

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas



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

GUILHERME KASPERBAUER

Orientador: Prof. PhD. Joel Lavinsky

Dissertação de Mestrado

2020

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas



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

GUILHERME KASPERBAUER

Orientador: Prof. PhD. Joel Lavinsky

Dissertação de Mestrado

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Kasperbauer, Guilherme

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

113 f.

Orientador: Joel Lavinsky.

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

5. ARTIGO EM LÍNGUA INGLESA.....	69
6. VERSÃO DO ARTIGO EM LÍNGUA PORTUGUESA.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA — Análise de variância

CAT — Catalase

CCE — Células ciliadas externas

CCI — Células ciliadas internas

CDH23 — Caderina 23

Cx26 — Conexina 26

dB — Decibel

DCLK1 — *Doublecortin-like kinase 1*

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

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

dfw — *deaf waddler*

EMMA — *Efficient Mixed-Model Association*

EOAs — Emissões otoacústicas

EOAPD — Emissões otoacústicas por produto de distorção

EPI — Equipamento de proteção individual

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

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

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

GJB2 — *Gap junction beta-2*

GPX1 — Glutaciona peroxidase

GRM7 — *Glutamate receptor, metabotropic, 7*

GRM8 — *Glutamate receptor, metabotropic, 8*

GSH — Glutaciona reduzida

GSR — Glutaciona redutase

GSSG — Glutaciona dissulfato

GST — Glutaciona S-transferase

GTM — *Genome-tagged mice*

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

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

HMDP — *Hybrid Mouse Diversity Panel*

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

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

Hz — Hertz

IRF — Índice de reconhecimento de fala

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

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

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

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

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

LRF — Limiar do reconhecimento de fala

mdfw — *Modifier deaf waddler*

mGluR7 — *Metabotropic glutamate receptor type 7*

MYH14 — Miosina 14

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

NOX NADPH — Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase não fagocítica

NPS — Nível de pressão sonora

NS SNP — Polimorfismo de base única não sinônimo

PAIR — Perda auditiva induzida por ruído

PBS — *Phosphate buffer saline*

PCA — Programa de Conservação Auditiva

PCDH15 — Protocaderina 15

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

PEATE — Potencial evocado auditivo de tronco cerebral

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

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

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

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

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

SLC12A2 — Membro 2 da família 12 de carreador de soluto

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

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

SOD1 — Superóxido dismutase 1

SOD2 — Superóxido dismutase 2

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

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

5. M. Sliwinska-Kowalska, M. Pawelczyk. Contribution of genetic factors to noise-induced hearing loss: a human studies review *Mutat. Res.*, 752 (2013), pp. 61-65. doi:10.1016/j.mrrev.2012.11.001
6. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, et al. Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (Sod1) increases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Audiol Neurotol.* 1999;4(5):237-246. doi:10.1159/000013847
7. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Lear PM, Ho YS. *Assoc Res Otolaryngol.* 2000;1(3):243-254. doi:10.1007/s101620010043
8. Kozel PJ, Davis RR, Krieg EF, Shull GE, Erway LC (2002) Deficiency in plasma membrane calcium ATPase isoform 2 increases susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear Res* 164: 231 –239. doi:10.1016/s0378-5955(01)00420-8
9. Holme RH, Steel KP. Progressive hearing loss and increased susceptibility to noise-induced hearing loss in mice carrying a *Cdh23* but not a *Myo7a* mutation. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2004;5(1):66-79. doi:10.1007/s10162-003-4021-2

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PERDA AUDITIVA INDUZIDA POR RUÍDO

2.1.1 Epidemiologia

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

2.1.2 Fisiopatologia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.1.3 Quadro Clínico

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

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

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

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

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

2.1.4 Diagnóstico

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.1.5 Tratamento

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

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

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

2.2 A GENÉTICA DA PERDA AUDITIVA INDUZIDA POR RUÍDO

2.2.1 Descoberta de Genes da PAIR em Humanos

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

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

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

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

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

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

2.2.1.1 Estudos de associação do genoma inteiro

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

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

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

2.2.1.2 Genes de Estresse Oxidativo

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2.1.3 Genes do Ciclo do Potássio

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2.1.4 Formas Monogênicas de Surdez

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

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

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

2.2.1.5 Outros genes

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

Outro gene candidato, o GRM7, atua codificando o receptor 7 metabotrófico do glutamato (mGluR7). Esse receptor mantém a fenda sináptica entre as células ciliadas

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

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

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

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

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

2.2.2 Descoberta dos Genes da PAIR em Camundongos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.3 REFERÊNCIAS DA BASE TEÓRICA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

77. Kozel PJ, Davis RR, Krieg EF, Shull GE, Erway LC. Deficiency in plasma membrane calcium ATPase isoform 2 increases susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear Res.* 2002 Feb;164(1-2):231–9.
78. Holme RH, Steel KP. Progressive hearing loss and increased susceptibility to noise-induced hearing loss in mice carrying a *Cdh23* but not a *Myo7a* mutation. *J Assoc Res Otolaryngol JARO.* 2004 Mar;5(1):66–79.
79. Kujawa SG, Liberman MC. Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: evidence of a misspent youth. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2006 Feb 15;26(7):2115–23.
80. Frisina RD, Singh A, Bak M, Bozorg S, Seth R, Zhu X. F1 (CBA×C57) mice show superior hearing in old age relative to their parental strains: hybrid vigor or a new animal model for “golden ears”? *Neurobiol Aging.* 2011 Sep;32(9):1716–24.
81. Alagramam KN, Murcia CL, Kwon HY, Pawlowski KS, Wright CG, Woychik RP. The mouse Ames waltzer hearing-loss mutant is caused by mutation of *Pcdh15*, a novel protocadherin gene. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):99–102.
82. Di Palma F, Holme RH, Bryda EC, Belyantseva IA, Pellegrino R, Kachar B, et al. Mutations in *Cdh23*, encoding a new type of cadherin, cause stereocilia disorganization in waltzer, the mouse model for Usher syndrome type 1D. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):103–7.
83. Schrauwen I, Ealy M, Huentelman MJ, Thys M, Homer N, Vanderstraeten K, et al. A genome-wide analysis identifies genetic variants in the *RELN* gene associated with otosclerosis. *Am J Hum Genet.* 2009 Mar;84(3):328–38.

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

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

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

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

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

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

3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

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

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

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

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

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

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

5. ARTIGO EM LÍNGUA INGLESA

Noise Exposure and Distortion Product Otoacoustic Emission Suprathreshold Amplitudes: A Genome-Wide Association Study

Abstract

Although several candidate-gene association studies have been conducted to investigate noise-induced hearing loss (NIHL) in humans, most are underpowered, unreplicated and account for only a fraction of the genetic risk. Mouse genome-wide association studies (GWASs) have revolutionized the field of genetics and have led to the discovery of hundreds of genes involved in complex traits. The Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP) is a collection of classic inbred and recombinant inbred strains whose genomes have been either genotyped at high resolution or sequenced. To further investigate the genetics of NIHL, we report the first GWAS based on distortion product otoacoustic emission (DPOAE) measurements and the HMDP.

A total of 102 strains ($n = 635$) from the HMDP were evaluated based on DPOAE suprathreshold amplitudes before and after noise exposure. DPOAE amplitude variation was set at 60 dB and 70 dB SPL of the primary tones for each frequency separately (8, 11.3, 16, 22.6, and 32 kHz). These values provided an indirect assessment of outer hair cell integrity. Six-week-old mice were exposed for 2 hours to 10 kHz octave-band noise at 108 dB SPL. To perform local expression quantitative trait locus (eQTL) analysis, gene expression microarray

profiles were generated using cochlear RNA from 64 hybrid mouse strains (n = 3 arrays per strain).

Several new loci were identified and positional candidate genes associated with NIHL were prioritized, especially after noise exposure (1 locus at baseline and 5 loci after exposure). A total of 35 candidate genes in these 6 loci were identified with at least 1 probe whose expression was regulated by a significant *cis*-eQTL in the cochlea. After careful analysis of the candidate genes based on cochlear gene expression, 2 candidate genes were prioritized: *Eya1* (baseline) and *Efr3a* (post-exposure).

For the first time, an association analysis with correction for population structure was used to map several loci for hearing traits in inbred strains of mice based on DPOAE suprathreshold amplitudes before and after noise exposure. Our results identified a number of novel loci and candidate genes for susceptibility to NIHL, especially the *Eya1* and *Efr3a* genes. Our findings validate the power of the HMDP for detecting NIHL susceptibility genes.

Introduction

According to the Centers for Disease Control, up to 25% of the U.S. adult population may develop noise-induced hearing loss (NIHL) [Kujawa & Liberman, 2009; Liberman, 2017]. In addition to human injury, NIHL generates a considerable economic impact. An estimated \$1.2 billion are spent annually in the United States on disability compensation for NIHL [Yankaskas, 2013].

There is evidence for a genetic contribution to NIHL. A study evaluating the genetic component of NIHL in twins showed an approximately 36% contribution of inheritance to this condition [Heinonen-Guzejev et al., 2004]. Elucidating specific genetic effects is critical to

understanding complex diseases such as NIHL. Although some studies of gene-environment interactions in human hearing loss have been conducted, only a few of them have been replicated to date [Lavinsky et al., 2015].

A major difficulty in human studies is the inability to control or quantify environmental exposures consistently, which results in a lack of well-characterized and well-monitored populations for study. This is notably the case of NIHL, for which only a few ill-designed and poorly characterized studies have been published [Lavinsky et al., 2015]. For this reason, many researchers are turning to animal model organisms.

The study of hearing loss in mouse models appears to be a valid method, since the mouse inner ear is structurally similar to the human inner ear and their genetic material is homologous to a considerable extent. This can create an identical environment that avoids confounding factors and allows analysis through a genome-wide association study (GWAS) using inbred mouse lines from the Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP).

Studies evaluating NIHL in mice have characterized different susceptibility genes for NIHL using different methods [Sliwinska-Kowalska & Pawelczyk, 2013]. An example is the identification that some mouse strains (C57BL/6J) are more susceptible to noise than others [Erway et al., 1996]. Knockout mice tested by auditory brainstem response (ABR) with targeted mutation of $SOD1^{-/-}$ [Ohlemiller et al., 1999], $GPX1^{-/-}$ [Ohlemiller et al., 2000], and $PMCA2^{-/-}$ [Kozel et al., 2002] were more sensitive to noise than their wild-type littermates. $CDH23^{+/-}$ mice were also characterized as more susceptible to noise [Holme & Steel, 2004], with their auditory function tested by measuring compound action potential (CAP) thresholds.

Lavinsky et al. (2015), in a GWAS with correction for population structure, described for the first time the mapping of several susceptibility loci for NIHL in inbred mouse strains using ABR. The analysis revealed a genome-wide significant peak on chromosome 17 within a haplotype block containing NADPH oxidase-3 (*Nox3*), providing evidence to support its role in susceptibility to NIHL. In addition, frequency-specific genetic susceptibility to hearing loss after noise exposure was demonstrated within the mouse cochlea [Lavinsky et al., 2015].

Based on what has already been discovered, this study aimed to investigate other auditory phenotypes using a different method of auditory assessment, the distortion product otoacoustic emission (DPOAE) suprathreshold amplitude. This method indirectly assesses the outer hair cells, which are affected both before and after noise exposure.

Materials and Methods

Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP)

A detailed description of the HMDP (strain selection, statistical power, and mapping resolution) is provided by Bennett et al. (2010). Four 4-week-old female mice of each HMDP strain were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Only female mice were tested to avoid potential confounding effects of sex. The mice were allowed to acclimate to a common environment for 1 week (until 5 weeks of age). We used 5-week-old mice to minimize potential effects of age-related hearing loss that could contribute to our phenotype. All mice were fed a standard chow diet until sacrifice.

Genotyping

Classic inbred and recombinant inbred strains were previously genotyped by the Broad Institute (www.mousehapmap.org). Of the 140,000 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) available, 108,064 were informative and used in the association analysis.

Noise Exposure Protocol

Using a method adapted from Kujawa and Liberman (2009), at 5 weeks of age, mice were exposed for 2 hours to 10 kHz octave-band noise (OBN) at 108 dB SPL. The noise exposure protocol was previously described by White et al. (2009). The cage was arranged in a soundproof chamber (MAC-1) created by Industrial Acoustics (IAC, Bronx, NY). The sound chamber was lined with soundproofing acoustic foam. Noise recordings were performed with a speaker (Fostex FT17H Tweeter) built on the top of the sound chamber. Harmful noise was calibrated with a B&K sound level meter, with a variation of 1.5 dB across the cage. The mice were placed in a circular exposure cage with 4 compartments and, for 2 hours, they were allowed to move around within the compartment. Testing involved the right ear only.

Determination of DPOAE Suprathreshold Amplitudes

DPOAEs were analyzed as input/output functions at $2f_1-f_2$ (primary measure). The primary tones were set at a ratio of $f_2/f_1 = 1.2$, with f_2 ranging from 8 to 32 kHz (f_2 level adjusted at 10 dB lower than f_1 level) and L_2 ranging from 60 to 70 dB. The noise level was calculated as the average of 6 spectral points (above and below $2f_1-f_2$). Both waveform and spectral mean DPOAEs were then extracted. The L_2 level required to produce 0 dB SPL with signal-to-noise ratio (SNR) was 3 dB. DPOAE amplitude variation was set at 60 dB and 70 dB

SPL of the primary tones for each frequency separately. These values provided an indirect assessment of outer hair cell integrity.

Results

Genome-Wide Association Analysis of NIHL Reveals Frequency-Specific Genetic Susceptibility

The efficient mixed-model association (EMMA) algorithm was applied to each phenotype separately to identify genetic associations for the 6 tone-burst stimuli [Kang et al., 2008]. Adjusted association p-values were calculated for the 108,064 SNPs with minor allele frequency > 5% ($p < 0.05$ genome-wide equivalent for genome-wide association using EMMA in the HMDP is $p = 4.1 \times 10^{-6}$, $-\log_{10}p = 5.39$). At this threshold, genome-wide significant associations were identified on chromosome 1 at baseline and on chromosomes 2, 3, 15, and 16 after noise exposure.

GWAS and DPOAE Suprathreshold Amplitudes at Each Frequency Tested

An association analysis was performed for each phenotype separately in order to identify genetic associations. A GWAS was performed both at baseline (Figure 1A) and after noise exposure (Figure 1B, 1C, 1D, and 1E) to identify NIHL-associated loci at the various frequencies tested.

Association Analysis and Regional Plots

At baseline, a DPOAE association exceeding the genome-wide significance threshold was identified on chromosome 1 (Figure 2A). After exposure, the associations were statistically significant on chromosome 2 (Figure 2B and 2C), chromosome 15 (Figure 2D), chromosome 16 (Figure 2E), and chromosome 3 (Figure 2F).

Prioritizing Our Candidate Genes

Our cochlear expression data allowed us to analyze all 144 candidate genes in each association interval. Genes were identified within each of the intervals regulated by a local expression quantitative trait locus (eQTL). In order to perform eQTL analysis, gene expression microarray profiles were generated using cochlear RNA from 64 hybrid mouse strains ($n = 3$ arrays per strain). Subsequently, EMMA was used to perform an association analysis between all SNPs and array probes mapping within each region. After excluding the probes that overlapped SNPs present among the classic inbred strains used in the HMDP, as described in the methods, 18,138 genes were represented by at least 1 probe.

Loci in which peak SNPs mapped within 2 Mb of the gene whose expression was regulated were considered “local” or *cis*-acting eQTLs, while SNPs mapped elsewhere were considered “distal” and presumably *trans*-acting eQTLs. The significant p-value cutoff ($p = 1 \times 10^{-6}$) was calculated for local and distal associations. These genes were prioritized based on whether they were regulated by a local eQTL.

A total of 35 genes in the 6 identified loci had at least 1 probe whose expression was regulated by a significant *cis*-eQTL in the cochlea (Table 1). The functions of candidate genes and associated diseases are shown in Table 2.

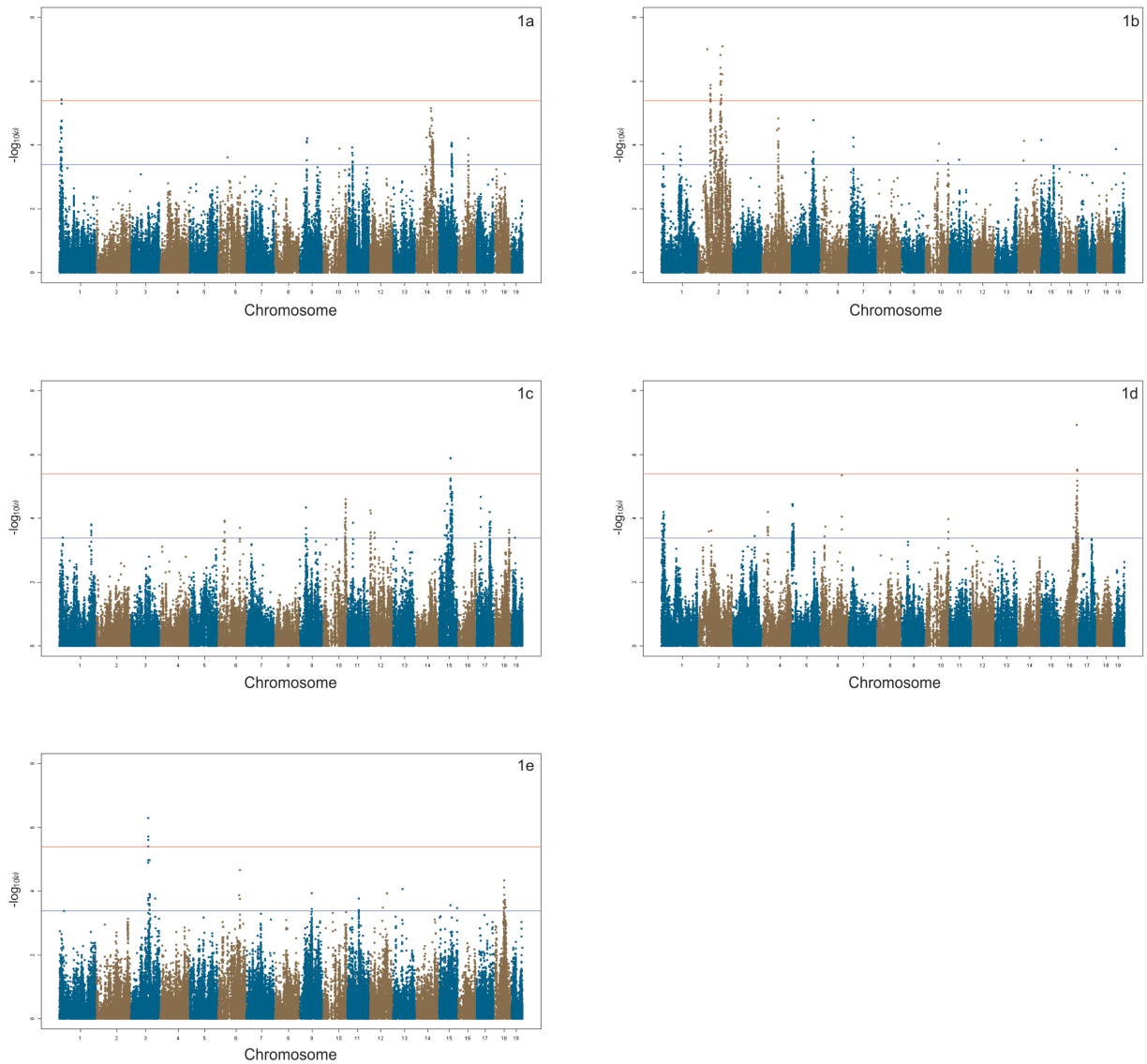


Figure 1: Manhattan Plots: DPOAE GWAS Association peaks ($-\log_{10}$) of p-values ($-\log_{10}p$) for 32 kHz - 70 dB (**1a**) before noise exposure and 8 kHz - 70 dB (**1b**), 11.3 kHz - 70 dB (**1c**), 16 kHz - 60 dB (**1d**), and 32 kHz - 70 dB (**1e**) after noise exposure (HMDP inbred strains). Analysis was performed using approximately 200,000 SNPs with minor allele frequency > 5%. Each chromosome is plotted on the x-axis in alternating brown and blue colors.

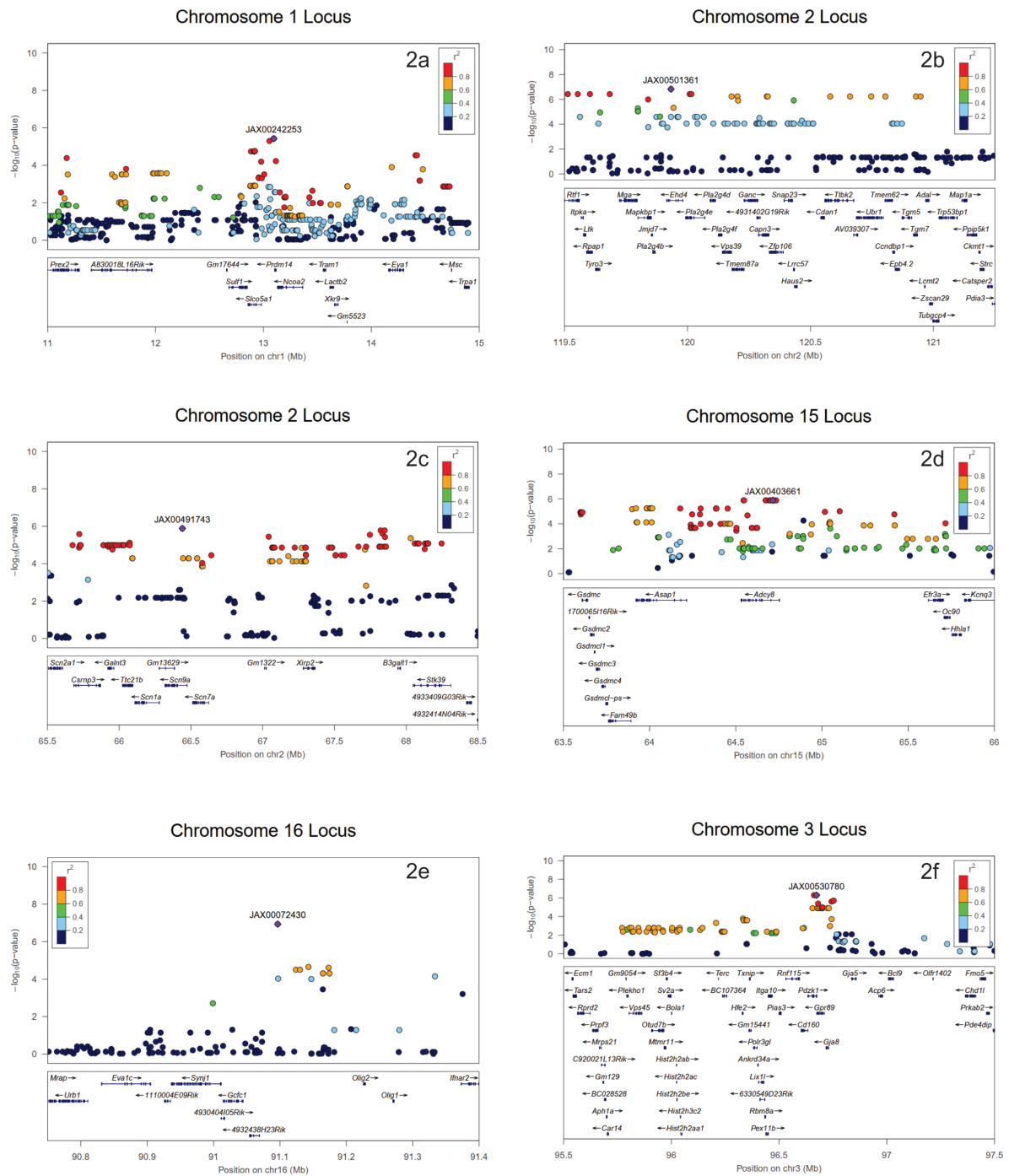


Figure 2. Association peak centered on the lead SNP for 32 kHz - 70 dB (**2a**) before noise exposure and 8 kHz - 70 dB (**2b and 2c**), 11.3 kHz - 70 dB (**2d**), 16 kHz - 60 dB (**2e**), and 23 kHz - 70 dB (**2f**) after noise exposure (HMDP inbred strains). The blue diamond represents the most significant SNP. Other SNPs are colored based on their linkage disequilibrium (LD), as follows: 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 genomic sites (NCBI Build 37).

Discussion

This study evaluated pre- and post-noise exposure auditory variation in mice by means of genome-wide association analysis using the HMDP and DPOAE suprathreshold amplitudes. The HMDP has been previously used successfully in the genomic mapping of blood cell traits in mice [Davis et al., 2013], in genomic association and systems genetics in mice by identifying *Asxl2* as a regulator of bone mineral density and osteoclastogenesis [Farber et al., 2011], in the genetic regulation of atherosclerotic plaque size and morphology in the innominate artery of hyperlipidemic mice [Bennett et al., 2009], in the identification of gene networks associated with conditional fear in mice using a systems genetics approach [Park et al., 2011], in the genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice [Parks et al., 2013], in the identification of *Nox3* as a critical gene for susceptibility to NIHL [Lavinsky et al., 2015], and in diabetes [Parks et al., 2013] and heart failure [Rau et al., 2015]. In many of these studies, including the present GWAS, the use of modified mouse models allowed the genes in the identified loci to be validated as the causal genes, and several of them matched loci identified in human GWASs.

The present GWAS generated significant associations in 1 region at baseline and in 5 separate regions after exposure to noise, resulting in 144 candidate genes of which 35 in these 6 loci were identified with at least 1 probe whose expression was regulated by a significant *cis*-eQTL in the cochlea. After careful analysis of the candidate genes based on cochlear gene expression and after a review of the current literature, 2 main candidate genes were prioritized: *Eya1* (baseline) and *Efr3a* (post-exposure).

Table 1. Association peaks of candidate genes within *cis*-regulated eQTLs in the cochlea.^atxStart, location of transcription (NCBI Build 37 genome assembly) start.

Gene	RefSeq	Chr	txStart (bp) ^a	txEnd (bp) ^b	Local eQTL P ^c
<i>Xkr9</i>	ILMN_3159558	1	13668771	13701723	1.79E-01
<i>Eya1</i>	ILMN_2638487	1	14168954	14310200	6.26E-03
<i>Msc</i>	ILMN_2769777	1	14753346	14755966	2.50E-04
<i>Mapkbp1</i>	ILMN_2873793	2	119972699	120027408	3.77E-02
<i>Pla2g4d</i>	ILMN_3156124	2	120265595	120289197	4.79E-02
<i>Ltk</i>	ILMN_1219860	2	119751320	119760431	6.37E-02
<i>Rpap1</i>	ILMN_2602151	2	119763304	119787537	1.65E-02
<i>Pla2g4f</i>	ILMN_2727722	2	120299957	120314165	1.03E-03
<i>Vps39</i>	ILMN_3129752	2	120316461	120353137	1.52E-02
<i>Tmem87a</i>	ILMN_2969172	2	120355312	120404113	1.57E-02
<i>Ganc</i>	ILMN_2791355	2	120403896	120461700	1.85E-01
<i>Zfp106</i>	ILMN_2482427	2	120506820	120563843	2.30E-01
<i>Tgm5</i>	ILMN_2690147	2	121046111	121085841	3.14E-01
<i>Ccndbp1</i>	ILMN_1240178	2	121008403	121016904	3.18E-01
<i>Adal</i>	ILMN_1242772	2	121140428	121156680	3.35E-01
<i>Trp53bp1</i>	ILMN_1243753	2	121193281	121271407	3.80E-02
<i>Tubgcp4</i>	ILMN_1257622	2	121170654	121198770	3.82E-01
<i>Adcy8</i>	ILMN_2607127	15	64699042	64922296	3.79E-01
<i>Olig1</i>	ILMN_2760105	16	91269769	91271939	2.14E-06
<i>Ifnar2</i>	ILMN_2598703	16	91485238	91507441	6.66E-07
<i>Gpr89</i>	ILMN_2953098	3	96868281	96905346	3.07E-02
<i>Cd160</i>	ILMN_2707181	3	96798763	96829351	1.49E-02
<i>Fmo5</i>	ILMN_1230890	3	97628804	97655282	3.52E-01
<i>Chd1l</i>	ILMN_2986172	3	97560742	97610203	1.57E-02
<i>Pde4dip</i>	ILMN_3064283	3	97689824	97888707	4.00E-01
<i>Ankrd34a</i>	ILMN_3020599	3	96596636	96599775	6.43E-02
<i>Rbm8a</i>	ILMN_1252850	3	96629928	96633779	6.80E-02
<i>Pex11b</i>	ILMN_1258372	3	96635376	96653101	1.64E-01
<i>Sv2a</i>	ILMN_1213495	3	96181151	96195521	3.01E-01
<i>Mtmt11</i>	ILMN_2676662	3	96162004	96171718	3.77E-01
<i>Hist2h2ac</i>	ILMN_1218380	3	96220361	96220880	4.10E-01

<i>Hist2h2be</i>	ILMN_1231066	3	96221121	96223738	9.24E-03
<i>Prpf3</i>	ILMN_2941430	3	95830124	95855885	5.17E-02
<i>BC028528</i>	ILMN_2656422	3	95883954	95892005	2.21E-01
<i>Aph1a</i>	ILMN_1232821	3	95893969	95898288	3.09E-02

^atxStart, location of transcription (NCBI Build 37 genome assembly) start.

^btxEnd, location of transcription (NCBI Build 37 genome assembly) end.

^cStatistically significant p-value $\leq E-06$ (Bonferroni corrected for the number of probes tested).

The *Eya1* gene, which was present with a significant association peak at baseline at 32 kHz - 70 dB intensity, is a gene-encoding protein that acts on other genes, thus being considered a transcription factor. It is interesting to note that the so-far identified functions of *Eya1* correlate with certain forms of genetic hearing loss in humans and normal cochlear development [Xu et al., 2017]. The *Eya1* protein interacts with several other proteins by activating and inactivating genes that are important for normal development. Key roles include the development of the second branchial arch, which gives rise to the tissues of the neck, eyes, ears, and kidneys [Kochhar et al., 2007].

The *Eya1* gene has grown in prominence with the discovery of its expression in mammalian cochlear stem cells. A population of *Eya1*-expressing progenitor cells capable of differentiating into hair cells, characterization of this cell population (*Eya1*-positive) provided a new cellular source with potential for cochlear repair and regeneration [Xu et al., 2017].

Furthermore, *Eya1* gene mutations are the most common cause of the branchio-otorenal (BOR) syndrome. More than 80 pathogenic mutations were identified in *Eya1* in different

Table 2. Biological processes and phenotypes associated with *cis*-eQTL candidate genes. Retrieved from ensembl.org. Copyright 2020.

Gene	Chr	Biological process	Phenotype
<i>Xkr9</i>	1	Apoptosis	Prostatic neoplasms
<i>Eya1</i>	1	Kidney, eye, and ear development	Branchio-oto-renal syndrome
<i>Msc</i>	1	Regulation of transcription by RNA polymerase II	Adolescent idiopathic scoliosis; Alzheimer disease
<i>Mapkbp1</i>	2	Negative regulation of interleukin-8 production	Nephronophthisis
<i>Pla2g4d</i>	2	Glycerophospholipid catabolic process	-
<i>Ltk</i>	2	Signal transduction	Type 2 diabetes
<i>Rpap1</i>	2	Transcription by RNA polymerase II	-
<i>Pla2g4f</i>	2	Phospholipid metabolic process	Stroke
<i>Vps39</i>	2	Late endosome to lysosome transport	Breast neoplasms; Schizophrenia
<i>Tmem87a</i>	2	-	Stroke
<i>Ganc</i>	2	Carbohydrate metabolic process	-
<i>Zfp106</i>	2	-	Amyotrophic lateral sclerosis
<i>Tgm5</i>	2	Peptide cross-linking	Peeling skin syndrome
<i>Ccndbp1</i>	2	Regulation of cell cycle	-
<i>Adal</i>	2	Nucleotide metabolic process	Thrombocytopenia
<i>Trp53bp1</i>	2	DNA damage checkpoint	Thymus hypoplasia
<i>Tubgcp4</i>	2	Cytoplasmic microtubule organization	Autosomal recessive chorioretinopathy-microcephaly syndrome
<i>Adcy8</i>	15	Adenylate cyclase-activating G protein-coupled receptor signaling pathway	Chronic kidney disease; myocardial infarction
<i>Olig1</i>	16	Regulation of transcription, DNA-templated	Albuminuria
<i>Ifnar2</i>	16	Cell surface receptor signaling pathway	Immunodeficiency
<i>Gpr89</i>	3	Ion transmembrane transport	Autism spectrum disorder; Schizophrenia
<i>Cd160</i>	3	Regulation of adaptive immune response	Schizophrenia

<i>Fmo5</i>	3	Oxidation-reduction process	Autism spectrum disorder; chromosome 1q21.1 deletion syndrome
<i>Chd11</i>	3	Nucleotide-excision repair, preincision complex assembly	Congenital anomalies of kidney and urinary tract; type 2 diabetes
<i>Pde4dip</i>	3	Cellular protein-containing complex assembly; regulation of Golgi organization	Breast, central nervous system, gastrointestinal, and skin tumors
<i>Ankrd34a</i>	3	-	-
<i>Rbm8a</i>	3	RNA processing	Thrombocytopenia-absent radius syndrome
<i>Pex11b</i>	3	Peroxisome proliferation	Peroxisome biogenesis disorder; neonatal adrenoleukodystrophy; infantile refsum disease
<i>Sv2a</i>	3	Chemical synaptic transmission; regulation of gamma-aminobutyric acid secretion; cellular calcium ion homeostasis	Seizures
<i>Mtmr11</i>	3	Phosphatidylinositol dephosphorylation	Adolescent idiopathic scoliosis
<i>Hist2h2ac</i>	3	DNA binding	-
<i>Hist2h2be</i>	3	Antibacterial humoral response; negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway	-
<i>Prpf3</i>	3	RNA binding	Retinitis pigmentosa
<i>BC028528</i>	3	-	-
<i>Aph1a</i>	3	Notch receptor processing; beta-amyloid precursor protein	Bipolar disorder; schizophrenia

supporting cells, and ganglion cells after hair cell ablation up to 1 week of age was identified in mice. The identification of cochlear regeneration after birth in mammals and the populations

[Zhang et al., 2004]. BOR syndrome is a rare autosomal dominant disorder characterized by sensorineural, mixed, or conductive hearing loss, branchial fistulas or cysts, preauricular pits, ear malformations, and renal anomalies.

Another important correlation was the confirmation that the inactivation of *Eya1* and *Six1* in mice results in a significant alteration in ear development owing to an early interruption of development at the otocyst stage [Zheng et al., 2003]. Another robust evidence was the discovery of the involvement of *Eya1/Six1* in hair cell development and their coexpression in mouse cochlear explants. Expression of these genes was sufficient to induce hair cell fate in the nonsensory epithelium expressing low-level *Sox2* by activating not only *Atoh1*-dependent but also *Atoh1*-independent pathways, and both pathways induce *Pou4f3* to promote the differentiation of hair cells [Ahmed, 2012].

Efr3a is our main candidate gene, which was found at the frequency of 11.3 kHz at 70 dB after noise exposure. It encodes a plasma membrane protein whose insufficiency has been initially reported to increase the survival of hippocampal neurons in adult mice. This is the first correlation of the gene with NIHL, which has been further investigated in age-related hearing loss and ototoxicity. These findings are in agreement with previous studies investigating *Efr3a* expression in the auditory neural pathway, which is upregulated soon after hair cell destruction. The impact of *Efr3a* insufficiency has also been evaluated by the functional and morphological comparison of the cochlea between *Efr3a*-deficient mice and their wild-type littermates. The present study suggests that *Efr3a* deficiency is associated with less severe hearing loss after ototoxic exposure and confirms greater morphological damage to cochlear spiral ganglion neurons. These beneficial effects of *Efr3a* deficiency can be attributed to increased expression

of some neurotrophic factors and their receptors, thus suppressing neurodegeneration [Hu et al., 2017].

Our finding is also consistent with another recent finding from research into age-related hearing loss that *Efr3a* deficiency results in better hearing function in senescent mice (at 10 and 12 months of age). It was demonstrated that *Efr3a*-deficient senescent mice had less severe degeneration of cochlear spiral ganglion neurons in the basal turn; when degeneration occurred, it occurred later [Hu et al., 2016].

Moreover, ototoxic injury in mice showed to rapidly induce hair cell loss, resulting in progressive degeneration of the spiral ganglion 5 days after drug administration. The number of spiral ganglion cells began to decrease on day 15. *Efr3a* expression was notably increased in the spiral ganglion on day 5, decreasing to near normal levels by day 10. This suggests that the change in *Efr3a* expression in the spiral ganglion coincides with the time of spiral ganglion degeneration, which implies that this high *Efr3a* expression may be important to the onset of spiral ganglion degeneration after hair cell loss [Nie et al., 2015].

Conclusion

For the first time, an association analysis with correction for population structure was used to map several loci for hearing traits in inbred strains of mice based on DPOAE suprathreshold amplitudes before and after noise exposure. Our results identified a number of novel loci for susceptibility to NIHL. Also, our findings validate the power of the HMDP for detecting NIHL susceptibility candidate genes.

Statement of Ethics

This study was carried out in strict accordance with the recommendations of the American Association for Laboratory Animal Sciences (AALAS). The protocol was approved by the University of Southern California Institutional Animal Care and Use Committee (Permit Number: 12033) and the Department of Animal Resources.

Animals were housed with ambient noise not exceeding that of normal air conditioning. All techniques were performed on mice under intraperitoneal anesthesia (ketamine 80mg/kg body weight and xylazine 16mg/kg body weight) and all efforts were made to minimize suffering.

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding Sources

This work was supported by National Institutes of Health to RAF and CAPES/BR to GK (Master's Program Scholarship). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JL HA RAF. Performed the experiments: JL JW RAF. Analyzed the data: JL GK RFB AM JW ALC HA RAF. Contributed reagents/materials/analysis tools: JL GK AM RFB JW ALC RAF. Wrote the paper: JL GK RFB AM RAF.

References

1. Ahmed M, Wong EY, Sol J, Xu J, Wang F, Xu PX. Eya1-Six1 interaction is sufficient to induce hair cell fate in the cochlea by activating Atoh1 expression in cooperation with Sox2. *Dev Cell*. 2012; 22 (2): 377-390. DOI:10.1016/j.devcel.2011.12.006
2. Bennett BJ, Wang SS, Wang X, Wu X, Lusis AJ. Genetic regulation of atherosclerotic plaque size and morphology in the innominate artery of hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Mar;29(3):348-55. DOI:10.1161/ATVBAHA.108.176685
3. 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
4. Davis RC, van Nas A, Bennett B, Orozco L, Pan C, Rau CD, Eskin E, Lusis AJ. Genome-wide association mapping of blood cell traits in mice. *Mamm Genome*. 2013 Apr;24(3-4):105-118. DOI:10.1007/s00335-013-9448-0
5. 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. DOI:10.1016/0378-5955(95)00226-x
6. Farber CR, Bennett BJ, Orozco L, et al. Mouse genome-wide association and systems genetics identify *Asxl2* as a regulator of bone mineral density and osteoclastogenesis. *PLoS Genet*. 2011;7(4):e1002038. DOI:10.1371/journal.pgen.1002038

7. Holme RH, Steel KP. Progressive hearing loss and increased susceptibility to noise-induced hearing loss in mice carrying a *Cdh23* but not a *Myo7a* mutation. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2004;5(1):66-79. DOI:10.1007/s10162-003-4021-2
8. Hu H, Ma Y, Ye B, et al. The role of *Efr3a* in age-related hearing loss. *Neuroscience*. 2016. November 17;341:1–8. DOI:10.1016/j.neuroscience.2016.11.013
9. Hu H, Ye B, Zhang L, et al. *Efr3a* Insufficiency Attenuates the Degeneration of Spiral Ganglion Neurons after Hair Cell Loss. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:86. Published 2017 Mar 29. DOI:10.3389/fnmol.2017.00086
10. 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
11. Kochhar A, Fischer SM, Kimberling WJ, Smith RJ. Branchio-oto-renal syndrome. *Am J Med Genet* 2007;143:1671-8. DOI:10.1002/ajmg.a.31561
12. Kozel PJ, Davis RR, Krieg EF, Shull GE, Erway LC (2002) Deficiency in plasma membrane calcium ATPase isoform 2 increases susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear Res* 164: 231 –239. DOI:10.1016/s0378-5955(01)00420-8
13. Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *J Neurosci*. 2009;29(45):14077-85. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009
14. Lavinsky J, Crow AL, Pan C, et al. Genome-wide association study identifies *nox3* as a critical gene for susceptibility to noise-induced hearing loss [published correction

appears in PLoS Genet. 2015 Jun;11(6):e1005293]. *PLoS Genet.* 2015;11(4):e1005094.

Published 2015 Apr 16. DOI:10.1371/journal.pgen.1005094

15. Liberman MC. Noise-induced and age-related hearing loss: new perspectives and potential therapies. *F1000Res.* 2017;6:927. Published 2017 Jun 16. DOI:10.12688/f1000research.11310.1

16. Heinonen-Guzejev M, Vuorinen HS, Mussalo-Rauhamaa H, Heikkilä K, Koskenvuo M, Kaprio J. Somatic and psychological characteristics of noise-sensitive adults in Finland. *Arch Environ Health.* 2004;59(8):410-417. DOI:10.3200/AEOH.59.8.410-417.

17. M. Sliwinska-Kowalska, M. Pawelczyk. Contribution of genetic factors to noise-induced hearing loss: a human studies review *Mutat. Res.*, 752 (2013), pp. 61-65. DOI:10.1016/j.mrrev.2012.11.001

18. Nie C, Hu H, Shen C, Ye B, Wu H, Xiang M (2015) Expression of EFR3A in the Mouse Cochlea during Degeneration of Spiral Ganglion following Hair Cell Loss. *PLoS ONE* 10(1): e0117345. Published 2015 Jan 26. DOI:10.1371/journal.pone.0117345

19. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, et al. Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (*Sod1*) increases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Audiol Neurootol.* 1999;4(5):237-246. DOI:10.1159/000013847

20. 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. *Assoc Res Otolaryngol.* 2000;1(3):243-254. DOI:10.1007/s101620010043

21. Park CC, Gale GD, de Jong S, et al. Gene networks associated with conditional fear in mice identified using a systems genetics approach. *BMC Syst Biol.* 2011;5:43. Published 2011 Mar 16. DOI:10.1186/1752-0509-5-43
22. Parks BW, Nam E, Org E, et al. Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice. *Cell Metab.* 2013;17(1):141-152. DOI:10.1016/j.cmet.2012.12.007
23. Rau CD, Parks B, Wang Y, et al. High-Density Genotypes of Inbred Mouse Strains: Improved Power and Precision of Association Mapping. *G3 (Bethesda).* 2015;5(10):2021-2026. Published 2015 Jul 28. DOI:10.1534/g3.115.020784
24. Stelzer G, Rosen R, Plaschkes I, et al. *The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analysis*, *Current Protocols in Bioinformatics*(2016), 54:1.30.1 - 1.30.33. DOI: 10.1002 / cpbi.5.
25. White CH, Ohmen JD, Sheth S, et al. Genome-wide screening for genetic loci associated with noise-induced hearing loss. *Mamm Genome.* 2009;20(4):207-213. DOI:10.1007/s00335-009-9178-5
26. Xu J, Ueno H, Xu CY, Chen B, Weissman IL, Xu PX. Identification of mouse cochlear progenitors that develop hair and supporting cells in the organ of Corti. *Nat Commun.* 2017;8:15046. Published 2017 May 11. DOI:10.1038/ncomms15046
27. Yankaskas K. Prelude: noise-induced tinnitus and hearing loss in the military. *Hear Res.* 2013Jan;295:38. DOI: 10.1016/j.heares.2012.04.016.

28. Zhang Y, Knosp BM, Maconochie M, Friedman RA, Smith RJ. A comparative study of Eya1 and Eya4 protein function and its implication in branchio-oto-renal syndrome and DFNA10. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2004;5(3):295-304. DOI:10.1007/s10162-004-4044-3
29. Zheng W, Huang L, Wei ZB, Silvius D, Tang B, Xu PX. The role of Six1 in mammalian auditory system development. *Development.* 2003;130(17):3989–4000. DOI:10.1242/dev.00628

6. VERSÃO DO ARTIGO EM LÍNGUA PORTUGUESA

Emissões Otoacústicas por Produtos de Distorção e exposição ao ruído: um estudo de associação do genoma inteiro

Resumo

Embora vários estudos de associação de genes candidatos tenham sido conduzidos para investigar a perda auditiva induzida por ruído (PAIR) em humanos, a maioria tem baixo poder, não sendo replicáveis e definem apenas uma fração do risco genético. Os estudos de associação do genoma inteiro (*Genome Wide Association Study* - *GWASs*) em camundongos revolucionaram o campo da genética e levaram à descoberta de centenas de genes envolvidos em fenótipos complexos. O *Hybrid Mouse Diversity Panel* (*HMDP*) é uma coleção de linhagens consanguíneas clássicas e recombinantes de camundongos cujos genomas foram genotipados em alta resolução ou sequenciados. Para investigar melhor a genética da PAIR, relatamos o primeiro GWAS utilizando avaliação do limiar auditivo por Emissões Otoacústica por Produto de Distorção (EOAPD) em camundongos do *HMDP* antes e após a exposição ao ruído.

Um total de 102 linhagens ($n = 635$) do *HMDP* foram avaliadas com base nas EOAPD em amplitude supraliminar antes e após a exposição ao ruído. A variação da amplitude das EOAPD foi definida em 60 dB e 70 dB NPS dos tons primários para cada frequência separadamente (8, 11,3, 16, 22,6 e 32 kHz). Os resultados das EOAPD forneceram uma avaliação indireta da

integridade das células ciliadas externas da cóclea. Camundongos de seis semanas de idade foram expostos por 2 horas a ruído de oitava de banda de 10 kHz a 108 dB SPL. Para realizar a análise de locus de característica quantitativa de expressão local (eQTL), perfis de microarranjos de expressão gênica foram gerados usando RNA coclear de 64 linhagens de camundongos híbridos (n = 3 matrizes por cepa).

Com base na análise de associação e em nossos dados de expressão do genes cocleares, vários novos loci foram identificados e genes candidatos associados com PAIR, especialmente após a exposição ao ruído (1 locus pré exposição e 5 loci após a exposição). Um total de 35 genes candidatos nesses 6 loci foram identificados com pelo menos 1 sonda cuja expressão foi regulada por um cis-eQTL significativo na cóclea. Após análise cuidadosa dos genes candidatos com base na expressão do genes cocleares, 2 genes candidatos foram priorizados: *Eya1* (pré-exposição) e *Efr3a* (pós-exposição).

Pela primeira vez, uma análise de associação com correção para estrutura populacional foi usada para mapear vários loci para características auditivas em linhagens consanguíneas de camundongos com base nas EOAPD em amplitude supraliminar antes e após a exposição ao ruído. Nossos resultados identificaram uma série de novos loci e genes candidatos para susceptibilidade à PAIR, especialmente os genes *Eya1* e *Efr3a*. Nossos resultados validam o poder do HMDP para detectar genes na susceptibilidade à PAIR.

Introdução

De acordo com o *Centers of Disease Control*, até 25% da população adulta dos Estados Unidos pode desenvolver perda auditiva induzida por ruído (PAIR) [Kujawa & Liberman, 2009; Liberman, 2017]. Além do prejuízo humano, a PAIR gera um impacto econômico

considerável. Estima-se que US\$ 1,2 bilhão são gastos anualmente nos Estados Unidos devido à PAIR [Yankaskas, 2013].

Existem evidências da contribuição genética na PAIR. Um estudo avaliando o componente genético da PAIR em gêmeos mostrou uma contribuição de aproximadamente 36% da herdabilidade para essa condição [Heinonen-Guzejev et al., 2004]. Elucidar os efeitos genéticos específicos é fundamental para a compreensão de doenças complexas como a PAIR. Embora alguns estudos de interações gene-ambiente na perda auditiva humana tenham sido conduzidos, apenas alguns deles foram replicados até o momento [Lavinsky et al., 2015].

Uma grande dificuldade em estudos com humanos é a incapacidade de controlar ou quantificar a exposição ambiental a determinado fator de forma consistente, o que resulta na falta de populações bem caracterizadas e monitoradas para estudo. Esse é notadamente o caso da PAIR, em que poucos estudos com planejamento limitado e pobremente caracterizados foram publicados [Lavinsky et al., 2015]. Por esse motivo, muitos pesquisadores estão se voltando ao estudo em modelos animais.

O estudo da perda auditiva em camundongos parece ser um método válido, uma vez que a orelha interna do camundongo é estruturalmente semelhante à orelha interna humana e seu material genético é homólogo em considerável extensão. Além disso, podemos criar um ambiente idêntico que evita fatores de confusão e permite a análise por meio de um Estudo de associação do genoma inteiro (*Genome Wide Association Study - GWAS*) usando linhas de camundongos consanguíneos do *Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP)*.

Estudos avaliando PAIR em camundongos identificaram diferentes genes de susceptibilidade à PAIR usando variados métodos [Sliwiska-Kowalska & Pawelczyk, 2013].

Um exemplo é a identificação de algumas linhagens de camundongos (C57BL / 6J) mais suscetíveis ao ruído do que outras [Erway et al., 1996]. Camundongos knockout testados por resposta auditiva do tronco cerebral (*Auditory Brainstem Response - ABR*) com mutação direcionada dos genes SOD1 - / - [Ohlemiller et al., 1999], GPX1 - / - [Ohlemiller et al., 2000] e PMCA2 - / - [Kozel et al., 2002] foram mais sensíveis ao ruído do que seus irmãos do tipo selvagem. Camundongos CDH23 + / - também foram mais suscetíveis ao ruído [Holme & Steel, 2004], com sua função auditiva testada através de potencial de ação composto.

Lavinsky et al. (2015), em um GWAS com correção para estrutura populacional, descreveu pela primeira vez o mapeamento de vários loci de suscetibilidade para PAIR em linhagens de camundongos consanguíneos utilizando *ABR*. A análise revelou um pico significativo no cromossomo 17 dentro de um bloco de haplótipo contendo NADPH oxidase-3 (Nox3), fornecendo evidências para apoiar seu papel na suscetibilidade à PAIR. Além disso, a suscetibilidade genética à perda auditiva de frequência específica após a exposição ao ruído foi demonstrada na cóclea de camundongo [Lavinsky et al., 2015].

Com base no que já foi descoberto, este estudo teve como objetivo investigar outros fenótipos auditivos por meio de um método diferente de avaliação auditiva, as Emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPD) em amplitude supraliminar. Esse método avalia indiretamente as células ciliadas externas, que podem ser afetadas antes e após a exposição ao ruído.

Materiais e Métodos

O Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP)

Uma descrição detalhada do *HMDP* (seleção de linhagens, poder estatístico e resolução de mapeamento) é fornecida por Bennett et al. (2010). Quatro camundongos fêmeas de 4 semanas de cada linhagem do *HMDP* foram adquiridos no Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Apenas camundongos fêmeas foram testados para evitar potenciais efeitos de confusão do sexo. Os camundongos foram aclimatados em um ambiente comum por 1 semana (até 5 semanas de idade). Foram utilizados camundongos de 5 semanas para minimizar os efeitos potenciais da perda auditiva relacionada à idade, que poderia prejudicar nosso fenótipo. Todos os animais foram alimentados com uma dieta padrão até o sacrifício.

Genotipagem

As linhagens consanguíneas clássicas e recombinantes foram previamente genotipadas pelo *Broad Institute* (www.mousehapmap.org). Dos 140.000 polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*) disponíveis, 108.064 foram informativos e usados na análise de associação.

Protocolo de exposição ao ruído

Usando um método adaptado de Kujawa e Liberman (2009), com 5 semanas de idade, os camundongos foram expostos a um ruído de banda na oitava de 10 kHz por 2 horas numa intensidade de 108 dB NPS. O protocolo de exposição ao ruído foi previamente descrito por White et al. (2009). A gaiola foi disposta em uma câmara à prova de som (MAC-1) criada pela *Industrial Acoustics* (IAC, Bronx, NY). A câmara de som era forrada com espuma acústica à prova de som. As gravações de ruído foram realizadas com um alto-falante (Fostex FT17H

Tweeter) construído no topo da câmara de som. O ruído prejudicial foi calibrado com um medidor de nível de som B&K, com uma variação de 1,5 dB na gaiola. Os camundongos foram colocados em uma gaiola de exposição circular com 4 compartimentos e, por 2 horas, puderam circular dentro do compartimento. O teste envolveu apenas a orelha direita.

Determinação das EOAPD em Amplitude supraliminar

EOAPD foram analisadas como funções de entrada / saída em $2f_1-f_2$ (medida primária). Os tons primários foram definidos em uma proporção de $f_2 / f_1 = 1,2$, com f_2 variando de 8 a 32 kHz (nível de f_2 ajustado em 10 dB abaixo do nível de f_1) e L2 variando de 60 a 70 dB. O nível de ruído foi calculado como a média de 6 pontos espectrais (acima e abaixo de $2f_1-f_2$). A forma de onda e as EOAPD médias espectrais foram então extraídas. O nível L2 necessário para produzir 0 dB SPL com relação sinal-ruído (SNR) foi de 3 dB. A variação da amplitude das EOAPD foi definida em 60 dB e 70 dB SPL dos tons primários para cada frequência separadamente. Esses valores forneceram uma avaliação indireta da integridade das células ciliadas externas.

Resultados

Análise de associação do genoma inteiro na PAIR revela suscetibilidade genética específica para cada frequência

O algoritmo de Associação de Modelo Misto Eficiente (*EMMA - Efficient Mixed-Model Association*) foi aplicado a cada fenótipo separadamente para identificar associações genéticas para os 6 estímulos tone-burst [Kang et al., 2008]. Valores de p ajustados foram calculados para 108.064 *SNPs* com frequência de alelo menor que 5% ($p < 0,05$ equivalente em todo o genoma

para associação do genoma inteiro usando *EMMA* no *HMDP* é $p = 4,1 \times 10^{-6}$, $-\log_{10}p = 5,39$). Nesse limiar, associações significativas em todo o genoma foram identificadas no cromossomo 1 nas medidas basais e nos cromossomos 2, 3, 15 e 16 após a exposição ao ruído.

***GWAS* E EOAPD em amplitude supraliminar em cada frequência testada**

Uma análise de associação foi realizada para cada fenótipo separadamente, a fim de identificar associações genéticas. Um *GWAS* foi realizada na linha de base (Figura 1A) e após a exposição ao ruído (Figura 1B, 1C, 1D e 1E) para identificar loci associados à PAIR nas várias frequências testadas. Análise de associação e gráficos regionais

Na verificação basal, EOAPD excedendo o limite de significância em todo o genoma foi identificada no cromossomo 1 (Figura 2A). Após a exposição, as associações foram estatisticamente significativas no cromossomo 2 (Figura 2B e 2C), cromossomo 15 (Figura 2D), cromossomo 16 (Figura 2E) e cromossomo 3 (Figura 2F).

Priorizando Nossos Genes Candidatos

Nossos dados de expressão coclear nos permitiram analisar todos os 144 genes candidatos em cada intervalo de associação. Os genes foram identificados em cada um dos intervalos regulados por um locus de característica quantitativa de expressão local (eQTL). Para realizar a análise de eQTL, perfis de microarranjos de expressão gênica foram gerados usando RNA coclear de 64 linhagens de camundongos híbridos ($n = 3$ matrizes por linhagem). Posteriormente, o *EMMA* foi usado para realizar uma análise de associação entre todos os *SNPs* e mapeamento de sondas de matriz dentro de cada região. Após a exclusão das sondas que se

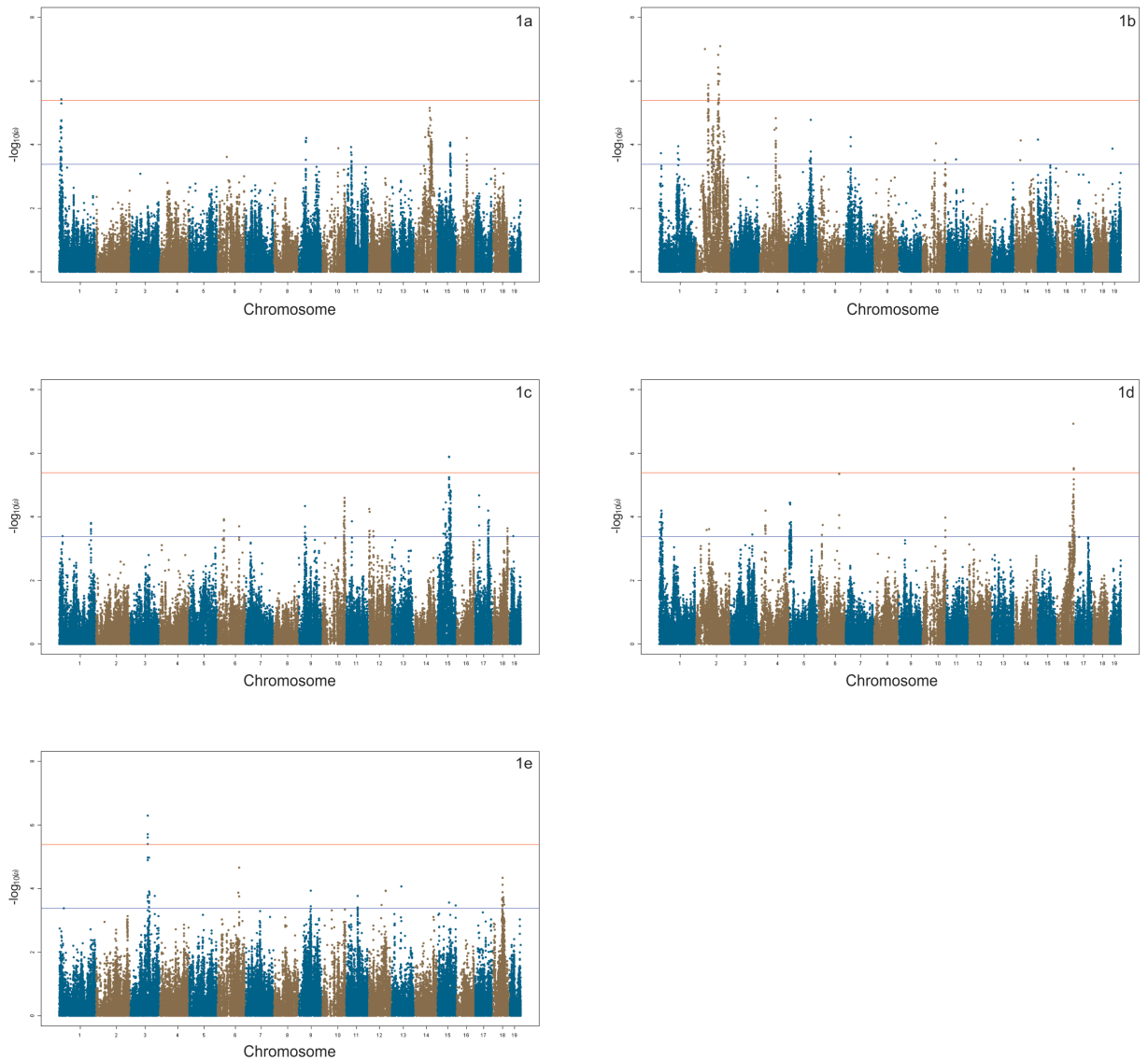


Figura 1: Manhattan Plots: Picos de associação no GWAS ($-\log_{10}$) com valores de p ($-\log_{10}p$) para 32 kHz - 70 dB (**1a**) antes do ruído; 8 kHz - 70 dB (**1b**), 11.3 kHz - 70 dB (**1c**), 16 kHz - 60 dB (**1d**), and 32 kHz - 70 dB (**1e**) após exposição ao ruído (linhagens do HMDP). Análise executada com aproximadamente 200,000 *SNPs* com menor frequência alélica > 5%. Cada cromossomo é plotado no eixo x em cores alternadas de marrom e azul.

sobrepujam aos *SNPs* presentes entre as linhagens consanguíneas clássicas utilizadas no *HMDP*, conforme descrito nos métodos, 18.138 genes foram representados por pelo menos 1 sonda.

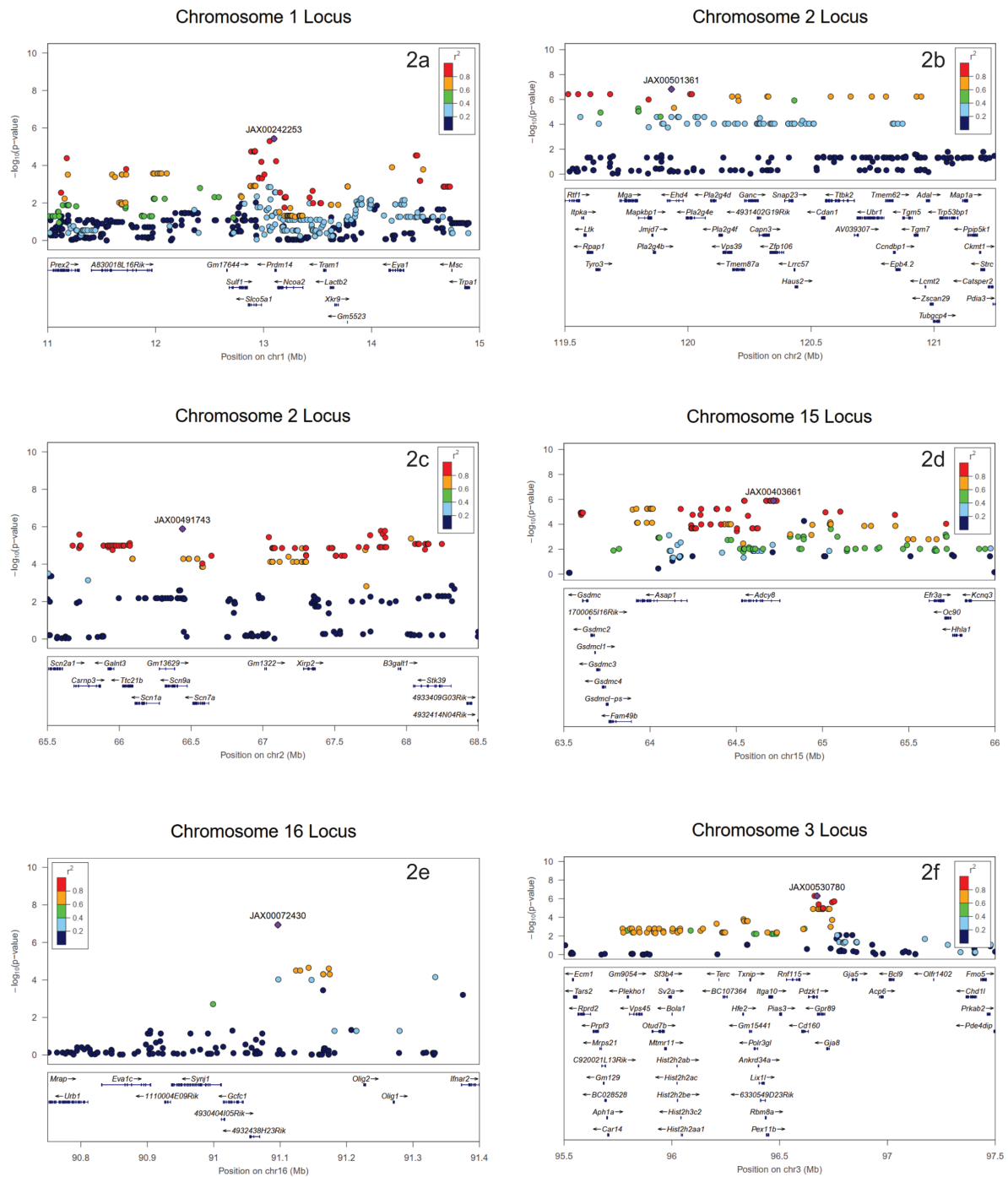


Figura 2. Picos de associação centrados no *SNP* principal em 32 kHz - 70 dB (2a) antes da exposição ao ruído e 8 kHz - 70 dB (2b e 2c), 11,3 kHz - 70 dB (2d), 16 kHz - 60 dB (2e) e 23 kHz - 70 dB (2f) após a exposição ao ruído (linhagens consanguíneas HMDP). O diamante azul representa o *SNP* mais significativo. Outros *SNPs* são coloridos com base em seu desequilíbrio de ligação (DL), como segue: *SNPs* vermelhos em DL $r^2 > 0,8$, *SNPs* laranja em DL $r^2 > 0,6$ e *SNPs* verdes em DL $r^2 > 0,4$. As posições de todos os genes RefSeq são plotados usando posições genômicas (NCBI Build 37).

Os loci em que os picos de *SNPs* mapeados dentro de 2 Mb do gene cuja expressão foi regulada, foram considerados eQTLs "locais" ou cis, enquanto os *SNPs* mapeados em outro lugar foram considerados eQTLs de ação "distal" e presumivelmente trans. O valor de corte significativo de p ($p = 1 \times 10^{-6}$) foi calculado para associações locais e distais. Esses genes foram priorizados se eles foram regulados por um eQTL local.

Um total de 35 genes nos 6 loci identificados tinham pelo menos 1 sonda cuja expressão foi regulada por um cis-eQTL significativo na cóclea (Tabela 1). As funções dos genes candidatos e doenças associadas são mostradas na Tabela 2.

Tabela 1. Picos de associação de genes candidatos dentro de eQTLs regulados por *cis* na cóclea. atxStart, local de início da transcrição (montagem do genoma NCBI Build 37).

Gene	RefSeq	Chr	txInício (bp) ^a	txFinal (bp) ^b	Local eQTL P ^c
<i>Xkr9</i>	ILMN_3159558	1	13668771	13701723	1.79E-01
<i>Eya1</i>	ILMN_2638487	1	14168954	14310200	6.26E-03
<i>Msc</i>	ILMN_2769777	1	14753346	14755966	2.50E-04
<i>Mapkbp1</i>	ILMN_2873793	2	119972699	120027408	3.77E-02
<i>Pla2g4d</i>	ILMN_3156124	2	120265595	120289197	4.79E-02
<i>Ltk</i>	ILMN_1219860	2	119751320	119760431	6.37E-02
<i>Rpap1</i>	ILMN_2602151	2	119763304	119787537	1.65E-02
<i>Pla2g4f</i>	ILMN_2727722	2	120299957	120314165	1.03E-03
<i>Vps39</i>	ILMN_3129752	2	120316461	120353137	1.52E-02
<i>Tmem87a</i>	ILMN_2969172	2	120355312	120404113	1.57E-02
<i>Ganc</i>	ILMN_2791355	2	120403896	120461700	1.85E-01
<i>Zfp106</i>	ILMN_2482427	2	120506820	120563843	2.30E-01
<i>Tgm5</i>	ILMN_2690147	2	121046111	121085841	3.14E-01
<i>Ccndbp1</i>	ILMN_1240178	2	121008403	121016904	3.18E-01
<i>Adal</i>	ILMN_1242772	2	121140428	121156680	3.35E-01
<i>Trp53bp1</i>	ILMN_1243753	2	121193281	121271407	3.80E-02
<i>Tabgcp4</i>	ILMN_1257622	2	121170654	121198770	3.82E-01
<i>Adcy8</i>	ILMN_2607127	15	64699042	64922296	3.79E-01

<i>Olig1</i>	ILMN_2760105	16	91269769	91271939	2.14E-06
<i>Ifnar2</i>	ILMN_2598703	16	91485238	91507441	6.66E-07
<i>Gpr89</i>	ILMN_2953098	3	96868281	96905346	3.07E-02
<i>Cd160</i>	ILMN_2707181	3	96798763	96829351	1.49E-02
<i>Fmo5</i>	ILMN_1230890	3	97628804	97655282	3.52E-01
<i>Chd1l</i>	ILMN_2986172	3	97560742	97610203	1.57E-02
<i>Pde4dip</i>	ILMN_3064283	3	97689824	97888707	4.00E-01
<i>Ankrd34a</i>	ILMN_3020599	3	96596636	96599775	6.43E-02
<i>Rbm8a</i>	ILMN_1252850	3	96629928	96633779	6.80E-02
<i>Pex11b</i>	ILMN_1258372	3	96635376	96653101	1.64E-01
<i>Sv2a</i>	ILMN_1213495	3	96181151	96195521	3.01E-01
<i>Mtmt11</i>	ILMN_2676662	3	96162004	96171718	3.77E-01
<i>Hist2h2ac</i>	ILMN_1218380	3	96220361	96220880	4.10E-01
<i>Hist2h2be</i>	ILMN_1231066	3	96221121	96223738	9.24E-03
<i>Prpf3</i>	ILMN_2941430	3	95830124	95855885	5.17E-02
<i>BC028528</i>	ILMN_2656422	3	95883954	95892005	2.21E-01
<i>Aph1a</i>	ILMN_1232821	3	95893969	95898288	3.09E-02

^atxInício, local de início da transcrição (NCBI Build 37 genome assembly).

^btxFinal, local do final da transcrição (NCBI Build 37 genome assembly) end.

^cValor de p estatisticamente significativo menor ou igual a E-06 (Bonferroni corrigido para o número de sondas testadas).

Discussão

Este estudo avaliou a variação auditiva pré e pós-exposição ao ruído em camundongos por meio da análise de associação do genoma utilizando as EOAPD em amplitude supralimiar no *HMDP*. O *HMDP* foi utilizado previamente com sucesso no mapeamento genômico de características de células sanguíneas em camundongos [Davis et al., 2013], em associação

Tabela 2. Processos biológicos e fenótipos associados a genes candidatos cis-eQTL. Obtido de ensembl.org. Copyright 2020.

Gene	Chr	Processo biológico	Fenótipo
<i>Xkr9</i>	1	Apoptose	Neoplasia protática
<i>Eya1</i>	1	Desenvolvimento dos rins, olhos e ouvidos	Síndrome Branquio-oto-renal
<i>Msc</i>	1	Regulação da transcrição de RNA polimerase tipo II	Escoliose idiopática do adolescente; Alzheimer
<i>Mapkbp1</i>	2	Regulação negativa da produção de interleucina-8	Nefronoftise
<i>Pla2g4d</i>	2	Processo catabólico de fosfoglicolipídeos	-
<i>Ltk</i>	2	Transdução de sinal	Diabetes tipo 2
<i>Rpap1</i>	2	Transcrição de RNA polimerase tipo II	-
<i>Pla2g4f</i>	2	Processos metabólicos de fosfolipídeos	Acidente vascular encefálico
<i>Vps39</i>	2	Transporte tardio de endossomos e lisossomos	Neoplasia de mama; Esquizofrenia.
<i>Tmem87a</i>	2	-	Acidente vascular encefálico
<i>Ganc</i>	2	Processo metabólico de carboidratos	-
<i>Zfp106</i>	2	-	Esclerose lateral amiotrófica
<i>Tgm5</i>	2	Cross-linking de peptídeos	Peeling skin syndrome
<i>Ccndbp1</i>	2	Regulação do ciclo celular	-
<i>Adal</i>	2	Processo metabólico de nucleotídeos	Trombocitopenia
<i>Trp53bp1</i>	2	Checkpoint de dano ao DNA	Hipoplasia do timo
<i>Tubgcp4</i>	2	Organização de microtúbulos citoplasmáticos	Síndrome de microcefalia-corioretinopatia autossômica recessiva
<i>Adcy8</i>	15	Via de sinalização do receptor acoplado à proteína G de ativação da adenilato ciclase	Doença renal crônica; Infarto do miocárdio
<i>Olig1</i>	16	Regulação da transcrição	Albuminúria
<i>Ifnar2</i>	16	Receptores de vias de sinalização da superfície celular	Imunodeficiência
<i>Gpr89</i>	3	Transporte de íons transmembrana	Autismo; Esquizofrenia
<i>Cd160</i>	3	Regulação da resposta imune adaptativa	Esquizofrenia
<i>Fmo5</i>	3	Processos de oxidação e redução	Autismo; Síndrome da deleção do cromossomo 1q21.1

<i>Chd1l</i>	3	Reparo de excisão de nucleotídeo, montagem de complexo de pré-incisão	Anomalias congênitas do rim e do trato urinário; Diabetes tipo 2
<i>Pde4dip</i>	3	Regulação da organização do complexo de Golgi	Tumores de mama, sistema nervoso central, gastrointestinais e pele
<i>Ankrd34a</i>	3	-	-
<i>Rbm8a</i>	3	Processamento de RNA	Síndrome da trombocitopenia com agenesia do rádio
<i>Pex11b</i>	3	Proliferação de peroxissomos	Distúrbio da biogênese de peroxissomos; adrenoleucodistrofia neonatal; doença do refluxo infantil
<i>Sv2a</i>	3	Transmissão sináptica química; regulação da secreção de ácido gama-aminobutírico; homeostase celular do íon cálcio	Epilepsia
<i>Mtmr11</i>	3	Desfosforilação de fosfatidilinositol	Escoliose idiopática do adolescente;
<i>Hist2h2ac</i>	3	Ligante de DNA	-
<i>Hist2h2-be</i>	3	Resposta humoral antibacteriana; regulação negativa da via de sinalização mediada pelo fator de necrose tumoral	-
<i>Prpf3</i>	3	Ligante do RNA	Retinite pigmentosa
<i>BC028528</i>	3	-	-
<i>Aph1a</i>	3	Processamento do receptor Notch; proteína precursora beta-amilóide	Distúrbio bipolar; Esquizofrenia.

genômica e genética de sistemas em camundongos, identificando o gene *Asxl2* como um regulador da densidade mineral óssea e osteoclastogênese [Farber et al., 2011], na regulação genética do tamanho e morfologia da placa aterosclerótica na artéria inominada de camundongos hiperlipidêmicos [Bennett et al., 2009], na identificação de redes gênicas

associadas ao medo condicional em camundongos usando uma abordagem genética de sistemas [Park et al., 2011], no controle genético da obesidade e composição da microbiota intestinal em resposta à dieta rica em gordura e sacarose em camundongos [Parks et al., 2013], na identificação de *Nox3* como um gene crítico para suscetibilidade à PAIR [Lavinsky et al., 2015], e em diabetes [Parks et al., 2013] e insuficiência cardíaca [Rau et al., 2015]. Em muitos desses estudos, incluindo o presente *GWAS*, o uso de modelos de camundongos transgênicos permitiu que os genes nos loci identificados fossem validados como genes causais, e vários deles combinaram loci identificados em *GWASs* humanos.

O presente *GWAS* gerou associações significativas em uma região cromossômica na linha de base e em 5 regiões separadas após a exposição ao ruído, resultando em 144 genes candidatos, dos quais 35 nesses 6 loci foram identificados com pelo menos 1 sonda cuja expressão foi regulada por um cis-eQTL significativo na cóclea. Após análise cuidadosa dos genes candidatos com base na expressão do gene coclear e após uma revisão da literatura atual, 2 genes candidatos principais foram priorizados: *Eya1* (linha de base) e *Efr3a* (pós-exposição).

O gene *Eya1*, presente em um pico significativo de associação na linha de base na intensidade de 32 kHz - 70 dB, é uma proteína codificadora de genes que atua em outros genes, sendo considerado um fator de transcrição. É interessante notar que as funções até agora identificadas de *Eya1* se correlacionam com certas formas de perda auditiva genética em humanos e com desenvolvimento coclear normal [Xu et al., 2017]. A proteína *Eya1* interage com várias outras proteínas ativando e inativando genes que são importantes para o desenvolvimento normal. Os papéis principais incluem o desenvolvimento do segundo arco branquial, que dá origem aos tecidos do pescoço, olhos, orelhas e rins [Kochhar et al., 2007].

Além disso, o gene *Eya1* ganhou destaque com a descoberta de sua expressão em células-tronco cocleares de mamíferos. Uma população de células progenitoras que expressam *Eya1* foram capazes de se diferenciar em células ciliadas, células de suporte e células ganglionares da cóclea após ablação de células ciliadas em camundongos de até 1 semana de idade. A identificação da regeneração coclear após o nascimento em mamíferos e a caracterização desta população de células (*Eya1*-positiva) proporcionou uma nova fonte celular com potencial para reparo e regeneração coclear [Xu et al., 2017].

As mutações do gene *Eya1* são ainda consideradas a causa mais comum da síndrome branquio-oto-renal (BOR). Mais de 80 mutações patogênicas foram identificadas em *Eya1* em diferentes populações [Zhang et.al., 2004]. A síndrome BOR é um distúrbio autossômico dominante raro caracterizado por perda auditiva neurosensorial, mista ou condutiva, fistulas ou cistos branquiais, fossetas pré-auriculares, malformações de ouvido e anomalias renais.

Outra correlação importante foi a confirmação de que a inativação de *Eya1* e *Six1* em camundongos resulta em uma alteração significativa no desenvolvimento da orelha devido a interrupção precoce do desenvolvimento no estágio de otocisto [Zheng et al., 2003]. Outra evidência robusta foi a descoberta do envolvimento de *Eya1* / *Six1* no desenvolvimento de células ciliadas e sua coexpressão em explantes cocleares de camundongos. A expressão desses genes foi suficiente para induzir à diferenciação das células ciliadas no epitélio não sensorial que expressa *Sox2* de baixo nível, ativando não apenas vias dependentes de *Atoh1*, mas também independentes de *Atoh1*, e ambas as vias induzem *Pou4f3* a promover a diferenciação de células ciliadas [Ahmed, 2012]

O *Efr3a*, nosso principal gene candidato, foi encontrado na frequência de 11,3 kHz - 70 dB após a exposição ao ruído. Ele codifica uma proteína da membrana plasmática cuja

insuficiência foi inicialmente relatada por aumentar a sobrevivência dos neurônios do hipocampo em camundongos adultos. Nosso trabalho é o primeiro a correlacionar o gene *Efr3a* com PAIR.

Estudos prévios já investigaram o papel desse gene na perda auditiva relacionada à idade e ototoxicidade. Foi investigada a expressão de *Efr3a* na via neural auditiva após a destruição das células ciliadas. O impacto da insuficiência de *Efr3a* foi avaliado pela comparação funcional e morfológica da cóclea entre camundongos deficientes em *Efr3a* e seus companheiros de ninhada de tipo selvagem. Esse estudo sugere que a deficiência de *Efr3a* está associada a perdas auditivas menos severas após exposição a substâncias ototóxicas e demonstra dano morfológico menos intenso aos neurônios do gânglio espiral coclear. Esses efeitos benéficos da deficiência de *Efr3a* foram atribuídos ao aumento da expressão de alguns fatores neurotróficos e seus receptores, suprimindo assim a neurodegeneração [Hu et al., 2017].

Nosso achado também vai ao encontro de pesquisas recentes sobre perda auditiva relacionada à idade. A deficiência de *Efr3a* resultou em melhor função auditiva em camundongos senescentes (aos 10 e 12 meses de idade). Foi demonstrado que camundongos senescentes deficientes em *Efr3a* apresentaram degeneração menos severa dos neurônios do gânglio espiral coclear no giro basal; e que quando a degeneração ocorreu, surgiu mais tardiamente [Hu et al., 2016].

Além disso, outro estudo que avaliou ototoxicidade em camundongos, demonstrou que após o uso dessas substâncias ocorreu degeneração progressiva de células do gânglio espiral coclear. A expressão de *Efr3a* aumentou notavelmente no gânglio espiral no dia 5, diminuindo para níveis próximos ao normal no dia 10, coincidindo com o período de maior degeneração

celular da cóclea. Sugeriu-se então a possibilidade do *Efr3a* atuar ativamente na degeneração do gânglio [Nie et al., 2015].

Conclusão

Pela primeira vez, uma análise de associação com correção para a estrutura da população foi usada para mapear vários loci para características auditivas em linhagens consanguíneas de camundongos com base nas EOAPD em amplitude supralimiar antes e após a exposição ao ruído. Nossos resultados identificaram uma série de novos loci para suscetibilidade a PAIR. Além disso, nossos resultados validam o poder do HMDP para detectar genes candidatos à suscetibilidade a PAIR.

Declaração de Ética

Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações da *American Association for Laboratory Animal Sciences (AALAS)*. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Uso e Cuidado Institucional de Animais da Universidade do Sul da Califórnia (Número da Permissão: 12033) e pelo Departamento de Recursos Animais.

Os animais foram alojados com ruído ambiente não superior ao do ar condicionado normal. Todas as técnicas foram realizadas em camundongos sob anestesia intraperitoneal (cetamina 80mg / kg de peso corporal e xilazina 16mg / kg de peso corporal) e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento.

Declaração de Divulgação

Os autores não têm conflito de interesses a declarar.

Fontes de Financiamento

Este trabalho foi apoiado pelo National Institutes of Health conceder NIDCD R01DC010856-01 para RAF e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através de Bolsa de Mestrado para GK. Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicar ou preparação do manuscrito.

Contribuições dos autores

Conceberam e projetaram os experimentos: JL HA RAF. Realizaram os experimentos: JL JW RAF. Análise de dados: JL GK RFB AM JW ALC HA RAF. Contribuições de materiais / ferramentas de análise: JL GK AM RFB JW ALC RAF. Escreveram o artigo: JL GK RFB AM RAF.

Referências

1. Ahmed M, Wong EY, Sol J, Xu J, Wang F, Xu PX. *Eya1-Six1* interaction is sufficient to induce hair cell fate in the cochlea by activating *Atoh1* expression in cooperation with *Sox2*. *Dev Cell*. 2012; 22 (2): 377-390. DOI:10.1016/j.devcel.2011.12.006
2. Bennett BJ1, Wang SS, Wang X, Wu X, Lusis AJ. Genetic regulation of atherosclerotic plaque size and morphology in the innominate artery of hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Mar;29(3):348-55. DOI:10.1161/ATVBAHA.108.176685

3. 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
4. Davis RC, van Nas A, Bennett B, Orozco L, Pan C, Rau CD, Eskin E, Lusk AJ. Genome-wide association mapping of blood cell traits in mice. *Mamm Genome*. 2013 Apr;24(3-4):105-118. DOI:10.1007/s00335-013-9448-0
5. Erway LC, Shiao 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. DOI:10.1016/0378-5955(95)00226-x
6. Farber CR, Bennett BJ, Orozco L, et al. Mouse genome-wide association and systems genetics identify *Asxl2* as a regulator of bone mineral density and osteoclastogenesis. *PLoS Genet*. 2011;7(4):e1002038. DOI:10.1371/journal.pgen.1002038
7. Holme RH, Steel KP. Progressive hearing loss and increased susceptibility to noise-induced hearing loss in mice carrying a *Cdh23* but not a *Myo7a* mutation. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2004;5(1):66-79. DOI:10.1007/s10162-003-4021-2
8. Hu H, Ma Y, Ye B, et al. The role of *Efr3a* in age-related hearing loss. *Neuroscience*. 2016. November 17;341:1–8. DOI:10.1016/j.neuroscience.2016.11.013
9. Hu H, Ye B, Zhang L, et al. *Efr3a* Insufficiency Attenuates the Degeneration of Spiral Ganglion Neurons after Hair Cell Loss. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:86. Published 2017 Mar 29. DOI:10.3389/fnmol.2017.00086

10. 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
11. Kochhar A, Fischer SM, Kimberling WJ, Smith RJ. Branchio-oto-renal syndrome. *Am J Med Genet* 2007;143:1671-8. DOI:10.1002/ajmg.a.31561
12. Kozel PJ, Davis RR, Krieg EF, Shull GE, Erway LC (2002) Deficiency in plasma membrane calcium ATPase isoform 2 increases susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear Res* 164: 231 –239. DOI:10.1016/s0378-5955(01)00420-8
13. Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *J Neurosci.* 2009;29(45):14077-85. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009
14. Lavinsky J, Crow AL, Pan C, et al. Genome-wide association study identifies nox3 as a critical gene for susceptibility to noise-induced hearing loss [published correction appears in *PLoS Genet.* 2015 Jun;11(6):e1005293]. *PLoS Genet.* 2015;11(4):e1005094. Published 2015 Apr 16. DOI:10.1371/journal.pgen.1005094
15. Liberman MC. Noise-induced and age-related hearing loss: new perspectives and potential therapies. *F1000Res.* 2017;6:927. Published 2017 Jun 16. DOI:10.12688/f1000research.11310.1
16. Heinonen-Guzejev M, Vuorinen HS, Mussalo-Rauhamaa H, Heikkilä K, Koskenvuo M, Kaprio J. Somatic and psychological characteristics of noise-sensitive adults in Finland. *Arch Environ Health.* 2004;59(8):410-417. DOI:10.3200/AEOH.59.8.410-417.

17. M. Sliwinska-Kowalska, M. Pawelczyk. Contribution of genetic factors to noise-induced hearing loss: a human studies review *Mutat. Res.*, 752 (2013), pp. 61-65. DOI:10.1016/j.mrrev.2012.11.001
18. Nie C, Hu H, Shen C, Ye B, Wu H, Xiang M (2015) Expression of EFR3A in the Mouse Cochlea during Degeneration of Spiral Ganglion following Hair Cell Loss. *PLoS ONE* 10(1): e0117345. Published 2015 Jan 26. DOI:10.1371/journal.pone.0117345
19. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, et al. Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (*Sod1*) increases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Audiol Neurootol.* 1999;4(5):237-246. DOI:10.1159/000013847
20. 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. *Assoc Res Otolaryngol.* 2000;1(3):243-254. DOI:10.1007/s101620010043
21. Park CC, Gale GD, de Jong S, et al. Gene networks associated with conditional fear in mice identified using a systems genetics approach. *BMC Syst Biol.* 2011;5:43. Published 2011 Mar 16. DOI:10.1186/1752-0509-5-43
22. Parks BW, Nam E, Org E, et al. Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice. *Cell Metab.* 2013;17(1):141-152. DOI:10.1016/j.cmet.2012.12.007
23. Rau CD, Parks B, Wang Y, et al. High-Density Genotypes of Inbred Mouse Strains: Improved Power and Precision of Association Mapping. *G3 (Bethesda).* 2015;5(10):2021-2026. Published 2015 Jul 28. DOI:10.1534/g3.115.020784

24. Stelzer G, Rosen R, Plaschkes I, et al. *The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analysis*, Current Protocols in Bioinformatics(2016), 54:1.30.1 - 1.30.33.DOI: 10.1002 / cpbi.5.
25. White CH, Ohmen JD, Sheth S, et al. Genome-wide screening for genetic loci associated with noise-induced hearing loss. *Mamm Genome*. 2009;20(4):207-213. DOI:10.1007/s00335-009-9178-5
26. Xu J, Ueno H, Xu CY, Chen B, Weissman IL, Xu PX. Identification of mouse cochlear progenitors that develop hair and supporting cells in the organ of Corti. *Nat Commun*. 2017;8:15046. Published 2017 May 11. DOI:10.1038/ncomms15046
27. Yankaskas K. Prelude: noise-induced tinnitus and hearing loss in the military. *Hear Res*. 2013Jan;295:38. DOI: 10.1016/j.heares.2012.04.016.
28. Zhang Y, Knosp BM, Maconochie M, Friedman RA, Smith RJ. A comparative study of *Eya1* and *Eya4* protein function and its implication in branchio-oto-renal syndrome and DFNA10. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2004;5(3):295-304. DOI:10.1007/s10162-004-4044-3
29. Zheng W, Huang L, Wei ZB, Silvius D, Tang B, Xu PX. The role of Six1 in mammalian auditory system development. *Development*. 2003;130(17):3989–4000. DOI:10.1242/dev.00628