e 32 kHz), seguindo um mesmo mapa tonotópico. As células ciladas internas foram analisadas em um comprimento de 50 µm para cada frequência. Os pontos de imunofluorescência gerados pela coloração do CtBP2 foram contados utilizando aquisição multidimensional (*z-stacks*) e divididos pelo número de células ciliadas internas (medido pela quantidade de núcleos) na amostra.

### **Reação em cadeia da polímerase do *Nox3*<sup>het</sup>**

A reação da cadeia de polimerase (PCR) foi realizada para o *Nox3* utilizando os seguintes *primers*: *Nox3-int12F*, GTTCTGGAGCACCTTGT; *Nox3-int12R* CCCATAGGGAGCCAAGAAAT; e ERV-R, TGTC AAGCTGACTCCACCAG (19). Os produtos da PCR foram separados num gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 mg/ml de brometo de etídio.

## Resultados

### Existe variação fenotípica na susceptibilidade à PAIR no HMDP

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

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

### A análise da associação do genoma inteiro na PAIR revela susceptibilidade genética frequência-específica

O algoritmo EMMA foi aplicado para cada fenótipo, separadamente, a fim de identificar associações genéticas nos 6 diferentes estímulos de *tone-burst* (18). A associação com valores p ajustados foi calculada para 108.064 polimorfismos com uma frequência alélica menor superior a 5%. O equivalente ao valor  $p < 0,05$ , nos estudos de associação genômica utilizando o EMMA no HMDP, é  $p=4.1 \times 10^{-6}$  ou  $-\log_{10}P=5,39$ .

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

### **Caracterização dos picos da associação genômica na PAIR**

Dentro de cada pico associado, existem quatro (cromossomo 15), 11 (cromossomo 3), 10 (cromossomo 17) e dois (cromossomo 2) genes da sequência de referência (*RefSeq*). Após, foram identificados genes, dentro de cada um dos cinco intervalos, que apresentassem alterações funcionais. Os genes foram selecionados com base na sua regulação por um *locus* de traço quantitativo com expressão local (*cis* eQTL) no HMDP ou de acordo com o recebimento de um polimorfismo de base única não sinônimo (NS SNP) com consequências funcionais. Na análise de *locus* de traço quantitativo de expressão (eQTL), foram gerados *microarrays* com perfis de expressão gênica. Foi utilizado o RNA isolado de cócleas de 64 linhagens do HMDP ( $n=3$  *microarrays* por linhagem). O EMMA foi utilizado para realizar uma análise de associação entre todos os polimorfismos e as sondas dos *microarrays* mapeados em cada região. Após excluir sondas sobrepostas em determinados polimorfismos, um total de 18.138 genes foram representados por pelo menos uma sonda, os quais estão presentes nas linhagens consanguíneas clássicas utilizadas no HMDP (seção de Material e Métodos). Desse total, seis genes (quatro na associação do cromossomo 3 e dois na associação do cromossomo 17) foram identificados em pelo menos uma sonda com expressão regulada por um eQTL local (Tabela 2). Entretanto, a única



sonda significativa, em que a expressão era regulada por um eQTL local na cóclea, estava localizado no cromossomo 17.

Foi determinado se algum desses 27 genes, implicados no estudo preliminar de associação do genoma inteiro, apresenta um papel definido na orelha interna. As associações nos cromossomos 2, 3 e 15 não apontavam genes cocleares conhecidos. Somente a NADPH oxidase 3 (*Nox3*), no cromossomo 17, tem sido implicada na biologia da orelha interna através da definição de que os mutantes têm ausência de otocônia na mácula sacular e utricular (22) e o gene *Nox3* apresenta alta expressão na orelha interna (23).

### **Análise detalhada da associação no cromossomo 17 destaca o *Nox3* como gene candidato**

De todos os genes no *locus* do cromossomo 17, somente o gene *Tfblm* apresenta um eQTL significativo ( $1,08 \times 10^{-6}$ ) (Figura 3). Cabe destacar que o gene *Nox3*, onde o pico de associação do polimorfismo está localizado no estudo de associação, não possui um eQTL na cóclea. Entretanto, existe clara demonstração (23) de que o *Nox3* é altamente expresso (pelo menos 50 vezes mais do que em qualquer outro tecido) em regiões específicas da orelha interna. Com base nesses dados e na localização do pico do polimorfismo no estudo de associação (rs33652818), focou-se no *Nox3* como um gene candidato plausível para PAIR no *locus* do cromossomo 17.

### **O camundongo *Nox3<sup>het</sup>* é mais susceptível à PAIR**

A fim de testar diretamente a hipótese de que o *Nox3* estava associado com a susceptibilidade à PAIR, foi caracterizado um camundongo mutante previamente gerado. O camundongo *Nox3<sup>het</sup>* foi testado através dos limiares auditivos pré- e pós-

exposição ao ruído e mudança permanente de limiar (PTS) após estímulos de 4, 8, 12, 16, 24 e 32 kHz *tone-burst*. De forma consistente com os achados do estudo de associação do genoma inteiro, essa análise revelou uma redução estatisticamente significativa no PTS do camundongo do tipo selvagem (linhagem C57BL/6JEiJ) comparada ao  $Nox3^{het/+}$  e  $Nox3^{het}/Nox3^{het}$  em 8 kHz (Figura 4). De forma comparativa, estão demonstrados na Figura 5, os efeitos do pico do polimorfismo (rs33652818) no *locus Nox3* nas diferentes frequências do PEATE. Curiosamente, existiam diferenças significativas em função do genótipo nas frequências testadas de 4 kHz e 8 kHz. Entretanto, na frequência de 4 kHz, foi somente sugestiva ( $p=1,1 \times 10^{-4}$ ) (Figura S1) e não alcançou o nível de significância dos estudos de associação do genoma inteiro (Tabela 1). Dessa forma, a associação significativa e altamente sugestiva do rs33652818 nos fenótipos de 8 e 4 kHz, respectivamente, assim como o fenótipo apresentado pelo camundongo  $Nox3^{het}/Nox3^{het}$ , sugere que o *Nox3* pode estar envolvido na extremidade inferior do espectro de frequências para PAIR.

Numa análise topográfica de toda a via auditiva, foi avaliada a atividade das células ciliadas externas (CCE) através das EOAPDs e das células ciliadas internas (CCI) e respostas neuronais através da amplitude pico-a-pico da onda 1 do PEATE. Mesmo com ausência de diferença estatisticamente significativa nos limiares das EOAPDs (Figura 6A) em 8, 16, 22 e 32 kHz, existiu uma significativa diferença nas amplitudes pico-a-pico da onda 1 do PEATE na frequência isolada de 8 kHz (Figura 6B).

As amplitudes supraliminares (Figura 7A) das EOAPDs (dB NPS) e da onda 1 do PEATE ( $\mu$ V) (Figura 7B) para 8 kHz (*tone-burst*) foram comparadas através de diferentes intensidades de estímulo. Ambas as análises demonstram, de forma

estatisticamente significativa, um menor dano causado pelo ruído no tipo selvagem em comparação com o heterozigoto e o camundongo mutante.

A fim de comparar esses achados eletrofisiológicos, foram coletadas cócleas de camundongos  $Nox3^{het}$  e do tipo selvagem antes e após a exposição ao ruído. Primeiramente, foi avaliada a perda de células ciliadas externas em toda extensão da cóclea. Isso foi realizado através da criação de um citococleograma (Figura 8A) do órgão de Corti inteiro marcado por técnica de imuno-histoquímica (Figura 8B) para correlacionar com os achados das EOAPDs. De forma subsequente, a densidade de bandas sinápticas aferentes (Figura 9) foi analisada como marcador das respostas neuronais (amplitude supraliminar da onda 1 do PEATE).

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

## **Discussão**

### **Estudo de Associação do Genoma Inteiro na PAIR**

Pela primeira vez, uma análise de associação, com correção para estrutura populacional, mapeou *loci* de traços auditivos em linhagens de camundongos consanguíneos. Os resultados identificaram diversos *loci* envolvidos na susceptibilidade à PAIR. Além disso, este estudo demonstrou uma susceptibilidade genética ao ruído, a qual é frequência-específica na cóclea. O poder desse estudo de associação do genoma inteiro em detectar *loci* em frequências específicas foi precisamente reiterado no modelo de camundongo mutante.

Os estudos de associação do genoma inteiro com camundongos têm revolucionado o campo da genética e têm gerado a descoberta de centenas de genes envolvidos em traços complexos (24). O sucesso desse mapeamento ocorreu em função da observação inicial de que existia uma evidente variação fenotípica entre as linhagens nos limiares auditivos pós-exposição ao ruído, reiterando a contribuição de fatores genéticos na susceptibilidade à PAIR. Essa ampla distribuição de fenótipos e genótipos facilitou o mapeamento genético com alta resolução.

Foi utilizado um conjunto combinado de 64 linhagens de camundongos consanguíneos clássicos e recombinantes. Isso é uma parcela do HMDP e uma extensão do estudo de associação que utilizava somente linhagens consanguíneas clássicas. A inclusão de um conjunto de linhagens consanguíneas recombinantes aumentou o poder estatístico do estudo de associação (25). Dessa forma, o HMDP gerou poder estatístico significativo e resolução para identificar *locus* de susceptibilidade à PAIR, o qual foi precisamente reiterado em um camundongo mutante (26). Considerando que esse painel é composto por 100 linhagens de camundongos consanguíneos comercialmente disponíveis, com aproximadamente dois terços desse painel, esse estudo conseguiu mapear cinco *loci*, refletindo o poder para detectar *loci* com efeito moderado. Além do poder presente nesse recurso, a resolução desse painel é, em alguns casos, duas ordens de magnitude maior do que é alcançado com a análise de ligação (*linkage*). Isso foi também demonstrado, por esse mesmo grupo, em um estudo de associação do genoma inteiro para perda auditiva relacionada à idade com camundongos (27).

De forma sem precedentes, esse novo paradigma foi aplicado ao primeiro mapeamento de alta resolução de genes candidatos para susceptibilidade à PAIR. Este estudo gerou associações significativas em pelo menos cinco *loci* em três

diferentes frequências de estímulo pós-exposição ao ruído, correspondendo a um total de 27 genes candidatos. Todos esses genes necessitam de uma adequada caracterização, mas o primeiro gene escolhido para ser validado através de um modelo genético com camundongo mutante foi *Nox3*. O *Nox3* foi selecionado para essa investigação adicional, pois apresenta uma expressão alta e específica no epitélio cócleo-vestibular e nos neurônios do gânglio espiral (23).

### ***Nox3* e a Orelha Interna**

O gene *Nox3* foi descrito em 2000, baseado na similaridade da sua sequência com outras isoformas da família *NOX* (codifica uma NADPH oxidase) (28). A estrutura global do *Nox3* é altamente semelhante à estrutura de *Nox1* e *Nox2* (29), e o *Nox3* compartilha 56% dos aminoácidos de *Nox2* (30). Codificadas pelo *Nox3*, as seis proteínas transmembrana de ligação à NADPH interagem com duas proteínas transmembrana (codificadas pelo gene *Cyba*) e uma proteína citosólica (codificada por *NOXO1*). A ativação libera o complexo funcional NADPH oxidase que é capaz de transportar elétrons através de membranas. Isso leva à geração de superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a partir de oxigênio ( $O_2$ ) e, subsequentemente, espécies reativas de oxigênio (19).

Os primeiros estudos sobre a função de *Nox3* foram publicados em 2004 e geraram a definição de *Nox3* como a NADPH oxidase da orelha interna (23) (22). Banfi et al. realizaram análises da distribuição do *Nox3* (por PCR em tempo real e hibridização *in situ*) e identificaram uma alta expressão de *Nox3* na orelha interna

(epitélio sensorial coclear/vestibular e gânglio espiral). Seguida da exposição à cisplatina, células HEK293 transfectadas com *Nox3* produziram  $O_2^{\bullet-}$  espontaneamente e geraram um aumento significativo na produção de  $O_2^{\bullet-}$  (23). Paffenholz et al. (22) demonstraram que mutações do *locus het* afetam o *Nox3* e, esse camundongo mutante de cabeça inclinada (*het*), apresentava formação deficiente de otocônia no sáculo e utrículo. Isso resultava em defeitos de equilíbrio, como incapacidade em detectar a aceleração linear ou gravidade. Com base nesses achados, optou-se por prosseguir a investigação do gene *Nox3* como o principal candidato no *locus* do cromossomo 17.

Estudos subsequentes têm estabelecido o papel do gene *Nox3* como fonte primária da geração de espécies reativas de oxigênio na cóclea, especialmente induzida pela ototoxicidade da cisplatina (31). O “*knockdown*” de *Nox3* (por pré-tratamento com *siRNA*) preveniu a ototoxicidade pela cisplatina através da preservação dos limiares auditivos e células ciliadas. Além disso, reduziu a expressão de biomarcadores de dano (TRPV1 - receptor de potencial transiente vaniloide do tipo 1 e KIM-1 - molécula de lesão renal-1) nos tecidos cocleares (32). O *siRNA* (silenciador de genes) para *Nox3* reduziu a perda auditiva induzida pela cisplatina e a apoptose de células ciliadas sensoriais na cóclea em ratos (33). Embora não exista evidência similar em relação à PAIR, esse papel do *Nox3* no desenvolvimento da ototoxicidade pela cisplatina (especialmente nos mecanismos regulatórios de dano coclear) direcionou o interesse pela validação desse gene como candidato à PAIR.

O único estudo que explorou a relação entre a PAIR e a família NOX (incluindo *Nox3*) foi realizado em ratos (34). Esse estudo não indicou se o gene *Nox3* aumentou ou reduziu a susceptibilidade à PAIR. Em vez disso, avaliou os níveis de expressão de *Nox3* após a exposição ao ruído. Alguns membros da família NADPH oxidase

(*NOX1* e *DUOX2*) sofreram aumento de expressão após a exposição ao ruído, sugerindo que essas isoformas podem estar ligadas ao dano coclear. Por outro lado, *Nox3* sofreu uma redução de expressão de sete e cinco vezes após a exposição a um ruído de 100 dB NPS e 110 dB NPS, respectivamente. Isso poderia representar um mecanismo protetor endógeno contra o estresse oxidativo. Esse mecanismo protetor pode ter diminuído o impacto do ruído entre os camundongos do tipo selvagem através da redução da expressão de *Nox3* e, conseqüentemente, diminuindo a diferença em relação aos mutantes. Entretanto, esses dados *in vivo* foram baseados no uso de um inibidor NOX inespecífico que atingia múltiplos membros da família simultaneamente. Dessa forma, não conseguiu demonstrar, de forma conclusiva, que o *Nox3* tem um papel na PAIR. Por outro lado, nosso estudo utilizou modelos animais com variação genética com ocorrência natural e perturbação ambiental específica em *Nox3*.

De acordo com o nosso estudo, a exposição ao ruído poderia ter um efeito oposto à cisplatina na expressão de *Nox3*, sugerindo um envolvimento diferencial de *Nox3* no ruído e no dano coclear induzido pela cisplatina. De acordo com essa literatura, foi desenvolvida a hipótese de que a ausência ou redução do produto do gene *Nox3*, responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio na cóclea, reduziria a susceptibilidade ao ruído; porém, nossos resultados foram surpreendentemente no sentido oposto. Uma revisão da literatura demonstra que existem diversos mecanismos protetores e fisiológicos atribuídos aos genes da família NOX. Esses mecanismos incluem: defesa do hospedeiro e inflamação (morte celular dependente de espécies reativas de oxigênio, inativação de fatores microbianos virulentos, regulação do pH e da concentração iônica no fagossomo e atividade anti-inflamatória), regulação da expressão gênica (TNF-alfa, TGF-beta1 e

angiotensina II), redução celular, sinalização celular (inibição de fosfatases, ativação de quinases, regulação de canais iônicos e sinalização do cálcio), sensores de oxigênio (rim, corpo carotídeo e pulmão), biossíntese, regulação da pressão arterial, crescimento celular, angiogênese, diferenciação e senescência (30). Esses mecanismos protetores podem ter desempenhado um papel importante na susceptibilidade à PAIR entre os camundongos do tipo selvagem.

## **Validação do Papel de *Nox3* na PAIR**

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

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



relação ao *Nox3*, está presente nos neurônios do gânglio espiral e provavelmente na região do mapa coclear que corresponde à frequência de 8 kHz.

Existem diversos genes expressos de forma diferenciada ao longo do eixo tonotópico da cóclea, como foi demonstrado para *Nox3* (35). É provável que esse achado na frequência específica de 8kHz, na variação da susceptibilidade à PAIR, seja resultado desse padrão de expressão tonotópica.

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

A ausência de diferença na contagem de CCEs foi também verificada através da sua medida eletrofisiológica correspondente, o limiar auditivo por EOAPDs. Entretanto, através da avaliação da amplitude supraliminar por EOAPDs, foi possível observar uma amplitude significativamente maior no camundongo do tipo selvagem. Essas três diferentes medidas da integridade das CCEs (contagem de CCEs, limiar auditivo por EOAPDs e amplitude supraliminar por EOAPDs) apresentam diferentes

perfis de sensibilidade para demonstrar o impacto do ruído. Provavelmente, a amplitude supraliminar por EOAPDs é a medida mais sensível, já que existe uma melhor relação sinal-ruído. Essa medida indica que existe, significativamente, menos impacto na atividade das CCEs no camundongo do tipo selvagem.

### ***Nox3* tem um papel protetor na cóclea de camundongos**

Embora o gene *Nox3* esteja associado com a produção de  $O_2^{\bullet-}$  na orelha interna, a família NOX tem diversos mecanismos fisiológicos e potencialmente protetores. Certamente, esse papel protetor explica o fato de que a ausência de *Nox3* aumentou a susceptibilidade à PAIR nos nossos modelos de camundongo mutante. Entretanto, existe uma falta de estudos específicos sobre os mecanismos do gene *Nox3* em função de sua expressão específica na orelha interna. Além disso, os estudos funcionais sobre *Nox3* têm sido realizado através de sistemas de sobre-expressão (36). A maioria das evidências em relação a esses mecanismos é derivada das outras isoformas, como *Nox2*, que é funcionalmente similar a *Nox3* (29). Assim, devido à literatura escassa, nos baseamos em outras isoformas para formular hipóteses sobre os mecanismos de susceptibilidade à PAIR.

Já que as espécies reativas de oxigênio são frequentemente relacionadas à inflamação, parece ilógico imaginar que as enzimas NOX apresentem atividade anti-inflamatória. Entretanto, nos últimos anos, diversos estudos surpreendentes têm apontado na direção oposta. A maioria dos dados sobre a atividade anti-inflamatória das enzimas NOX advém de estudos que utilizam camundongos deficientes do fagócito NADPH oxidase *Nox2*. Foi demonstrada uma reduzida capacidade de degradar o material fagocitado nas células deficientes em *Nox2*, gerando um acúmulo de debris (37). Além disso, essa hiperinflamação pode ocorrer em função da carência de sinalização dependente de espécies reativas de oxigênio nos fagócitos deficientes

e também por uma atenuação na dependência das espécies reativas de oxigênio para sinalização do cálcio, contribuindo para o aumento da inflamação. Finalmente, a deficiência na inativação oxidativa de mediadores pró-inflamatórios gera o prolongamento da resposta inflamatória (30).

A hiperinflamação no camundongo deficiente para NADPH oxidase foi demonstrada em modelos para *Helicobacter gastritis* (38) (39), artrite (40), doença desmielinizante (41) e queimadura solar (42). Numa infecção pulmonar experimental por influenza, camundongos com deficiência de *Nox2* apresentaram um maior infiltrado inflamatório (43). Além disso, em estudos sobre disfunção endotelial, a ausência de *Nox4* resultou na redução da expressão endotelial de óxido nítrico sintetase, produção de óxido nítrico e expressão da heme-oxigenase 1, as quais estão associadas a apoptose e ativação inflamatória (44).

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

## **Conclusão**

Esse manuscrito descreve a primeira validação funcional de um gene do sistema auditivo proveniente de um estudo de associação do genoma inteiro. Foi demonstrado que o gene *Nox3* está envolvido na susceptibilidade à PAIR e que

camundongos deficientes em *Nox3* são os mais susceptíveis. Esse achado foi específico na frequência de 8 kHz, tanto através da avaliação eletrofisiológica (limiar auditivo por PEATE e medidas supraliminares por PEATE e EOAPDs) quanto através da histologia ao nível das bandas sinápticas cocleares. Nossos achados validam o poder do estudo de associação do genoma inteiro e o HMDP para detectar genes associados com a susceptibilidade à PAIR e a susceptibilidade genética tonotópica na cóclea do camundongo.

## Agradecimentos

Os autores agradecem as contribuições técnicas de Robert Rainey e Litao Tao (USC). Essa pesquisa compreende a tese de doutorado de aluno Joel Lavinsky. Agradecemos Yesha W. Lundberg, PhD (Boys Town National Research Hospital) por disponibilizar o camundongo *Nox3<sup>het</sup>* (*Nox3<sup>het</sup>/Nox3<sup>het</sup>* e *Nox3<sup>het</sup>/+*).

## Referências

1. Stucken EZ, Hong RS (2014) Noise-induced hearing loss: an occupational medicine perspective. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 22: 388–393. doi:10.1097/MOO.000000000000079.
2. Dobie RA (2008) The burdens of age-related and occupational noise-induced hearing loss in the United States. *Ear Hear* 29: 565–577. doi:10.1097/AUD.0b013e31817349ec.
3. Yankaskas K (2013) Prelude: noise-induced tinnitus and hearing loss in the military. *Hear Res* 295: 3–8. doi:10.1016/j.heares.2012.04.016.
4. Sliwinska-Kowalska M, Pawelczyk M (2013) Contribution of genetic factors to noise-induced hearing loss: a human studies review. *Mutat Res* 752: 61–65. doi:10.1016/j.mrrev.2012.11.001.

5. Heinonen-Guzejev M, Vuorinen HS, Mussalo-Rauhamaa H, Heikkilä K, Koskenvuo M, et al. (2005) Genetic component of noise sensitivity. *Twin Res Hum Genet Off J Int Soc Twin Stud* 8: 245–249. doi:10.1375/1832427054253112.
6. Erway LC, Shiau YW, Davis RR, Krieg EF (1996) Genetics of age-related hearing loss in mice. III. Susceptibility of inbred and F1 hybrid strains to noise-induced hearing loss. *Hear Res* 93: 181–187.
7. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Flood DG, Reaume AG, et al. (1999) Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (Sod1) increases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Audiol Neurootol* 4: 237–246. doi:13847.
8. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Lear PM, Ho YS (2000) Targeted mutation of the gene for cellular glutathione peroxidase (Gpx1) increases noise-induced hearing loss in mice. *J Assoc Res Otolaryngol JARO* 1: 243–254.
9. 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.
10. Holme RH, Steel KP (2004) 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* 5: 66–79. doi:10.1007/s10162-003-4021-2.
11. Bennett BJ, Farber CR, Orozco L, Kang HM, Ghazalpour A, et al. (2010) A high-resolution association mapping panel for the dissection of complex traits in mice. *Genome Res* 20: 281–290. doi:10.1101/gr.099234.109.
12. Farber CR, Bennett BJ, Orozco L, Zou W, Lira A, et al. (2011) Mouse genome-wide association and systems genetics identify Asxl2 as a regulator of bone mineral

density and osteoclastogenesis. *PLoS Genet* 7: e1002038.  
doi:10.1371/journal.pgen.1002038.

13. Park CC, Gale GD, de Jong S, Ghazalpour A, Bennett BJ, et al. (2011) Gene networks associated with conditional fear in mice identified using a systems genetics approach. *BMC Syst Biol* 5: 43. doi:10.1186/1752-0509-5-43.

14. Smolock EM, Ilyushkina IA, Ghazalpour A, Gerloff J, Murashev AN, et al. (2012) Genetic locus on mouse chromosome 7 controls elevated heart rate. *Physiol Genomics* 44: 689–698. doi:10.1152/physiolgenomics.00041.2012.

15. Davis RC, van Nas A, Bennett B, Orozco L, Pan C, et al. (2013) Genome-wide association mapping of blood cell traits in mice. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 24: 105–118. doi:10.1007/s00335-013-9448-0.

16. Kujawa SG, Liberman MC (2009) Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29: 14077–14085. doi:10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009.

17. White CH, Ohmen JD, Sheth S, Zebboudj AF, McHugh RK, et al. (2009) Genome-wide screening for genetic loci associated with noise-induced hearing loss. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 20: 207–213. doi:10.1007/s00335-009-9178-5.

18. Kang HM, Zaitlen NA, Wade CM, Kirby A, Heckerman D, et al. (2008) Efficient control of population structure in model organism association mapping. *Genetics* 178: 1709–1723. doi:10.1534/genetics.107.080101.

19. Flaherty JP, Fairfield HE, Spruce CA, McCarty CM, Bergstrom DE (2011) Molecular characterization of an allelic series of mutations in the mouse *Nox3* gene. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 22: 156–169. doi:10.1007/s00335-010-9309-z.

20. Zhao X, Jones SM, Yamoah EN, Lundberg YW (2008) Otoconin-90 deletion leads to imbalance but normal hearing: a comparison with other otoconia mutants. *Neuroscience* 153: 289–299. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.055.
21. Müller M, von Hünerbein K, Hoidis S, Smolders JWT (2005) A physiological place-frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse. *Hear Res* 202: 63–73. doi:10.1016/j.heares.2004.08.011.
22. Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, et al. (2004) Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in *Nox3*, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev* 18: 486–491. doi:10.1101/gad.1172504.
23. Bánfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, et al. (2004) NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem* 279: 46065–46072. doi:10.1074/jbc.M403046200.
24. Civelek M, Lusk AJ (2014) Systems genetics approaches to understand complex traits. *Nat Rev Genet* 15: 34–48. doi:10.1038/nrg3575.
25. Flint J, Eskin E (2012) Genome-wide association studies in mice. *Nat Rev Genet* 13: 807–817. doi:10.1038/nrg3335.
26. Ghazalpour A, Rau CD, Farber CR, Bennett BJ, Orozco LD, et al. (2012) Hybrid mouse diversity panel: a panel of inbred mouse strains suitable for analysis of complex genetic traits. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 23: 680–692. doi:10.1007/s00335-012-9411-5.
27. Ohmen J, Kang EY, Li X, Joo JW, Hormozdiari F, et al. (2014) Genome-wide association study for age-related hearing loss (AHL) in the mouse: a meta-analysis. *J Assoc Res Otolaryngol JARO* 15: 335–352. doi:10.1007/s10162-014-0443-2.

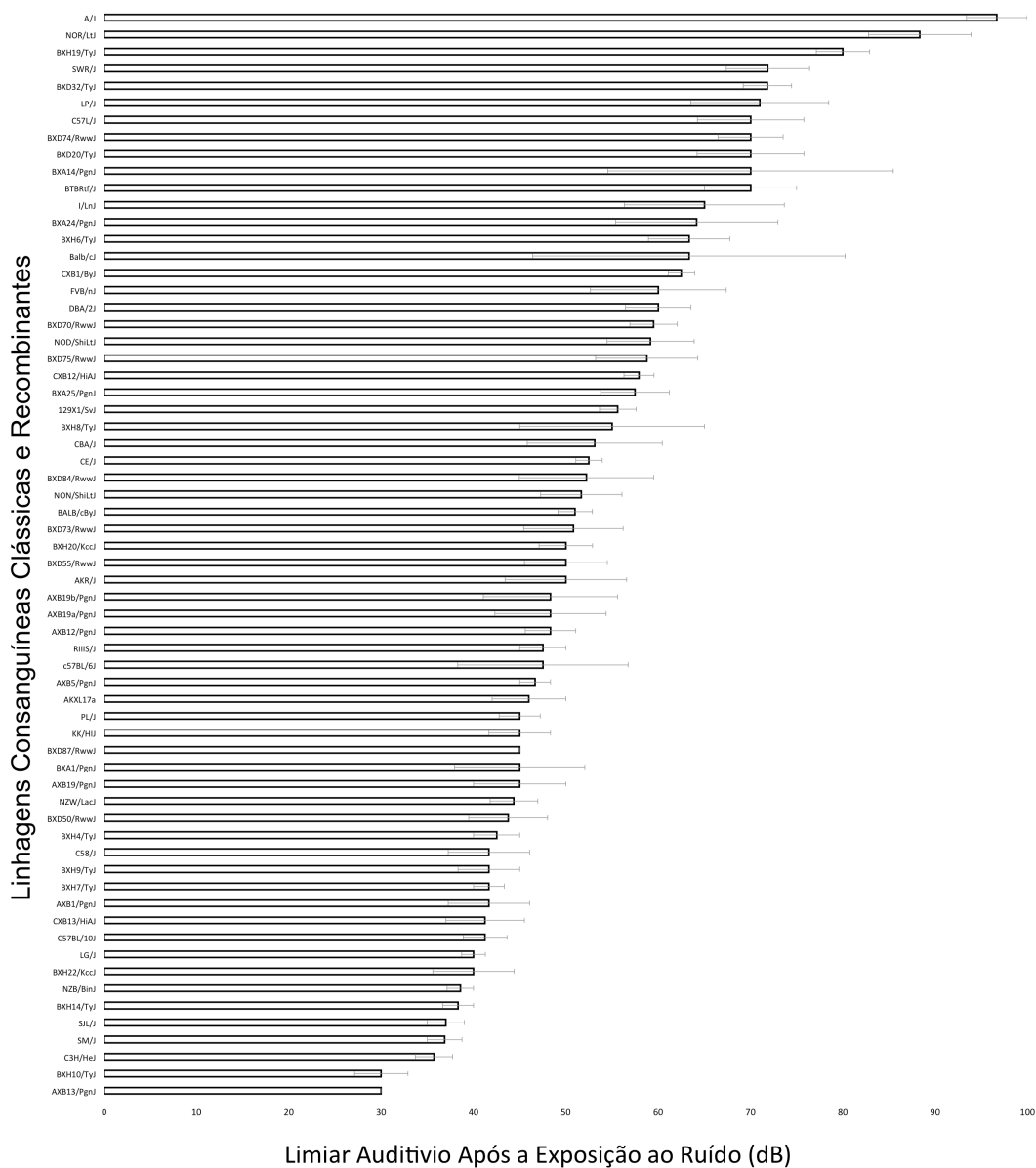
28. Kikuchi H, Hikage M, Miyashita H, Fukumoto M (2000) NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene* 254: 237–243.
29. Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD (2001) Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 269: 131–140.
30. Bedard K, Krause K-H (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245–313. doi:10.1152/physrev.00044.2005.
31. Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Kaur T, Ramkumar V (2012) siRNA-mediated knock-down of NOX3: therapy for hearing loss? *Cell Mol Life Sci CMLS* 69: 2429–2434. doi:10.1007/s00018-012-1016-3.
32. Mukherjea D, Whitworth CA, Nandish S, Dunaway GA, Rybak LP, et al. (2006) Expression of the kidney injury molecule 1 in the rat cochlea and induction by cisplatin. *Neuroscience* 139: 733–740. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.12.044.
33. Mukherjea D, Jajoo S, Kaur T, Sheehan KE, Ramkumar V, et al. (2010) Transtympanic administration of short interfering (si)RNA for the NOX3 isoform of NADPH oxidase protects against cisplatin-induced hearing loss in the rat. *Antioxid Redox Signal* 13: 589–598. doi:10.1089/ars.2010.3110.
34. Vljakovic SM, Lin SC-Y, Wong ACY, Wackrow B, Thorne PR (2013) Noise-induced changes in expression levels of NADPH oxidases in the cochlea. *Hear Res* 304: 145–152. doi:10.1016/j.heares.2013.07.012.
35. Son EJ, Wu L, Yoon H, Kim S, Choi JY, et al. (2012) Developmental gene expression profiling along the tonotopic axis of the mouse cochlea. *PloS One* 7: e40735. doi:10.1371/journal.pone.0040735.



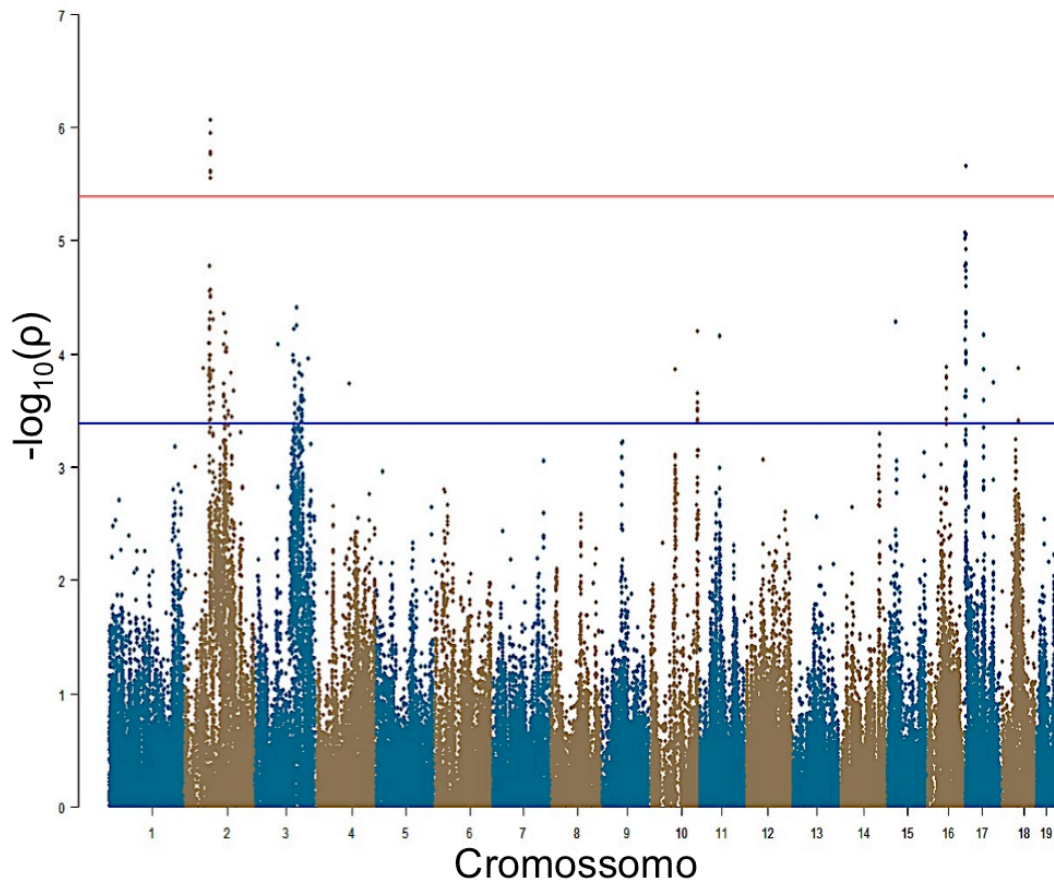
36. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K (2014) Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med*. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046.
37. Brown JR, Goldblatt D, Buddle J, Morton L, Thrasher AJ (2003) Diminished production of anti-inflammatory mediators during neutrophil apoptosis and macrophage phagocytosis in chronic granulomatous disease (CGD). *J Leukoc Biol* 73: 591–599.
38. Blanchard TG, Yu F, Hsieh C-L, Redline RW (2003) Severe inflammation and reduced bacteria load in murine helicobacter infection caused by lack of phagocyte oxidase activity. *J Infect Dis* 187: 1609–1615. doi:10.1086/374780.
39. Keenan JI, Peterson RA, Hampton MB (2005) NADPH oxidase involvement in the pathology of *Helicobacter pylori* infection. *Free Radic Biol Med* 38: 1188–1196. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.12.025.
40. Olofsson P, Holmberg J, Tordsson J, Lu S, Akerström B, et al. (2003) Positional identification of *Ncf1* as a gene that regulates arthritis severity in rats. *Nat Genet* 33: 25–32. doi:10.1038/ng1058.
41. Hultqvist M, Olofsson P, Holmberg J, Bäckström BT, Tordsson J, et al. (2004) Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the *Ncf1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12646–12651. doi:10.1073/pnas.0403831101.
42. Komatsu J, Koyama H, Maeda N, Aratani Y (2006) Earlier onset of neutrophil-mediated inflammation in the ultraviolet-exposed skin of mice deficient in myeloperoxidase and NADPH oxidase. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc* 55: 200–206. doi:10.1007/s00011-006-0071-3.

43. Snelgrove RJ, Edwards L, Rae AJ, Hussell T (2006) An absence of reactive oxygen species improves the resolution of lung influenza infection. *Eur J Immunol* 36: 1364–1373. doi:10.1002/eji.200635977.
44. Schröder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, et al. (2012) Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ Res* 110: 1217–1225. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.267054.

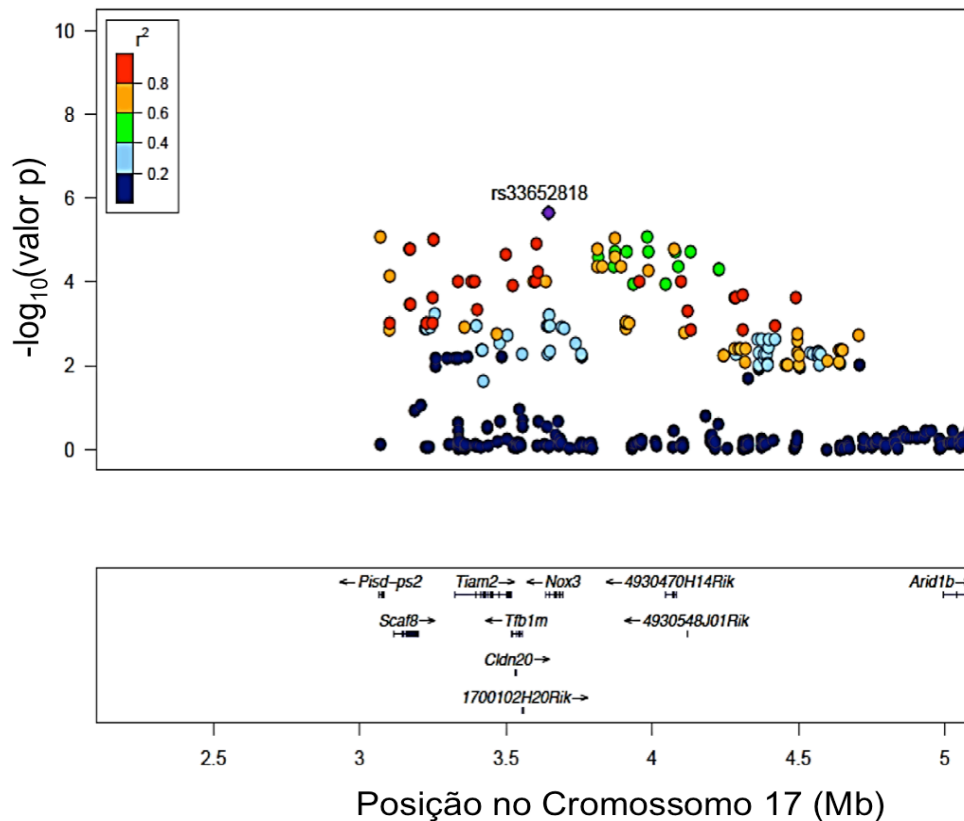
## **Legenda das Figuras**



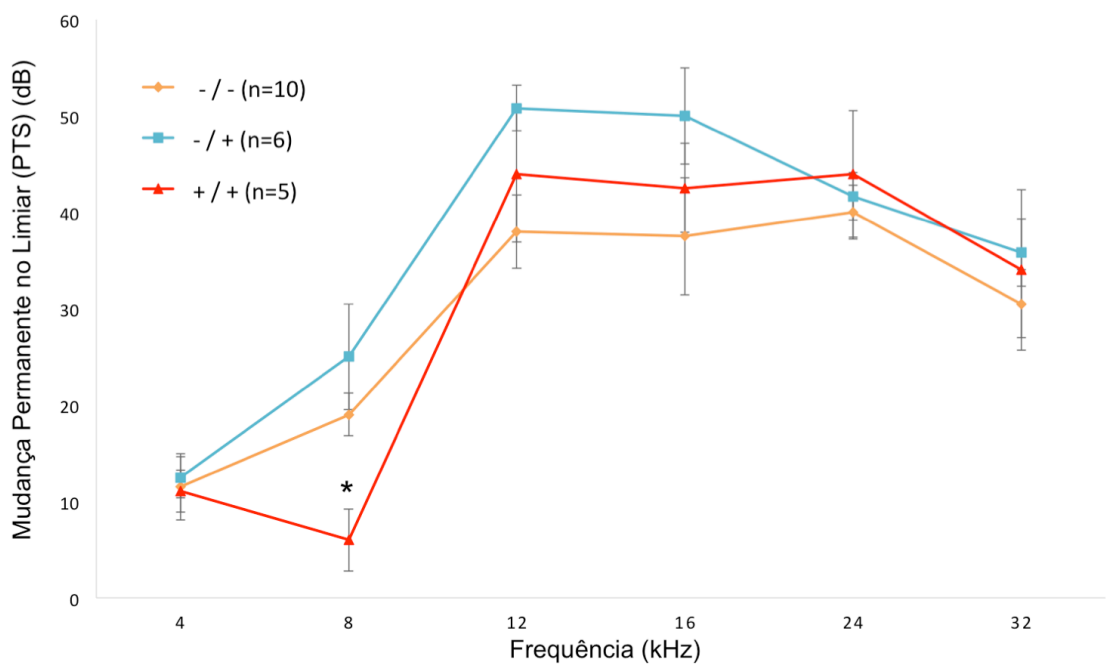
**Figura 1. Caracterização dos limiares auditivos após a exposição ao ruído nas diferentes linhagens do Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP).** Média  $\pm$  erro-padrão da média dos limiares auditivos após a exposição ao ruído, na frequência de 8 kHz, em 64 linhagens de camundongos consanguíneos do HMDP. A diferença entre os limiares auditivos das linhagens com os valores menores e maiores foi de 3,22 vezes.



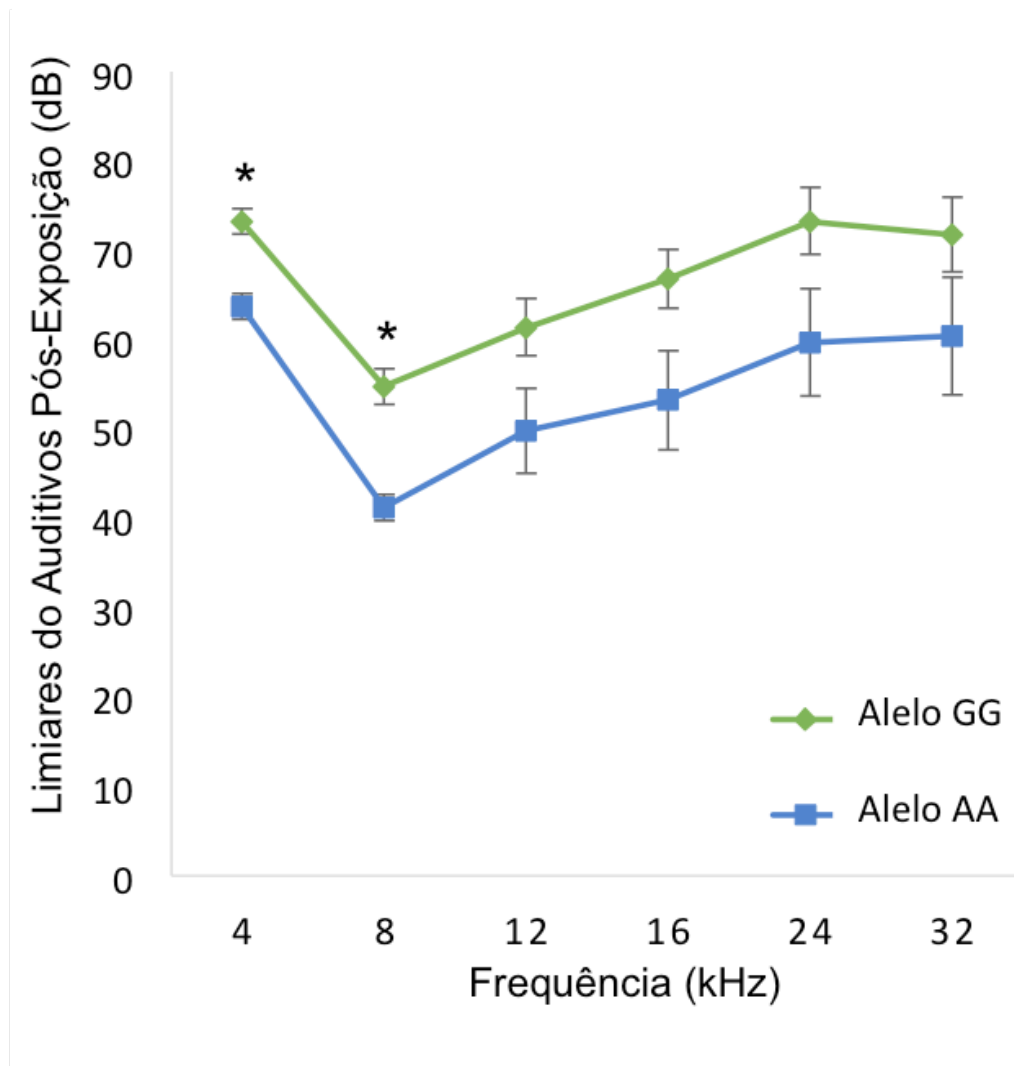
**Figura 2. Resultados do estudo de associação do genoma inteiro para limiares auditivos após a exposição do ruído com o Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP).** O *Manhattan Plot* demonstra os valores p ( $-\log P$ ) das associações ( $-\log_{10}$ ) na frequência de 8 kHz em 64 linhagens de camundongos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



**Figura 3. Gráfico regional da associação com o fenótipo (limiar auditivo após exposição ao ruído na frequência de 8 kHz) no cromossomo 17 centrado no principal polimorfismo do locus do gene *Nox3* (rs33652818).** O diamante azul representa o polimorfismo mais significativo ( $p = 2,25E-06$ ). Os polimorfismos estão coloridos com base no seu desequilíbrio de ligação com o polimorfismo mais significativo, sendo então: polimorfismos vermelhos estão em desequilíbrio de ligação em  $r^2 > 0,8$ , polimorfismos laranjas estão em desequilíbrio de ligação em  $r^2 > 0,6$  e polimorfismos verdes estão em desequilíbrio de ligação em  $r^2 > 0,4$ . As posições de todos os genes da sequência de referência (*RefSeq*) são traçados baseado na localização no genoma (*NCBI Build37 genome assembly*).

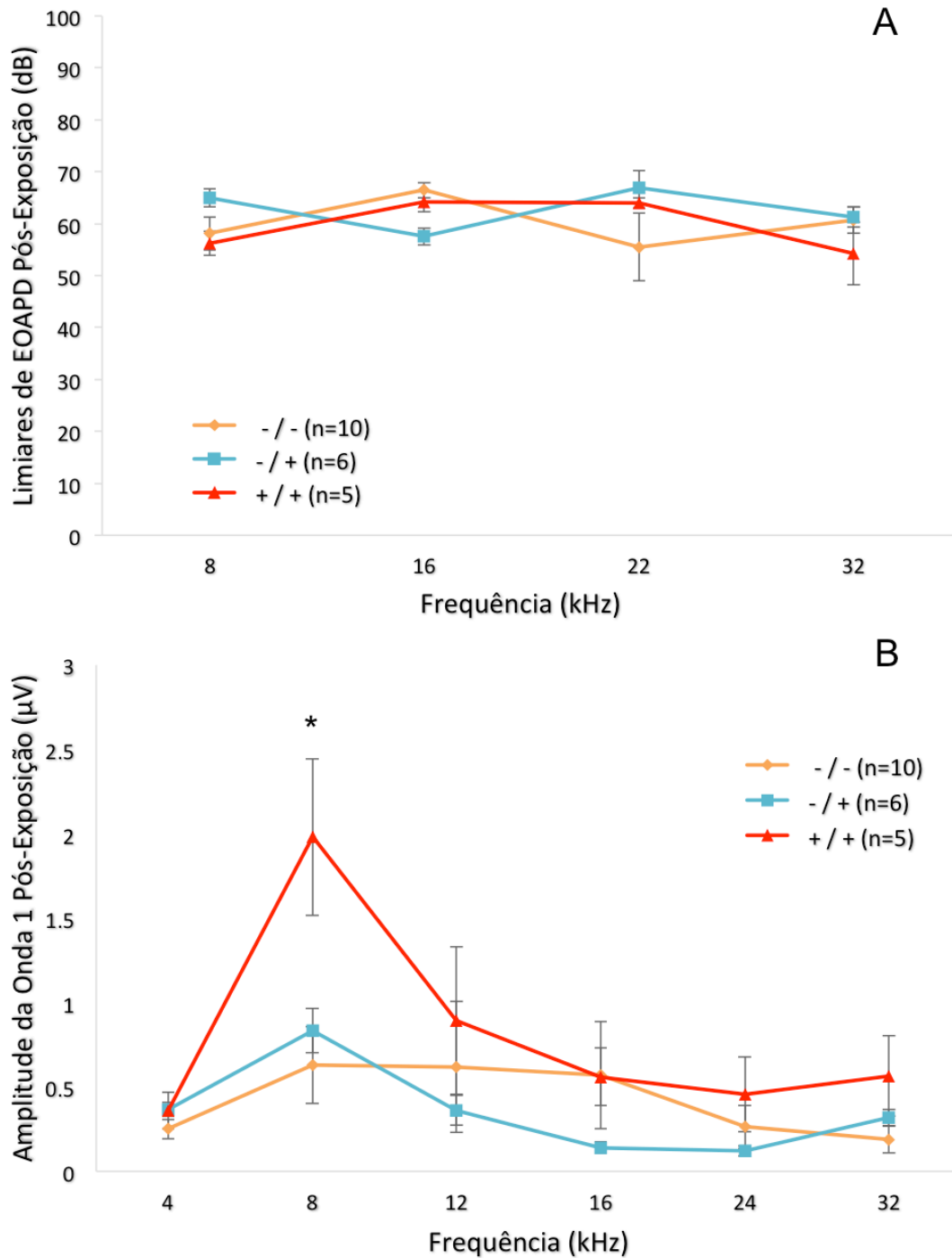


**Figura 4. Camundongos  $Nox3^{het}$  apresentam maior mudança permanente de limiar (PTS) na frequência de 8 kHz.  $Nox3^{het}/Nox3^{het}$  e  $Nox3^{het}/+$  apresentam uma PTS significativamente maior em comparação com os controles do tipo selvagem. Os dados apresentados são as comparações das médias analisadas através do *one-way* ANOVA (teste *post hoc* de Tukey para comparações múltiplas)  $*p < 0,05$ . -/- =  $Nox3^{het}/Nox3^{het}$ ; -/+ =  $Nox3^{het}/+$ ; +/+ = tipo selvagem (linhagem C57BL/6JEiJ).**



**Figura 5. Efeito genotípico do polimorfismo-pico (rs33652818) no locus do *Nox3*.**

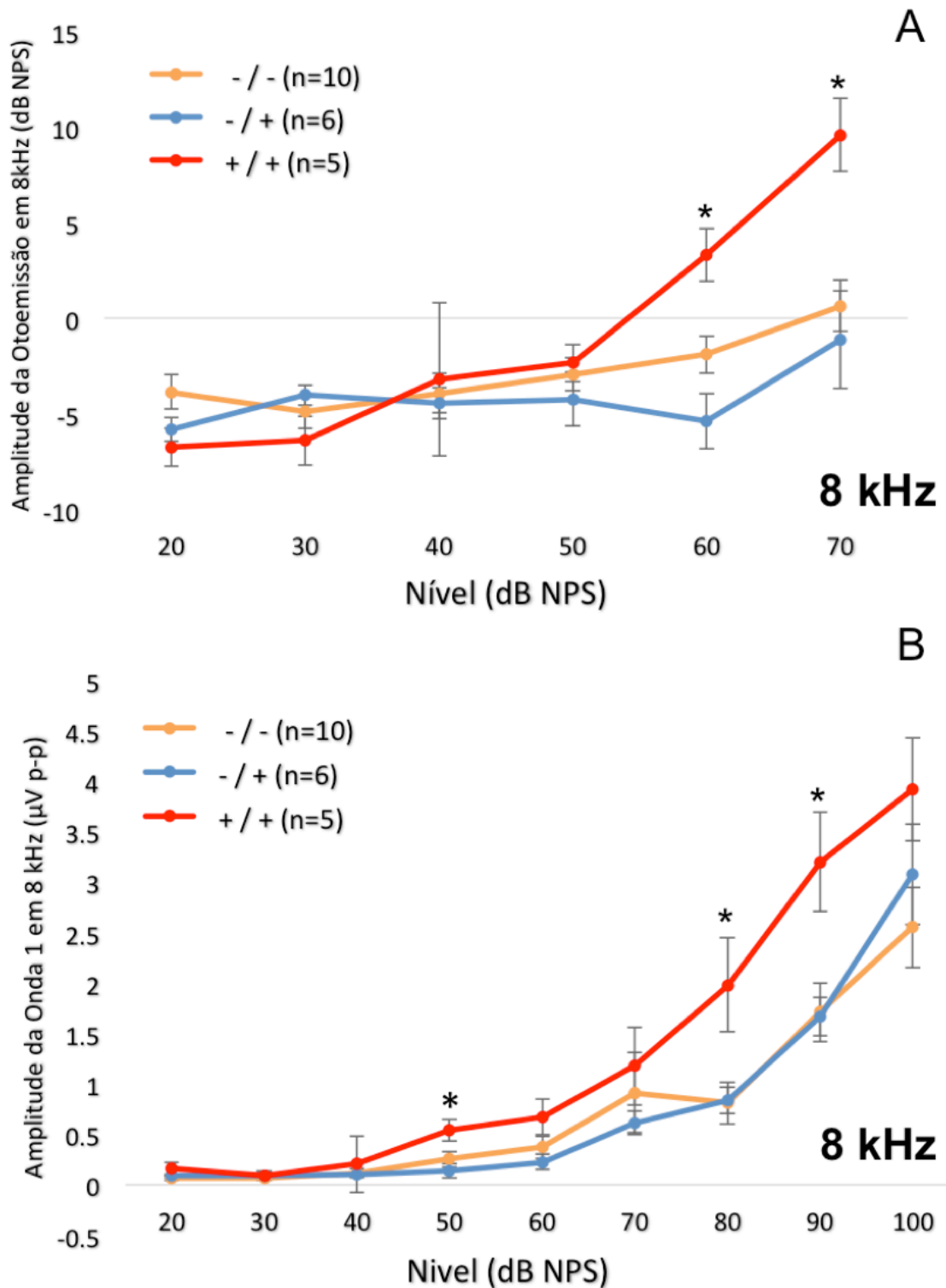
Comparação entre os alelos GG e AA através de várias frequências. Existe uma diferença estatisticamente significativa entre os alelos nas frequências 4 e 8 kHz. \* = valor  $p < 0,001$ . Barras de erro +/- 1 EP.



**Figura 6. Análise topográfica da via auditiva em diferentes frequências (após a exposição ao ruído).** Embora não tenha sido identificada diferença significativa para os limiares auditivos por EOAPDs (6A), os camundongos do tipo selvagem apresentam uma maior amplitude da onda 1 ( $p=0,010$ ), somente em 8 kHz, quando

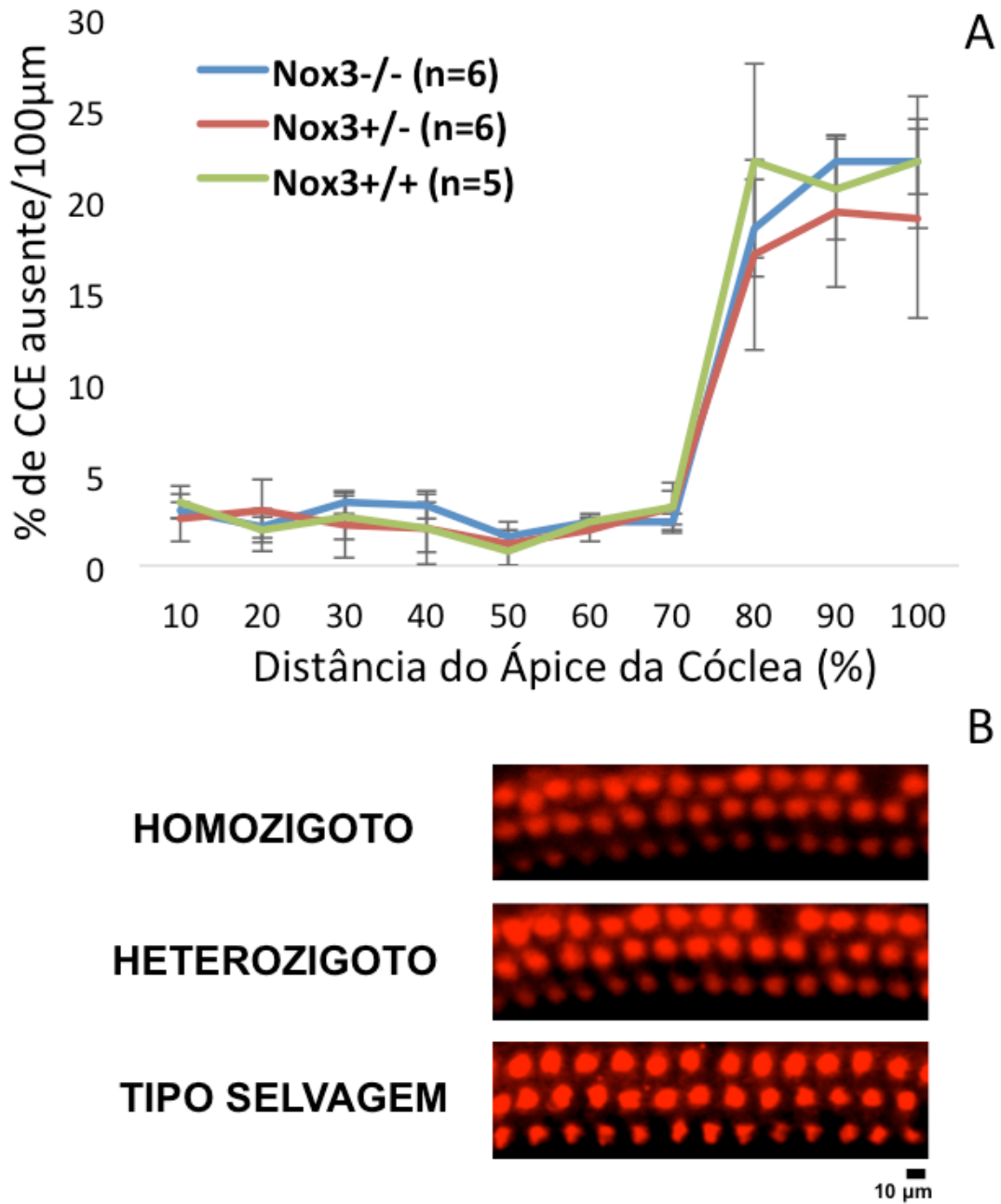


comparado com  $Nox3^{het/+}$  e  $Nox3^{het}/Nox3^{het}$  (6B). *One-way* ANOVA (teste de Tukey para comparações múltiplas). \* =  $p < 0,05$ . -/- =  $Nox3^{het}/Nox3^{het}$ : -/+ =  $Nox3^{het}/+$ : +/+ = tipo selvagem (linhagem C57BL/6JEiJ).



**Figura 7. Análise detalhada do estímulo na frequência de 8 kHz.** A dissecação da frequência de 8 kHz através da função *input/output* da EOAPD (7A) e amplitude da onda 1 do PEATE (7B) indicaram, de forma consistente, um maior comprometimento no  $Nox3^{het}/Nox3^{het}$  e  $Nox3^{het}/+$  em comparação com o tipo

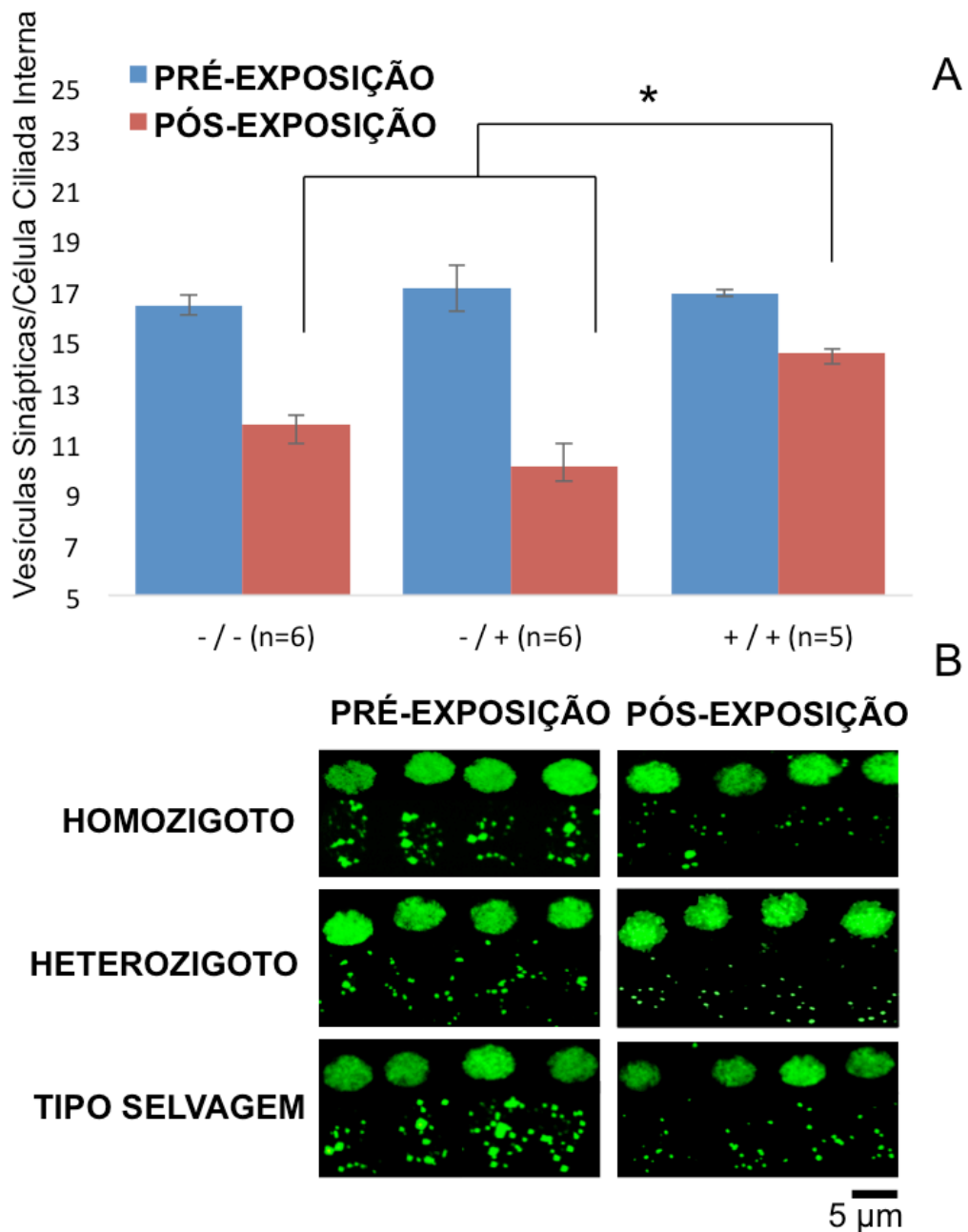
selvagem. \* =  $p < 0,05$ . -/- =  $Nox3^{het}/Nox3^{het}$ ; -/+ =  $Nox3^{het}/+$ ; +/+ = tipo selvagem  
(linhagem C57BL/6JEiJ).



**Figura 8. Citococleograma dos camundongos do tipo selvagem e *Nox3* (8A).** Não foram detectadas diferenças na contagem de células ciliadas externas entre o tipo selvagem, *Nox3<sup>het/+</sup>* e *Nox3<sup>het/Nox3<sup>het</sup></sup>*. As células ciliadas externas foram preparadas por técnica de imuno-histoquímica (40x) com cócleas de camundongos expostos ao ruído (8B). A localização tonotópica correspondente à frequência de 8 kHz (vermelho = anti-miosina6 de coelho) demonstra uma pequena quantidade de células

ciliadas externas mortas (2 semanas após a exposição ao ruído).  $-/- = Nox3^{het}/Nox3^{het}$ .

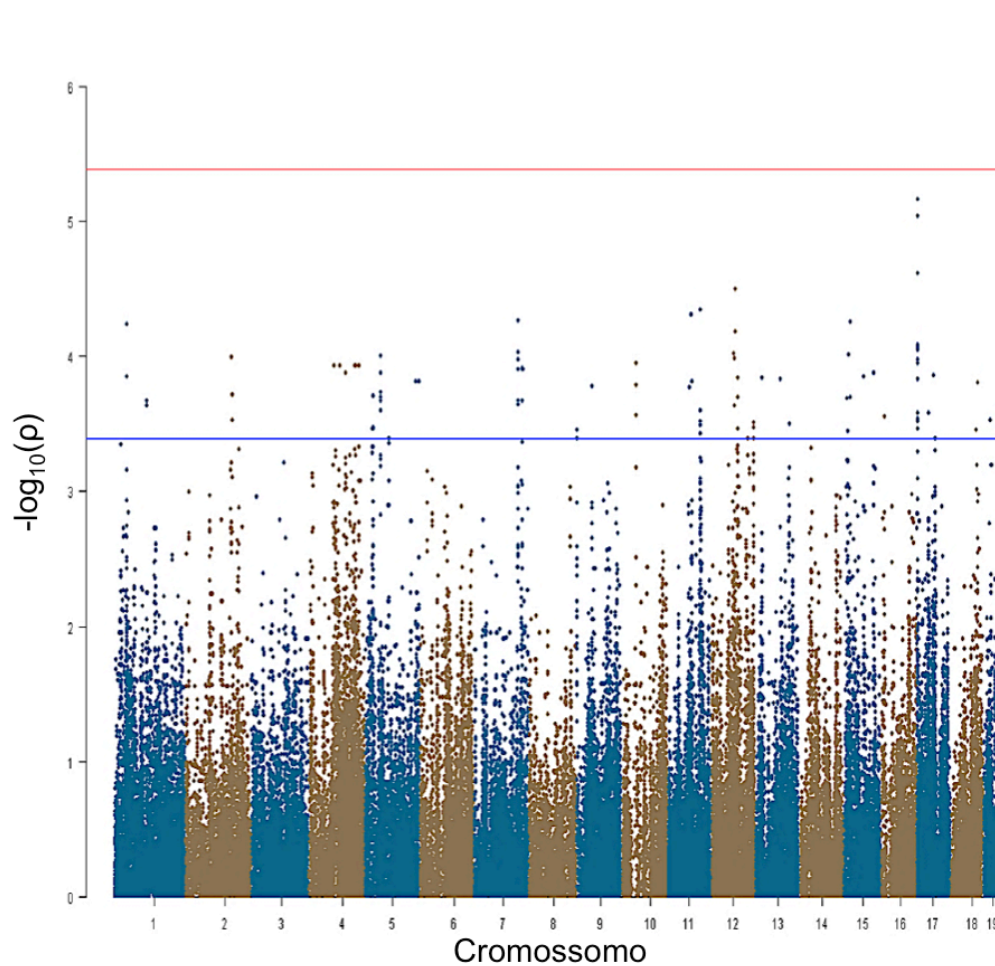
$-/+ = Nox3^{het}/+$ ;  $+/+ =$  tipo selvagem (linhagem C57BL/6JEiJ).



**Figura 9. Cocleograma sináptico em 8 kHz.** A contagem de bandas sinápticas foi mensurada na posição tonotópica correspondente à frequência de 8kHz na cóclea. Mesmo com a ausência de diferença estatística na contagem de células ciliadas externas, o camundongo do tipo selvagem demonstrou uma significativa maior densidade de bandas sinápticas/célula ciliada interna após a exposição ao ruído (9A). Projeções (60x, zoom 3x, imerso em óleo) de imagem confocal agrupada (9B)

demonstram bandas sinápticas de células ciliadas internas por imuno-histoquímica (verde = anti-CtBP2 de camundongo) antes e após a exposição ao ruído. -/- =  $Nox3^{het}/Nox3^{het}$ : -/+ =  $Nox3^{het}/+$ : +/+ = tipo selvagem.

## Informação de Apoio



**Figura S1. Resultados do estudo de associação do genoma inteiro com o Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP) para limiares auditivos após a exposição ao ruído na frequência de 4 kHz.** O *Manhattan Plot* demonstra valores p ( $-\log P$ ) das associações ( $-\log_{10}$ ) na frequência de 4 kHz em 64 de linhagens de camundongos consanguíneos. A análise foi realizada através de 108.064 polimorfismos com uma frequência alélica menor superior a 5%. O nível de significância na frequência de 4



kHz (rs33652818) é somente sugestivo e não alcança o limiar de significância dos estudos de associação do genoma inteiro ( $p=1,1 \times 10^{-4}$ ).

## Tabelas

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

Traço <sup>a</sup>	Cr.	Polimorfismo	Posição (Mb) <sup>b</sup>	-logP	MAF <sup>c</sup>	No. de Genes <sup>d</sup>	Região Humana (Cr.: Início Mb – Fim Mb)
4 kHz	17	rs33652818	3.8	1.1E-04	0.222	10	Chr6:155.0-155.7
8 kHz	2	rs27972902	68.1	8.58E-07*	0.222	2	Chr2:168.8-169.6
8 kHz	17	rs33652818	3.8	2.25E-06*	0.222	10	Chr6:155.0-155.7
16 kHz	15	rs32934144	28.2	1.74E-06*	0.389	2	Chr5:13.6-14.8
32 kHz	3	rs30795209	96.7	1.95E-07*	0.278	11	Chr1:145.6-147.4
32 kHz	15	rs32278602	22.3	5.86E-07*	0.389	2	Chr5:19.4-22.2

<sup>a</sup>Limiares auditivos após a exposição ao ruído em diferenças frequências

<sup>b</sup>Localização baseada na montagem do genoma (*NCBI Build37*)

<sup>c</sup>MAF, frequência alélica menor

<sup>d</sup>Número de genes na sequência de referência (*NCBI Build37 Assembly*) posicionados do intervalo de confiança (2,6 Mb) da associação.

\* Significância estatística em estudos de associação do genoma inteiro ( $p < 4,1 \times 10^{-6}$ )

Cr. = cromossomo

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

Gene	RefSeq	Cr	txInício (bp) <sup>a</sup>	txFim (bp) <sup>b</sup>	eQTL local P <sup>c</sup>
<b>Pias3</b>	ILMN_2631014	3	96696384	96706070	6.78E-02
<b>CD160</b>	ILMN_2707181	3	96798763	96829351	1.49E-02
<b>Gja8</b>	ILMN_2625168	3	96918863	96926020	3.09E-01

<b>Gja5</b>	ILMN_2678477	3	97032416	97053634	4.07E-01
<b>Tiam2</b>	ILMN_2836875	17	3326573	3519397	3.71E-01
<b>Tfb1m</b>	ILMN_2690441	17	3519263	3557713	1.08E-06

<sup>a</sup>txInicio, início da localização do transcrito (*NCBI Build3 genome assembly*).

<sup>b</sup>txFim, fim da localização do transcrito (*NCBI Build37 genome assembly*).

<sup>c</sup>Valor p estatisticamente significativo  $\leq 5,1E-04$  (Bonferroni corrigido para o número de sondas testadas)

*RefSeq* = genes da sequência de referência

## 7 ANEXOS



Keck School of Medicine of USC  
Zilkha Neurogenetic Institute  
Rick A. Friedman, MD, PhD

September 26, 2014

To Whom It May Concern:

I certify that the Ph.D. student and research fellow, Joel Lavinsky, conducted inner ear research activities at Zilkha Neurogenetic Institute and Department of Otolaryngology (Division of Otolology, Neurotology and Skull Base Surgery), University of Southern California under the supervision of Rick A. Friedman, MD, PhD between 2013-14.

I certify that Joel Lavinsky developed research regarding his doctoral thesis and performed all the activities planned in the research plan such as phenotyping, genome-wide association analysis, systems genetics approach, validation of knockout mouse models and inner ear immunohistochemistry. These experiments will be Joel Lavinsky's doctoral thesis as result of the joint PhD program between Federal University of Rio Grande do Sul and University of Southern California.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to be "R. Friedman", written on a light gray background.

Rick A. Friedman, MD, PhD  
Professor of Otolaryngology and Neurosurgery  
Director of Otolology and Neurotology & Skull Base Surgery  
Keck School of Medicine of the University of Southern California

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
SBN, Quadra 02, lote 06, Bloco L  
70.040-020 - Brasília, DF  
Brasil



July 1, 2013

To the Supervisor of our grantee

Dear Sir/Madam:

The Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education - Capes, is a Brazilian government agency for scholarship grants to graduate students at universities and research centers in Brazil and abroad; it is particularly concerned with the training of researchers in doctorate, doctorate 'sandwich,' and post-doctorate programs.

The purpose of the doctorate 'sandwich' is to give the opportunity to our grantees to do laboratory research and field work, attend seminars, and discuss their thesis topics with experts in their area of interest, instead of doing all of their doctorate work in Brazil. The purpose is to broaden their exposure and allow them to take advantage of a more comprehensive cross-fertilization. The duration of the doctorate sandwich varies from four to twelve months, and it is required that the students have their activities supervised during this period. Before the student returns to Brazil, the supervisor must send a written report to CAPES regarding the student's academic performance in terms of activities and progress.

In this regard, we would like to introduce you to our grantee Mr./Mrs. JOEL LAVINSKY who is doing his doctorate studies in Brazil, at the UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL under the supervision of Prof(a). LUIZ LAVINSKY.

Mr./Mrs. JOEL LAVINSKY has already fulfilled all the requirements demanded by the Brazilian program.

Sincerely Yours,

GERALDO NUNES SOBRINHO  
General Coordinator of Scholarships Abroad

KECK SCHOOL OF MEDICINE OF THE  
UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA

This is to certify that

*Joel Lavinsky, M.D., MSc*

has successfully completed

POSTDOCTORAL TRAINING

Department of Otolaryngology  
(Otology, Neurotology & Skull Base Surgery)

from August 31, 2013 - September 19, 2014

*Carroll Pelletier*

Dean

Chairman of Department



Keck Medical Center of USC  
&  
Ziffria Neurogenetic Institute

Institutional Affiliate

*Ziffria*

Program Director

## TERMO DE APROVAÇÃO E DE RESPONSABILIDADE - PDSE



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES  
SBN, Quadra 02, Lote 06, Bloco L  
70.040-020 Brasília – DF

C A P E S

Pelo presente termo eu, Luiz Lavinsky, de nacionalidade brasileira, residente e domiciliado em Rua Coronel Bordini, 752/501, na cidade de Porto Alegre-RS, portador do CPF 007.471.470-86, orientador da tese de Joel Lavinsky em programa de Doutorado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, aprovo o plano e o cronograma de atividades a serem realizadas pelo orientando Joel Lavinsky, no House Ear Institute, no período de 01/09/2013 a 31/08/2014, como parte dos estudos que desenvolve no Brasil sobre o tema de mapeamento genético das doenças da orelha interna.

Assumo o compromisso de manter a orientação e o acompanhamento do estudante, durante o período de realização do estágio no exterior, em conjunto com o coorientador da instituição estrangeira, na condução das atividades propostas no plano e cronograma ora aprovados, envidando esforços para que o estudante apresente o empenho desejado, visando tornar proveitosas as atividades desenvolvidas no exterior, que serão avaliadas por meio de relatórios periódicos.

Caso o estudante obtenha bolsa da CAPES, assumo também a responsabilidade de realçar a relevância de atendimento pelo doutorando dos compromissos e obrigações assumidos quando da assinatura de termo próprio perante essa agência, à época da implementação dos benefícios.

Local: Porto Alegre

Data: 10/06/2013

Assinatura do  
Orientador:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
SBN, Quadra 02, lote 06, Bloco L  
70.040-020 - Brasília, DF  
Brasil



**TERMO DE COMPROMISSO FIRMADO COM A CAPES PELA OUTORGA DE  
BOLSA PELO PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE DOUTORADO  
SANDUÍCHE NO EXTERIOR - PDSE**

Nº do Processo: BEX 7342/13-6  
Técnico: LEONARDO SILVA FERNANDES  
E-Mail: leonardo.silva@capes.gov.br

Pelo presente Termo de Compromisso, eu **JOEL LAVINSKY** brasileiro(a) residente e domiciliado(a) **RUA CORONEL BORDINE, 752 APTO. 501** na cidade de **PORTO ALEGRE - RS**, CEP: 90440001, portador do CPF nº 007.471.470-86 tendo em vista o seu afastamento do País, para realizar Estágio de doutorando junto a(ao) **UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS** com apoio da CAPES, assumo, em caráter irrevogável, os compromissos e obrigações que se seguem:

1. dedicar-me integralmente e exclusivamente ao desenvolvimento do plano de atividades relacionadas ao estágio no exterior, consultando previamente a CAPES sobre quaisquer alterações que almeje ou que possam ocorrer por motivos alheios;
2. não interromper ou desistir do programa sem que sejam fornecidas e acolhidas pela Diretoria Colegiada da CAPES as justificativas para análise do caso;
3. quando na condição de servidor público da União, Estado, Município, Autarquias ou Fundações públicas, observar o disposto do Decreto nº 91.800, de 18/10/1985, bem como os parágrafos 1º e 2º do artigo 95 da Lei 8.112, de 11/12/1990;
4. não acumular, bolsa, auxílio ou qualquer complementação de outra agência nacional ou estrangeira ou ainda salário no País de destino, exceto os auxílios recebidos a título de contribuir para o desenvolvimento das atividades inerentes ao estágio de doutorando, sem prejuízos no prazo estabelecido para a conclusão dos trabalhos, desde que comunicado e autorizado previamente pela CAPES. O acúmulo indevido é causa para a imediata rescisão da concessão da bolsa;
5. aceitar o montante pago a título de seguro saúde pela CAPES, desobrigando-a de qualquer responsabilidade relativa a eventual despesa médica, hospitalar e odontológica;
6. informar a CAPES, de imediato, mudanças de endereço residencial, profissional ou eletrônico, tanto durante a vigência da bolsa quanto após o retorno ao Brasil;
7. destacar a bolsa recebida nos trabalhos que publicar, no local destinado pelo periódico, mencionando: "Bolsista da CAPES - Proc. nº....". No caso de publicação em periódico ou livro internacional, a indexação do Brasil como país de autoria ou co-autoria deve ser identificada no campo de filiação institucional do autor (affiliation), nos seguintes termos: a) se houver vínculo empregatício com instituição brasileira, sua filiação à mesma; ou,

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
SBN, Quadra 02, lote 06, Bloco L  
70.040-020 - Brasília, DF  
Brasil



C A P E S

b) se negativo, a seguinte filiação: CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília - DF 70.040-020, Brazil;

8. retornar ao Brasil no prazo de até trinta dias após a conclusão do estágio, com a devida conclusão dos trabalhos propostos inicialmente, e permanecer no país após a defesa da tese, por período, no mínimo, igual ao que esteve no exterior;

9. atender às convocações da CAPES para participação de avaliação de cursos, de candidatos, de acompanhamento de bolsistas ou bolsistas egressos do exterior e de outras atividades relacionadas com a atuação da Fundação;

10. apresentar até sessenta dias, após o término do estágio: bilhete aéreo utilizado no retorno, relatório final, pareceres do(a) orientador(a) brasileiro(a) e do(a) co-orientador(a) estrangeiro(a) sobre o trabalho desenvolvido, manifestação da coordenação do programa de pós-graduação sobre o regresso do bolsista;

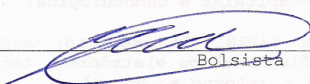
11. enviar para a CAPES, até sessenta dias após a defesa no Brasil, a cópia da ata de defesa da tese de doutorado;

12. ao publicar ou divulgar, sob qualquer forma, descoberta, invenção, inovação tecnológica ou outra produção, passível de privilégio decorrente da proteção de direitos de propriedade intelectual, obtida durante os estudos realizados com recursos do Governo brasileiro, comunicar à Capes, e prestar informações sobre as vantagens auferidas e os registros assecuratórios dos aludidos direitos em seu nome;

13. restituir o investimento apurado pela CAPES, atualizado pelo câmbio disponível na data da restituição, se identificado: pagamento indevido; interrupção dos estudos não autorizada; acúmulo indevido; revogação ou rescisão da concessão da bolsa, em face de infração às obrigações assumidas; inexatidão das informações fornecidas; não regresso ao Brasil no prazo fixado (item 8) ou não conclusão do programa de doutorado que permitiu o estágio.

Ao firmar o presente Termo, declara ciência de que a bolsa poderá ser suspensa, se houver indícios de inobservância aos termos do compromisso aqui assumido; e, cancelada, quando comprovados tais indícios; podendo, a juízo da Diretoria Colegiada da CAPES, ser cominada multa moratória de 10%.

PORTO ALEGRE, 10 de JULHO/13

  
Bolsista

Obs.: Remeter cópia do termo - datado e assinado - para o processo pela internet, e via original para a CAPES via correio tradicional.





June 7, 2013

Joel Lavinsky, M.D., MSc  
Clinica Lavinsky Otorrinolaringologia  
Rua Quintino Bocaiuva 673  
Moinhos de Vento  
90035003 Porto Alegre, RS - Brasil

To Whom May Concern:

This letter is to acknowledge that I approve the research plan on the topic, "High-Resolution Mapping of Susceptibility Genes for NIHL" for the student Joel Lavinsky at House Research Institute. Dr. Lavinsky will work under the supervision of Dr. Rick Friedman during the period September 1, 2013 until August 29, 2014.

Sincerely,

Neil Segil, Ph.D.  
Scientist III and  
Executive Vice President for Research  
House Research Institute  
2100 West Third Street  
Los Angeles, CA 90057

Tel. 213-273-8082  
FAX: 213-273-8088  
email: [nsegil@hei.org](mailto:nsegil@hei.org)  
URL: [http://www.hei.org/research/segil\\_index.html](http://www.hei.org/research/segil_index.html)

Department of Cell and Neurobiology  
Keck School of Medicine  
University of Southern California  
Los Angeles, CA

Co-Director, USC HRI Hearing and  
Communication Neuroscience  
Training Program



[The main body of the page contains several paragraphs of text that are almost entirely illegible due to severe digital corruption. The text is rendered as a dense field of vertical black and grey lines. There are a few small, distinct blue-colored segments within the text, which appear to be remnants of a link or a specific highlight. The layout includes a header section at the top, followed by several paragraphs of varying lengths, and a footer section at the bottom right.]



July 31, 2013

Joel Lavinsky, M.D., MSc.  
Clinica Lavinsky Otorrinolaringologia  
Rua Quintino Bocaiuva 673  
Moinhos de Vento  
90035003 – Porto Alegre, RS – Brasil

### Letter of Acceptance

This letter is to acknowledge that the brazilian Ph.D. student Dr. Joel Lavinsky was accepted as a research scholar at the House Research Institute (HRI) and University of Southern California (USC). I certify that the student will work in the research labs of the institution and have proficiency in english required. The research scholar activities will be under the guidance of Dr. Rick Friedman during the period of September 1, 2013 until August 29, 2014.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Rick Friedman', with a long horizontal line extending to the right.

Dr. Rick Friedman, Ph.D.

House Research Institute  
2100 West Third Street  
email: [rfriedman@hei.org](mailto:rfriedman@hei.org)  
Los Angeles, CA 90057  
Department of Cell and Neurobiology  
University of Southern California  
Los Angeles, CA

**PARA USO DA COORDENAÇÃO DO PROGRAMA**



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES  
 SBN, Quadra 02, Lote 06, Bloco L  
 70.040-020 Brasília – DF

**TERMO DE SELEÇÃO DE CANDIDATURA AO PDSE**

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
 PROGRAMA: Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas  
 DATA: 03/06/2013 LOCAL: Porto Alegre

**COMISSÃO (Indicar todos os membros da Comissão, inclusive o participante externo\*)**

NOME	INSTITUIÇÃO	CARGO/FUNÇÃO	ASSINATURA
1. José Carlos Soares Fraga	UFRGS	Coordenador	[Assinatura]
2. ROBERTO D. ANGELI	UFRGS	REP. D. UCEUTE	[Assinatura]
3. JOSÉ TAÍRES LUBIANCA NETO	UFCS/PA	PROFESSOR	[Assinatura]
4. BENAMI BACALCHUK	UPF	PROFESSOR CON DOMICÍLIO	[Assinatura]
5.			

Roberto D. Angeli  
 Biólogo  
 22291  
 José Taíres Lubianca Neto  
 otorinolaringologista  
 CREMERS 18937

**PARECER FINAL JUSTIFICANDO A ESCOLHA DO CANDIDATO SELECIONADO**

NOME DO(S) CANDIDATO(S): Joel Lavinsky

PARECER:

O aluno Dr. Joel Lavinsky, de origem russa, realiza pesquisa experimental sobre investigações genéticas de doenças de caráter autoimune em um grupo candidato a recolocação de Universidade de Colômbia. O Dr. Joel foi aluno de mestrado em nosso curso de Pós-graduação tendo apresentado sua dissertação no tempo prescrito, tendo demonstrado grande interesse em pesquisa, embecimento, no caso de estudo, com outros relacionamentos em colegas e visitantes.

Devido a esta capacidade foi selecionado pelo Dr. Joel, associo do a seu trabalho mestrado sobre mecanismos genéticos de susceptibilidade a doença, tendo certeza que ele é candidato ideal a bolsa de doutorado sanduíche.

Está disponível para qualquer esclarecimento.

Incessantemente

Prof. Dr. José Carlos Soares de Fraga  
 Coordenador do PPG em Medicina  
 Ciências Cirúrgicas  
 Faculdade de Medicina – UFRGS