

JANAÍNA CÂNDIDA RODRIGUES

**Efeito do silenciamento gênico do *Tnfa* na preservação
auditiva em ratos Wistar expostos ao ruído e análise da
expressão gênica dessa via metabólica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Rubens Vuono de Brito Neto

Co-Orientadora: Dra. Karina Lezirovitz Mandelbaum

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rodrigues, Janaína Cândida
Efeito do silenciamento gênico do Tnfa na
preservação auditiva em ratos Wistar expostos ao
ruído e análise da expressão gênica dessa via
metabólica / Janaína Cândida Rodrigues. -- São Paulo,
2018.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Otorrinolaringologia.
Orientador: Rubens Vuono de Brito Neto.
Coorientadora: Karina Lezirovitz Mandelbaum.

Descritores: 1. Interferência de RNA 2. Perda
auditiva provocada por ruído 3. Apoptose 4. Fator de
necrose tumoral alfa 5. Audiometria de resposta
evocada 6. Potenciais evocados auditivos 7. Ratos
Wistar

USP/FM/DBD-038/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

DEDICATÓRIA

A Jesus e a Nossa Senhora por iluminarem meus caminhos no conhecimento científico;

À minha mãe, **Maria do Rosário Rodrigues**, conselheira em todos os momentos e exemplo de amor, dedicação e força;

Aos meus filhos, **Pietá** e **Emanuel**, companheiros inseparáveis e razão de toda a minha dedicação e empenho na concretização desse sonho. Amo muito vocês

Ao meu irmão, **João Rodrigues Filho** (*in Memoriam*), que nos deixou tão prematuramente e foi tão importante na minha educação e na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir que eu finalizasse este trabalho, apesar de todos os obstáculos e dificuldades, concedendo-me força, coragem, determinação e paciência para alcançar a meta, mesmo precisando aprender a executar tarefas novas e não relacionadas ao meu aprendizado médico;

Aos meus familiares, em especial, a minha mãe Maria do Rosário, que sempre esteve presente e orando por mim; aos meus filhos queridos, Pietá e Emanuel, por serem meus companheiros nessa jornada, apesar de todas as mudanças a eles impostas; a minha irmã, Profa. Dra. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves, pelo exemplo e ajuda no Mestrado e no Doutorado e ao meu irmão, João Rodrigues Filho (*In memoriam*), por toda ajuda e carinho;

Ao Prof. Dr. Rubens Vuono de Brito Neto, Professor associado da Disciplina de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e orientador desta tese, pela paciência e apoio;

À Dra. Karina Lezirovitz Mandelbaum, pesquisadora científica e Geneticista, co-orientadora desta tese, pelos ensinamentos e permissão para que eu utilizasse o Laboratório de investigações médicas da Otorrinolaringologia (LIM 32);

À Dra. Signe Schuster Grasel, Médica Assistente-Doutora do Hospital das Clínicas da FMUSP, pelos conselhos e pela forma atenciosa e respeitosa que me acolheu no serviço de Eletrofisiologia possibilitando meu aprendizado na técnica de potencial evocado auditivo do tronco encefálico (Peate), importantíssima na realização desse projeto;

Ao Dr Roberto Miquelino de Oliveira Beck, Médico Assistente-Doutor do Hospital das Clínicas da FMUSP, exemplo de dedicação e profissionalismo, por sua amizade, apoio e conselhos nesse projeto e no exame de qualificação;

Ao Prof. Dr. Thomas Van de Water e a Profa. Dra. Esperanza Bas pela acolhida carinhosa e pelos ensinamentos no Laboratório de Otorrinolaringologia na Universidade de Miami;

À Profa. Dra. Silvia Murillo-Cuesta e a todos os pesquisadores, em Otorrinolaringologia, da Universidade de Madrid, com os quais tive o prazer de adquirir conhecimentos indispensáveis aos meus estudos;

Ao Prof. Dr. Rui Imamura e ao Dr. Robinson Koji Tsuji pelas orientações valiosas no exame de qualificação;

À Profa. Dra Nancy Rebouças, Professora-doutora associada da USP, por me introduzir no estudo do RNA, pelo carinho e apreço;

À equipe da Thermolife scientifics, especialmente a Antonio Marcos de Alcântara Rodrigues, Tatiana Grohmann Ortolane e Tomoko Sekiya pela solicitude e gentileza, fundamentais para realização desse estudo;

À Dra. Raquel Salomone, Dra Débora Levy, Dra. Ana Carla Batisso, Claudia Henza, Glaucia Regina Batista do Nascimento e, em especial, Gleiciele Alice Vieira da Silva, Lais Sousa Xavier Moura e a Aritânia Santos pela valorosa contribuição e ajuda na execução desta pesquisa;

Ao Dr. João Paulo e Dra Luciana Vasques pela contribuição na análise dos dados da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qRT-PCR);

À Dra Renaidir Rodrigues Ferreira Gacek pela presteza dispensada no fornecimento dos animais, aos cuidadores do Biotério e à equipe da manutenção da Faculdade de Medicina sempre me auxiliando quando necessário;

À Magnífica Reitora da Universidade Federal da Paraíba, Profa. Dra. Margareth Melo Diniz, por sempre acreditar no meu potencial e por todo bem que me fez;

Ao Dr. Islan da Penha, chefe da Otorrinolaringologia da UFPB e à Profa. Dra. Flávia Pimenta, Superintendente do Hospital Universitário Lauro Wanderley por permitirem que realizasse esse projeto na Universidade de São Paulo;

Ao Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy, Professor Titular de Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, por seu exemplo e sua dedicação no tratamento dos meus olhos indispensável para o exercício da minha profissão;

Às secretárias, Cristina Baptista Martins, Márcia dos Santos, Maria Marileide Alves, Maria Marcia Alves, Lucivânia Lima da Silva e Adriana Aparecida pela amizade, carinho e atenção diária;

A todos os meus amigos, em especial, Prof. Dr. Joelmir Silva, Dra. Fernanda Lemos e Luseth Sarmiento pelas atitudes positivas e espírito animador; e a todos que, de certa forma, ajudaram ou dificultaram a realização deste sonho;

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). **Minha imensa gratidão pelo apoio, sem o qual seria impossível realizar tal estudo.**

“Combati o bom combate, terminei a corrida, guardei a fé...” (2 Timóteo 4:7).

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro... [et al.]. --3.ed. rev. ampl. mod.- São Paulo: SIBi/USP, 2016. 100p. (Cadernos de estudos 9)

As abreviaturas dos títulos dos periódicos estão de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Ilustrações

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO.....	4
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1	Morte celular relacionada à exposição ao ruído	7
3.2	Potencial evocado auditivo do tronco encefálico (Peate).....	13
3.3	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa - qRT-PCR.....	16
3.4	Silenciamento gênico	21
4	METODOLOGIA.....	25
4.1	Aspectos Éticos	26
4.2	Animais	26
4.3	Critérios de inclusão e exclusão	27
4.4	Anestesia	27
4.5	Exame do Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico (Peate).....	29
4.6	Microcirurgia para introdução do siRNA <i>in vivo</i> através de injeção trans-timpânica	32
4.7	Exposição ao ruído	35
4.8	Análise da expressão gênica.....	36
4.9	Fluxogramas do Estudo	40
4.10	Análise dos Dados.....	44
5	RESULTADOS	46
5.1	Análise dos parâmetros do Peate clique previamente ao procedimento cirúrgico.....	47
5.2	Análise dos parâmetros do Peate clique após silenciamento gênico do <i>Tnfa</i> ...	50
5.3	Análise da qualidade do RNA extraído	54
5.4	Silenciamento Gênico do <i>Tnfa</i>	55
5.5	Análise da Expressão Gênica na exposição ao ruído com e sem silenciamento gênico	55
6	DISCUSSÃO.....	59
7	CONCLUSÃO.....	67
8	REFERÊNCIAS.....	69

Apêndice

LISTAS

ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorbância
ABR	Auditory Brain Response
Ago	Argonauta
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
ATP	Adenosina Trifosfato
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BERA	Brain Evoked Response Audiometry
BID	BH3 interacting domain death agonist
BSA	Bovine Serum Albumin
Caspases	Cysteine-dependent aspartate-specific proteases
CA	Califórnia
Cat	Catálogo
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cIAP	Cellular inhibitor of apoptosis protein
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Ct	Cycle threshold
D	Dia
DD	Death domain – domínio de morte
DED	Domínio efetor de morte
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DMSO	Dimetil sulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DP	Desvio padrão
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
dsRNA	Double strand RNA- RNA dupla fita

Ed.	Edição
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Eam	External acoustic meatus
EUA	Estados Unidos da América
FADD	Fas-associated protein with death domain
FD	Fator de diluição
FL	Flórida
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FRET	Transferência de energia ressonante por fluorescência
H	Hora
HEK293	Human embryonic kidney cells 293
ID	Identificação
IL-1	Interleucina-1
IM	Intramuscular
IN	Intervalo de Normalidade
IKK	Kappa B kinase
JNK	Kinase c-jun NH2-terminal
Lot.	Lote
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAP3K	Mitogen activated protein kinase kinase kinase
Min	Minuto
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
N	Nervo
NA	Nervo auditivo
NEMO	NFk-B essential modulator
NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NOX3	NADPH oxidase 3
Ntd	Nucleotídeos
Núm	Número
P	Pico positivo
p53	Proteína supressora de tumor
PAIR	Perda auditiva induzida por ruído
PCR	Reação de cadeia da polimerase
PEATE	Potencial evocado auditivo do tronco cerebral
Prof.	Professor
Profa.	Professora

PTGS	Silenciamento gênico pós-transcricional
PTS	Permanent Threshold shift
qRT-PCR	Reação de cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
RISC	RNA- induced silencing complex
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	Ácido ribonucléico de interferência
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RNAr	RNA ribossômico
RPM	Rotações por minuto
Rq	Quantificação relativa
S	Segundo
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SODD	Silencer of death domains protein
SP	São Paulo
SPF	Specific Pathogen Free
ssDNA	Simple strand DNA
STAT 1	Signal transducer and activator of transcription 1
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TDT	Tuker-Davis Technologies,
Tnfa	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral alfa
TNFRSF10A	TNF ligand superfamily member 10A
TNFRSF10B	TNF ligand superfamily member 10B
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein
TRAILR1	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1
TRAILR2	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2
TRAF2	TNF receptor associated factor 2
UI	Unidades internacionais
USP	Universidade de são Paulo

SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
Ca ²⁺	Cálcio
Cal	Caloria
Cm	Centímetro
dB	Decibél
dBNA	Decibél nível de audição
dB SPL/dBNPS	Decibél nível de pressão sonora
EtBr	Brometo de Etídeo
G	Gramma
HZ	Hertz
K	Kilo ou quilo
K ⁺	Potássio
KHz	Quilohertz
Kohm	Kiloohm
L	Litro
L/m	Litros por minuto
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Mg ²⁺	Íons Magnésio
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
Mol	Mol
ms	Milisseguno
Na ⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
Nv	Nanovolt
Ng	Nanograma

O ₂	Oxigênio
pMol	Picomoles
S	Size
V	Volt
μl	Microlitro
μg	Micrograma
μseg	Microssegundos
μv	Microvolt
Δ	Delta
ΔΔCt	Delta delta- Ct
Δψ	Potencial de membrana mitocondrial
®	Marca registrada
≥	Maior ou igual que
≤	Menor ou igual que
%	Porcentagem

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Desenho esquemático das vias envolvidas na apoptose	8
Figura 2.	Desenho esquemático da via metabólica do TNFa.....	11
Figura 3.	Indução da anestesia	28
Figura 4.	Indução da anestesia e Inserção dos eletrodos.....	28
Figura 5.	Equipamento para Peate- TDT System 3 RZ6 (Tucker-Davis Technologies, inc. Alachua, FL. EUA) com cabine acústica.....	29
Figura 6.	Cabine de atenuação do som e blindagem elétrica (Gaiola de Faraday)	30
Figura 7.	Posicionamento do animal na gaiola de Faraday.....	31
Figura 8.	Realização de Peate no experimento de silenciamento gênico.....	32
Figura 9.	Microcirurgia no Rato Wistar para introdução do siRNA.....	33
Figura 10.	Caixa de isolamento acústico com gerador de ruído e os animais no interior da caixa aramada.....	35
Figura 11.	Procedimento para extração do RNA	37
Figura 12.	Valores médios de latência das ondas com intervalo de normalidade de 95%	48
Figura 13.	Valores médios de latência dos Intervalos interpico I-IV e I-V com intervalo de normalidade de 95%	48
Figura 14.	Valores médios de amplitude das ondas com intervalo de normalidade de 95%	48
Figura 15.	Valores médios de amplitude dos Intervalos interpico I-IV e I-V com intervalo de normalidade de 95%	49
Figura 16.	Exemplo de Peate clique nos ratos (A e B) antes e após silenciamento e ruído.....	50
Figura 17.	Electroforese em gel de agarose	55
FLUXOGRAMA 1.	Representação das etapas realizadas no experimento de indução de perda auditiva pelo ruído.....	43
FLUXOGRAMA 2.	Representação das etapas realizadas no experimento de silenciamento gênico	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Ligantes e receptores mais caracterizados da superfamília TNF.....	10
Tabela 2.	Genes da placa metabólica <i>Tnfa</i>	40
Tabela 3.	Descrição da amplitude e latência nos ratos sem intervenção	47
Tabela 4.	Limiar eletrofisiológico das orelhas siRNA <i>Tnfa</i> e siRNA <i>scramble</i>	51
Tabela 5.	Descrição das latências nas diferentes intensidades avaliadas no lado siRNA <i>Tnfa</i> e no lado siRNA <i>scramble</i> e resultado das comparações.....	52
Tabela 6.	Descrição das amplitudes nas diferentes intensidades avaliadas no lado siRNA <i>Tnfa</i> e no lado siRNA <i>scramble</i> e resultado das comparações.....	53
Tabela 7.	Concentração da amostra, razão de absorvância ultravioleta A260/A280 e A260/A230 e Normalização para 30 ng/µl	54
Tabela 8.	Relação de genes cuja expressão diminuiu após silenciamento do <i>Tnfa</i>	56
Tabela 9.	Relação de genes cuja expressão aumentou após silenciamento do <i>Tnfa</i>	56
Tabela 10.	Relação de genes cuja expressão aumentou após exposição ao ruído.....	57
Tabela 11.	Relação de genes cuja expressão diminuiu após exposição ao ruído.	57
Tabela 12.	Perfil de expressão de genes da via metabólica do <i>Tnfa</i> na exposição ao ruído com e sem o silenciamento gênico	58

RESUMO

Rodrigue JC. *Efeito do silenciamento gênico do Tnfa na preservação auditiva em ratos wistar expostos ao ruído e análise da expressão gênica dessa via metabólica* [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo. 2017.

INTRODUÇÃO: A exposição a níveis elevados de pressão sonora é a segunda causa mais comum de perda auditiva sensorineural adquirida. Está relacionada à morte celular por apoptose, necrose e/ou necrose programada (necroptose) devido ao dano mecânico e/ou metabólico, ocasionando a degeneração de estruturas cocleares como células ciliadas, sobretudo externas, células de suporte e de fibras aferentes do nervo coclear. Estudos têm demonstrado um aumento na citocina inflamatória TNF α após a exposição ao ruído, bem como a melhoria auditiva relacionada ao uso de etanercepte, que é um bloqueador de TNF α . Neste contexto, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do silenciamento gênico do Tnfa na audição de ratos Wistar, expostos ao ruído branco, e identificar o perfil de expressão gênica na via metabólica desse gene.

METODOLOGIA: Foram incluídos ratos Wistar do sexo masculino, jovens com limiar auditivo no Peate clique de 50 dB SPL. Os animais foram submetidos à introdução do siRNA Tnfa em uma orelha, e siRNA *scramble* na orelha contralateral por via trans-timpânica com posterior exposição à 120 dB SPL de ruído branco por 3h. Foi realizado Peate clique e remoção das cócleas para obtenção do cDNA e avaliação da expressão gênica da via metabólica do Tnfa por meio de qRT-PCR. Um grupo de animais, não submetidos ao silenciamento, foi exposto ao ruído para análise dessa via metabólica. Para o cálculo da expressão gênica relativa (Rq) utilizamos o método do $\Delta\Delta CT$ comparativo e o teste t-Student pareado para avaliar os parâmetros no Peate clique. **RESULTADOS:** A taxa de silenciamento observada foi de 74,1%. A média do limiar eletrofisiológico nas orelhas silenciadas foi estaticamente melhor que a orelha *scramble* ($p < 0,001$) com valores médios de 49,5 \pm 10.5. A amplitude média da onda I em 80 dB SPL e das ondas II e IV em 90 dB SPL foi estatisticamente maior na orelha siRNA Tnfa, sem alteração na latência nas intensidades audíveis, para ambos os lados. A exposição ao ruído promoveu aumento da expressão do gene Tnfa e de seu receptor Tnfrsf1A, 24h após à exposição, associado ao aumento da expressão de genes relacionados à apoptose e diminuição de genes relacionados à sobrevivência celular. **CONCLUSÃO:** O ruído promoveu aumento de expressão do gene Tnfa e de genes envolvidos na apoptose, associado à perda auditiva em modelo experimental. A administração trans-timpânica do siRNA Tnfa promoveu preservação do limiar eletrofisiológico e da amplitude da onda I, II e IV no Peate clique, após exposição ao ruído intenso, sugerindo que a inibição deste pode ser uma estratégia de preservação auditiva promissora. O silenciamento do Tnfa inibiu a disfunção coclear após estímulo acústico, sugerindo que esta proteína é um dos principais agentes envolvidos na perda auditiva induzida pelo ruído, devendo ser considerada como alvo terapêutico na estratégia de preservação auditiva.

Palavras-chave: RNA de interferência. Perda auditiva induzida por ruído. Apoptose. Fator de Necrose tumoral alfa. Audiometria de resposta evocada. Potencial evocado auditivo

ABSTRACT

Rodrigue JC. *Effect of Tnfa gene silencing on auditory preservation in Wistar rats exposed to noise and analysis of gene expression of this metabolic pathway*. [Thesis]. São Paulo. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo. 2017.

INTRODUCTION: Exposure to high levels of sound pressure is the second most common cause of acquired sensorineural hearing loss. It is related to cell death through apoptosis, necrosis and/or programmed necrosis (necroptosis) due to mechanical and/or metabolic damage, causing the degeneration of cochlear structures, such as ciliary cells, mainly external, as well as support cells and afferent fibers of the cochlear nerve. Studies have demonstrated an increase in the inflammatory cytokine TNF α after exposure to noise, as well as auditory improvement related to the use of etanercept, a cytokine blocker. In this context, this study aimed to evaluate the effect of *Tnfa* gene silencing on the hearing of Wistar rats exposed to white noise and to identify the expression profile in the metabolic pathway of this gene. **METHODOLOGY:** Young male Wistar rats with 50 dB SPL threshold in auditory brainstem responses click (ABR) were included in this study and submitted to the introduction of the *TnfasiRNA* in one ear and the *scramble* siRNA in the contralateral ear by trans-tympanic route, with subsequent exposure to 120 dB SPL of white noise for 3h. ABR was measured and the cochleae were dissected and used for the extraction of total RNA to obtain cDNA and conduct evaluations of the *Tnfa* metabolic pathway gene expression by qRT-PCR. A group of animals, not submitted to silencing, was exposed to noise to analyze this metabolic pathway. The relative gene expression (Rq) was calculated by the comparative $\Delta\Delta CT$ method and the paired Student t-test were applied to evaluate the parameters of the ABR click. **RESULTS:** The silencing rate was 74.1%. The mean electrophysiological threshold in the silenced ears was statistically higher than the *scrambled* ear ($p < 0.001$) with mean values of 49.5 \pm 10.5. The mean amplitudes of wave I at 80 dB SPL and waves II and IV at 90 dB SPL were statistically higher in the *TnfasiRNA* ear, with no change in latency at audible intensities for both sides. Noise exposure promoted increased expression of the *Tnfa* gene and its receptor, Tnfrsf1A, 24h after exposure, associated with increased expression of genes related to apoptosis and decreased expression of genes related to cell survival. **CONCLUSIONS:** Noise exposure promoted increased in *Tnfa* gene expression as well as in genes involved in apoptosis, associated with hearing loss in an experimental model. The trans-tympanic administration of *TnfasiRNA* promotes the preservation of the electrophysiological threshold and the amplitude of wave I, II and IV in the ABR click, after exposure to intense noise, suggesting that this inhibition may be a promising auditory preservation strategy. The *Tnfa* knockdown inhibited cochlear dysfunction after acoustic injury, suggesting that this protein plays an important role in noise induced hearing loss and should be considered a therapeutic target in auditory preservation strategies.

Keywords: RNA interference. Noise induced hearing loss. Apoptosis. Tumor necrosis factor-alpha. Evoked response. Auditory evoked potential.

Nome: RODRIGUES, Janaína Cândida

Título: Efeito do silenciamento gênico do *Tnfa* na preservação auditiva em ratos wistar expostos ao ruído e análise da expressão gênica dessa via metabólica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Otorrinolaringologia

Aprovado Em: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. DR. _____

Instituição: _____

Prof. DR. _____

Instituição: _____

Prof. DR. _____

Instituição: _____

Suplente Prof. DR. _____

Instituição: _____

Suplente Prof. DR. _____

Instituição: _____

Suplente Prof. DR. _____

Instituição: _____

1 INTRODUÇÃO

A exposição a níveis elevados de pressão sonora é a segunda causa mais comum de perda auditiva sensorineural adquirida. Caracteriza-se por ser bilateral moderada, com comprometimento inicial das frequências agudas, em torno de 4000 a 6000 Hz. Pode ser temporária ou permanente de acordo como a intensidade, tipo de ruído (constante, ocasional, súbito ou explosivo) ou duração da exposição, associada à susceptibilidade individual (Sakat et al., 2016).

Essa exposição pode promover a morte celular por apoptose, necrose e/ou necrose programada (necroptose) por dano mecânico e/ou metabólico, ocasionando a degeneração de estruturas cocleares, como células ciliadas, sobretudo externas, células de suporte e fibras aferentes do nervo coclear (Kamogashira et al., 2015).

Durante a vida, estamos expostos ao ruído, geralmente ruído branco, que é uma mistura de várias frequências, em atividades recreativas e/ou laborais. Estima-se que, em todo o mundo, cerca de 500 milhões de pessoas apresentam o risco de desenvolver perda auditiva induzida por ruído (PAIR). O ruído pode, não apenas, causar alterações auditivas, mas também alterações psicológicas e imunológicas na secreção de hormônios e distúrbios do sono. É a doença industrial mais prevalente nos Estados Unidos, com repercussões previdenciárias importantes, sendo também muito prevalente no Brasil (Prasher, 2009). Apesar do impacto na qualidade de vida dos indivíduos, assim como, na questão econômica e previdenciária em todo o mundo, muitos aspectos da fisiopatologia dessa perda auditiva encontram-se desconhecidos.

Sua gênese foi relacionada às vias de sinalização da inflamação e da morte celular (Motalebi Kashani et al., 2013). Estudos revelaram aumento na expressão da proteína TNF α à exposição ao ruído, bem como, preservação auditiva no uso de anti-inflamatórios, como a dexametasona e o etanercepte (Hirose et al., 2005; Fujioka et al., 2006; Arslan et al., 2012; Arpornchayanon et al., 2013). Apesar dessas considerações, são escassos os estudos sobre essa citocina e as vias metabólicas correlacionadas.

O silenciamento de genes, também conhecido como uso de RNA de interferência (RNAi), é um mecanismo de regulação genética inovador que ativa um processo de degradação de RNA sequência-específica. Esta ferramenta biológica pode ser utilizada para eliminar a atividade de um determinado gene com fins experimentais de forma pós-transcrição específica (Elbashir et al., 2001). Através desse método, pode-se identificar a função do gene em uma via metabólica, do mesmo modo que a

importância de uma proteína em relação a uma patologia, esclarecendo aspectos relevantes e permitindo uma possível abordagem terapêutica. Por conseguinte, o silenciamento de genes pode ser utilizado, *in vitro* e/ou *in vivo*, para identificar proteínas relacionadas ao dano celular e / ou à perda auditiva.

Como a perda sensorineural ocasionada pela exposição ao ruído pode ser prevenida, o esclarecimento sobre as vias metabólicas associadas e os possíveis alvos terapêuticos é de extrema importância. Assim, o uso do silenciamento gênico, neste contexto, pode ser uma ferramenta promissora.

2 OBJETIVO

a) Objetivo Geral

- avaliar o efeito do silenciamento gênico do *Tnfa* no limiar eletrofisiológico de ratos Wistar expostos ao ruído branco;

b) Objetivos Específicos

- avaliar os parâmetros do Peate clique (limiar eletrofisiológico, amplitude e latência) antes e após o silenciamento e exposição ao ruído;
- realizar silenciamento gênico por meio da administração trans-timpânica do siRNA *Tnfa*;
- realizar triagem de possíveis alvos gênicos associados à exposição ao ruído para futuros estudos por meio de placa padronizada da via metabólica do *Tnfa* (TaqMan® Array Fast Plates) validada para qRT-PCR

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Morte celular relacionada à exposição ao ruído

As células auditivas convertem energia acústica em impulsos elétricos, transmitindo-os aos centros auditivos cerebrais, resultando na percepção auditiva. Níveis elevados de pressão sonora podem ocasionar inicialmente mobilidade aumentada da membrana timpânica, vibração intensa dos ossículos, gerando grandes deslocamentos da membrana basilar, alterando o movimento dos estereocílios, com lesão mecânica das células ciliadas e das células de suporte (Pirvola et al., 2000; Yang et al., 2004). A exposição pode também promover distúrbios metabólicos ocasionando morte celular por apoptose, necrose e/ou necroptose.

3.1.1 Apoptose

A apoptose consiste de um mecanismo homeostático para manutenção do número celular constante e para promover a eliminação de células que sofreram lesão, ou que não são mais necessárias, nos estágios de desenvolvimento ou envelhecimento. As vias metabólicas relacionadas são constituídas por famílias de genes, que atuam de forma orquestrada, gerando mudanças morfológicas e bioquímicas nas células (Kiraz et al., 2016).

Todos esses fenômenos extremamente regulados e de grande eficiência são gerados a partir das interações entre os meios extra e intracelular, sem comprometimento das células adjacentes, pela ação de caspases (“cysteine-dependent aspartate-specific proteases”) que são cisteíno proteases, isto é, enzimas que possuem um resíduo de cisteína no seu sítio ativo e clivam substratos que possuem resíduos de aspartato de forma específica (Thornberry e Lazebnik, 1998; Hengartner, 2000).

São conhecidos 14 membros da família das caspases; 12 existentes em humanos. Originam-se a partir de precursores inativos, denominados zimogênios, ativados por clivagem proteolítica e apresentam domínios de morte que permitem a interação com receptores de membrana ou moléculas adaptadoras que também contém domínios de morte (DD) (Grivicich et al., 2007).

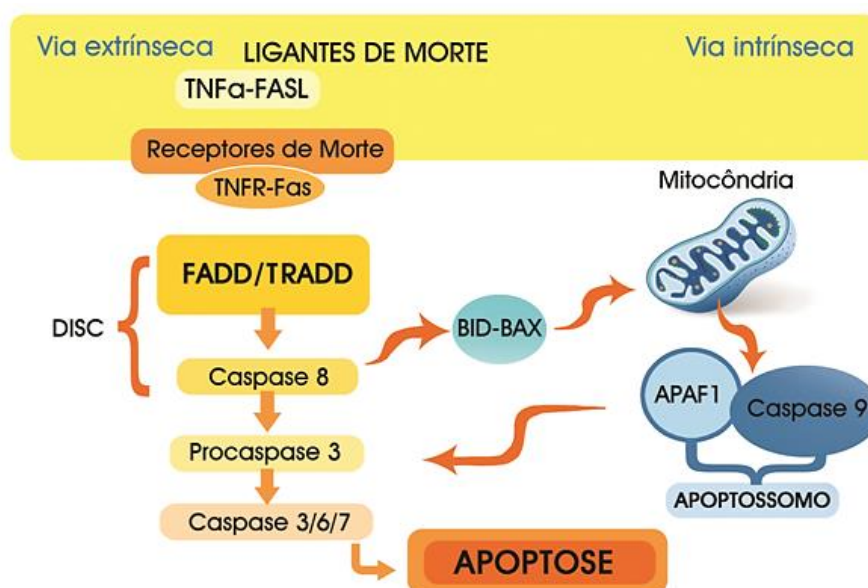
A apoptose pode ocorrer pelas vias intrínseca ou extrínseca, que embora sejam vias metabólicas independentes, podem se interconectar no decorrer do processo.

3.1.1.1 Via intrínseca ou Mitocondrial

A via intrínseca decorre da sinalização intracelular mitocondrial, em resposta à ação de material tóxico, hormônios, citocinas, infecção viral, radiação, hipóxia e diminuição de fatores de crescimento. A lesão do DNA é o estímulo principal da via intrínseca, evitando que a célula, com seu material genético alterado, continue a se proliferar (Green e Reed, 1998).

Estes estímulos ativam Bax e Bid membros pró-apoptóticos da família da Bcl2 levando à formação de homodímeros Bax-Bax, que promovem colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$) com bloqueio da cadeia fosforilativa, produção de radicais livres e interrupção da síntese de ATP.

Ocorre a formação de um megaporo que contém diversas proteínas e abrange as membranas mitocondriais interna e externa, liberando o citocromo C para o citoplasma (Slee et al., 1999). A membrana mitocondrial interna é impermeável, porém com o megaporo torna-se permeável levando a entrada de água na organela, que se rompe liberando mais moléculas pro-apoptóticas. O citocromo C associa-se ao Apaf-1, que sofre oligomerização em um anel heptamérico e a pro-caspase 9 formando o complexo apoptossomo, que ativa a caspase 9 promovendo a clivagem de caspase 3, ativando-a (Desagher e Martinou, 2000) (Figura 1).



Adaptado de Hengartner, 2000

Figura 1. Desenho esquemático das vias envolvidas na apoptose

A via intrínseca é controlada por agentes pro- e anti- apoptóticos da família da Bcl-2 e pela proteína supressora de tumor P53. Após estimulação, estas proteínas podem induzir à proliferação, parada do ciclo ou morte celular (Slee et al., 1999; Anazetti et al., 2003).

3.1.1.2 Via extrínseca ou citoplasmática

Decorre da interação entre ligantes específicos e receptores de morte na membrana citoplasmática. Estes receptores de morte fazem parte da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) ativando a via das caspases.

Os membros da família TNFR possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, que permite o reconhecimento de seus ligantes. A ligação promove a trimerização e conseqüente ativação desses receptores de morte específicos. A sua porção citoplasmática contém uma seqüência de 65 aminoácidos chamada domínio de morte – DD, responsável pela sinalização intracelular.

A ligação entre o TNFR e seu ligante específico promove a interação entre o DD e moléculas específicas denominadas TRADD (“Tumor necrosis factor receptor type 1-associated Death Domain protein”) e FADD (“Fas-associated protein with death domain”) recrutando e ativando autocataliticamente a procaspase 8, através do complexo de sinalização indutor de morte DISC. A caspase 8 ativada cliva a pró-caspase 3 ativando-a. A via extrínseca pode se interligar com a via intrínseca, pois a caspase 8 pode induzir o BID (membro pro-apoptótico da família Bcl-2) resultando também na ativação da caspase 3, efetora dos eventos bioquímicos da apoptose (Figura 1).

Superfamília do TNF

A superfamília do TNF compreende 19 ligantes e 29 receptores conhecidos em humanos, e mais três identificados em camundongos, que participam de inúmeros processos metabólicos no organismo como: apoptose, inflamação e proliferação. Os ligantes mais caracterizados são TNFa, TRAIL e o FasL e os receptores, Fas/TCD95 (DR2/APO-1), Receptor TNF 1 (DR1/TNFR1), Receptor TNF 2 (TNFR2), Receptor TRAIL 1 (TRAIL-R1 /DR4), Receptor TRAIL 2 (TRAIL-R2/DR5) (Tabela 1).

Tabela 1. Ligantes e receptores mais caracterizados da superfamília TNF

LIGANTE	RECEPTOR
TNF	TNFR1-TNFRSF1A (DD) TNFR2-TNFRSF1B (sem DD)
FasL (CD95L)	Fas, CD95, Apo1, DR2
Tweak -TNFSF12A (Apo3L)	TRAMP, TNFRSF12 (APO3)
TRAIL-TNFSF10 (Apo2L)	TRAIL R1 (TNFRSF10A) TRAIL R2 (TNFRSF10B)
TNFSF25	TNFRSF25 (DD)

Elaborado pelo autor

Os ligantes são sintetizados como uma proteína transmembrana tipo II, extremidade C-terminal extracelular, sofrendo clivagem por metaloproteinases para originar o ligante solúvel. Estes ligantes apresentam em comum um domínio homólogo extracelular C terminal, que participa da formação do homotrímero de forma não covalente.

Os receptores são compostos por proteínas transmembrana tipo I, ou seja, a extremidade N-terminal é extracelular. São proteínas triméricas formadas por três subunidades iguais, ricas em resíduos de cisteína no subdomínio extracelular e de ligações dissulfeto, entre os resíduos de cisteína, no subdomínio intracelular ("cysteine-rich Death Domain"). Esta rede de ligações intracitoplasmáticas, decorrente das ligações dissulfeto, permite que os receptores de morte ao serem estimulados por seu ligante específico, transmitam sinais de apoptose do meio extra para o intracelular (Naismith e Sprang, 1998).

A interação entre o receptor e seu ligante trimérico associado a proteínas citoplasmáticas pode iniciar apoptose, proliferação celular ou ambos. O que distingue os membros dos receptores TNF (TNFR) é a presença ou ausência do domínio de morte relacionada a apoptose ou sobrevivência celular respectivamente (Wajant et al., 2003).

TNF α , na sua forma solúvel de citocina homotrimérica, liga-se aos receptores transmembrana triméricos TNFR1 e TNFR2. O TNFR1 apresenta domínio de morte e está relacionado à apoptose. Pode ser ativado em situações de estresse celular e metabolismo celular alterado, como em células transformadas (células cancerígenas),

células infectadas por vírus ou células estressadas. O TNFR2 não possui domínio de morte estando relacionado à proliferação celular.

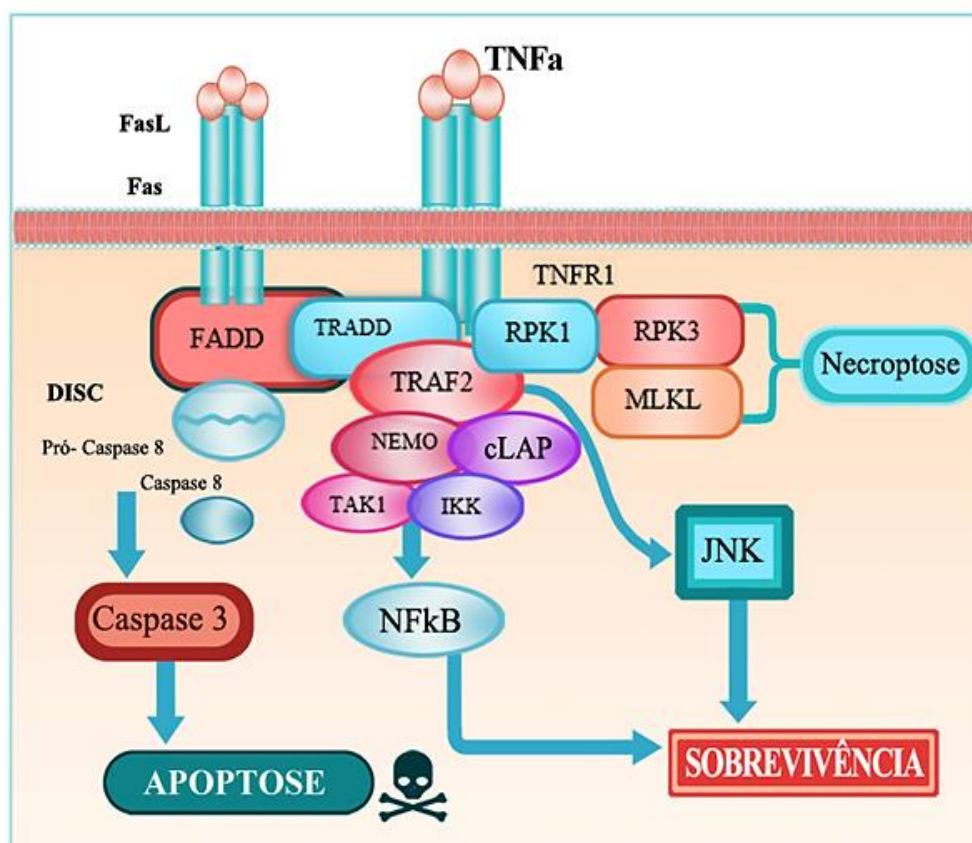
A proteína TNFa (Fator de necrose tumoral alfa) é produzida por células não imunes como fibroblastos; e por células imunes, como células T *natural killer* e monócitos/macrófagos. Na cóclea, ela é produzida por fibroblastos do ligamento espiral pelas células ciliadas externas e células suporte (Zou et al., 2005; Arpornchayanon et al., 2013). Atua como mediador de apoptose, de inflamação e de imunidade, sendo relacionada à gênese de inúmeras patologias, como perda auditiva induzida por ruído, perda auditiva imunomediada, sepse, diabetes, artrite reumatoide, osteoporose, esclerose múltipla, entre outras caracterizadas pela sua produção inapropriada.

Formação do DISC (complexo de sinalização indutor de morte)

A ligação do homotrímero TNFa ao domínio extracelular do receptor TNFR1, promove a liberação da proteína silenciadora inibitória do domínio de morte (SODD-*silencer of death domains protein*) do receptor TNFR1, cujo domínio de morte passa a ser reconhecido pela proteína adaptadora TRADD, que recruta outra molécula adaptadora FADD, a qual apresenta na extremidade N-terminal um DD e na extremidade C-terminal um domínio efetor de morte (DED). Esta ligação desbloqueia o DED da proteína FADD que recruta a pro-caspase 8 formando o DISC. Este complexo promove a clivagem e ativação da caspase 8 que desprendendo-se do DISC ativa caspases efetoras da apoptose (3,6,7) (Chen e Goeddel, 2002) (Figura 2).

O adaptador TRADD apresenta dois domínios de ligação com aproximadamente 280 aminoácidos. O DD próximo à extremidade N-terminal e o fator associado ao TNFR (TRAF), próximo à extremidade C-terminal. O DD do TRADD promove sua associação ao TNFR1 e o TRAF recruta TRAF2 que possui um domínio em anel na sua extremidade N-terminal, que se liga e ativa o NFkB (Figura 2).

O DD do FADD pode interagir diretamente com os receptores TRAILR1 (TNFRSF10A), TRAILR2 (TNFRSF10B) ou Fas em resposta a ligação desses com o TRAIL (TNFSF10) ou FasL, respectivamente, formando o DISC. Os receptores de morte TNFR1 e TRAMP necessitam, no entanto, da molécula TRADD como adaptador intermediário que recruta o FADD para formar o DISC.



Adaptado de Chen e Goeddel, 2002

Figura 2. Desenho esquemático da via metabólica do TNFα

A via metabólica do TNFα está relacionada a dois fatores de transcrição: o NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) e o JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), responsáveis pela transcrição de genes envolvidos em diversos processos biológicos como proliferação e morte celular, desenvolvimento, oncogênese, respostas imune, inflamatória e ao estresse. A ligação TNFα / TNFR1 pode promover a via de sinalização da MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e do NFκB a partir do recrutamento de TRADD (Sakon et al., 2003).

Esta relação entre o TNFα, o NFκB e o JNK determina a sobrevivência ou morte celular. Estudos apontaram que, na ausência de atividade do NFκB, o estímulo à apoptose do TNFα aumenta, da mesma forma, que o aumento da expressão de NFκB protege contra a apoptose (Devin et al., 2000, 2001). Segundo estudos de Haake et al. (2009) e Dinh et al. (2011) a estimulação da via do NFκB promoveu bloqueio da morte celular, através do aumento da transcrição de genes pró-sobrevivência como Bcl-2 e Bcl-xL, nas células ciliadas auditivas.

TRAF2 pode recrutar inibidores da apoptose como cIAP-1 e cIAP-2 (*cellular inhibitor of apoptosis protein*), sua ativação via TRADD parece ser necessária para a indução de vários genes, que protegem as células da apoptose induzida pelo TNF α (Natoli et al.,1997).

3.2 Potencial evocado auditivo do tronco encefálico (Peate)

O potencial evocado auditivo do tronco encefálico (Peate), em inglês Brain Evoked Response Audiometry (BERA) ou Auditory Brain Response (ABR), é uma resposta eletrofisiológica a um estímulo acústico, de curta latência, captada por um aparelho que utiliza técnicas adequadas de medida de sinal (Shaw, 1988).

Neste exame são realizadas duas avaliações: a pesquisa de limiar auditivo eletrofisiológico e a pesquisa da integridade da via auditiva, através da avaliação da morfologia das ondas, da latência e amplitude (Henry et al., 2011). A presença de resposta é considerada apenas quando ocorre a reprodutibilidade do traçado, portanto a estimulação é realizada em duplicata (Gama, 2001). O limiar Auditivo eletrofisiológico é definido como o nível mais baixo do estímulo, que produz uma resposta visualmente detectável; amplitude é a diferença de voltagem entre o pico positivo e o pico/depressão negativo subsequente, latência pode ser absoluta, que é diferença de tempo entre o início do estímulo até o pico da onda; e relativa (intervalo interpico), que é a diferença entre as latências absolutas de dois picos, expressa em unidade de tempo (Alvarado et al., 2012).

Os roedores são amplamente utilizados como modelo em pesquisa, devido às semelhanças anatômicas e fisiológicas com o sistema auditivo humano. A gravação dos potenciais evocados auditivos nesses animais reflete a atividade sináptica síncrona, de latência curta, dos núcleos neurais sucessivamente estimulados ao longo da via neural aferente auditiva periférica.

Nesses animais, o posicionamento dos eletrodos pode variar sem, no entanto, alterar o exame. Patel et al. (2013) e Akil et al. (2016) posicionaram os eletrodos na região cefálica (no couro cabeludo entre as orelhas (vértice do crânio- não invertido), região posterior da orelha estimulada (invertido) e da orelha não estimulada (terra), porém Murillo-Cuesta et al. (2017) posicionaram, na mesma espécie animal, no vértice

(não invertido), na região parótida abaixo da orelha (invertido) e na região posterior (cauda ou dorso- terra) ambos com resposta semalhante.

O exame do potencial evocado clique em diversas frequências, em linhagens de ratos, demonstrou cinco ondas, em intervalo de 6 ms após o estímulo, com as quatro primeiras mais constantes. A variação na intensidade do estímulo promoveu efeito direto na latência e amplitude das ondas, com semelhança considerável em relação ao humano. Esse animal por apresentar hábitos noturnos adquiriu um sistema auditivo desenvolvido e sensível com um audiograma considerado representativo dos mamíferos (Kelly e Masterton, 1977).

As formas das ondas assemelham-se às observadas nos humanos, podendo haver alterações na latência entre as espécies, pela diferença no tamanho do crânio (Allen e Starr, 1978). Caracteriza-se por quatro ou cinco ondas principais que ocorrem dentro dos primeiros 10 ms de início de estímulo (Shaw, 1988). Foram observadas, diferenças entre a fonte geradora das ondas entre humanos e animais, sobretudo nos roedores, o que explicaria parcialmente as diferenças entre espécies (Simpson, Krorr, Brailowsky, 1985).

Em ratos, a onda I de ABR é gerada a partir do nervo auditivo, as ondas II, III, IV e V refletem principalmente atividades sinápticas no núcleo coclear, complexo olivar superior, lemnisco lateral e colículo inferior, respectivamente (Chen e Chen, 1991).

A onda II é maior e mais estável, sendo utilizada como parâmetro na determinação do limiar eletrofisiológico. A onda III tem a menor amplitude e a onda V, como não é constante, não deve ser utilizada para avaliar parâmetros do exame (Overbeck e Church, 1992).

As ondas II e IV dos ratos correspondem às ondas III e V em humanos, desta forma, na clássica aferição da latência interpicos devem ser utilizadas as ondas I-IV (Alvarado et al., 2012). A latência do interpico I-IV representa o tempo de transmissão do tronco encefálico, sendo um índice útil e comumente empregado (Shaw, 1988).

A onda III em ratos é análoga a onda IV em humanos, e ambas são geradas no complexo olivar superior, podendo ser observadas formando complexos com a onda subsequente. O complexo formado pelas ondas IV-V no homem, pode ser equiparado à onda IV em ratos e gatos (Buchwald et al., 1981).

A onda III foi a onda de menor amplitude em todas as frequências testadas nas espécies de ratos Wistar, Long-Evans, Sprague-Dawley. Esta amplitude diminuída deve-se ao mascaramento pela onda II. A amplitude de pico a pico de PII e NII podem

ser suficientemente grandes para ocultar a onda imediatamente seguinte, onda III. Quando a amplitude da onda II diminui pode ocorrer redução do efeito de mascaramento e a onda III se torna mais aparente (Alvarado et al., 2012).

A informação auditiva é transmitida através das projeções cruzadas e não cruzadas dentro do *tegmentum* pontino, havendo múltiplas interconexões em todos os níveis. As ondas I e II no rato e I, II e III nos humanos originam-se ipsilateralmente a orelha estimulada (Shaw, 1988). As ondas III e IV em ratos e gatos possivelmente são geradas bilateralmente (Alvarado et al., 2012).

Nos seres humanos, os parâmetros de estimulação e gravação estão padronizados para fins clínicos, proporcionando assim estimativa confiável do limiar auditivo. Estudos demonstram que os limiares e as características das ondas podem mudar entre as espécies e inclusive entre animais da mesma espécie, por isso é importante padronizar os aspectos que serão analisados e utilizar um equipamento adequado para realizar o exame em animais (Alvarado et al., 2012).

Na maioria dos estudos, o exame é realizado sob anestesia. O agente anestésico comumente utilizado é o isoflurano que pode aumentar significativamente as latências de pico e os intervalos interpicos de forma concentração-dependente. Outros anestésicos como a mistura de ketamina / xilazina podem também afetar as respostas auditivas, no entanto, a utilização criteriosa de uma concentração adequada promove baixa variabilidade das latências, não prejudicando a aferição do limiar eletrofisiológico (Santarelli et al. 2003; Van Looij et al., 2004).

A interpretação da latência das ondas, no entanto, apresenta certa dificuldade, pois pode ser influenciada por vários fatores como a configuração de eletrodos de gravação, anestesia, temperatura corporal, idade, nível de intensidade, taxa de estímulo e frequência (Doyle e Fria, 1985; Janssen et al. 1991). É importante, também, avaliar o ruído de fundo (background) que deve permanecer entre 80-120 nanovolts, após 512 estímulos. Para a análise desse ruído realiza-se o exame na ausência do animal. Este teste deve preceder os exames propriamente ditos, pois ruído e artefatos podem mascarar a resposta de limiar reduzido. Para diminuir os artefatos deve-se utilizar uma gaiola de Faraday (Tucker-Davis Technologies, Inc. 2015).

A exposição ao ruído afeta não apenas a parte periférica, mas também a parte central do sistema auditivo, do núcleo coclear ao córtex auditivo. Desta forma, lesão periférica é refletida em mudança do limiar auditivo e em respostas fracas ao som.

Alguns autores observaram aumento da intensidade do estímulo em animais expostos ao ruído, para obtenção de latências comparáveis as observadas em animais não expostos (Popelar et al., 2008).

Conhecer a relação entre o estímulo auditivo e os parâmetros do Peate como limiar, latências de ondas e amplitudes no modelo animal é crucial para estabelecer critérios a fim de identificar a perda auditiva. Essa revisão bibliográfica, previamente apresentada, mostra que o rato é um modelo animal adequado para estudo neurofisiológico do sistema auditivo dos mamíferos, com grandes avanços, nos últimos vinte anos, na compreensão dos parâmetros envolvidos na aferição da audição através do potencial evocado (Shaw, 1988).

3.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa - qRT-PCR

Técnica aprimorada da PCR descrita pela primeira vez em 1992, por Higuchi e seus colaboradores através da monitorização da PCR durante todos os ciclos, detectando o aumento da fluorescência durante a reação, por efeito da ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA de dupla cadeia recém-sintetizadas (Higuchi et al., 1992).

Este procedimento é semelhante à técnica de PCR convencional, porém com quantificação em cada ciclo e em tempo real do DNA amplificado. As fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas, simultâneas e em tempo real, isto é, conforme são formados são detectados, logo a eletroforese em gel torna-se desnecessária para detectar produtos de amplificação, da mesma forma que o sequenciamento de DNA ou Southern Blot, para a identificação do amplicon (Heid et al., 1996; Oliveira, 2010).

É um método simples, específico e sensível. O ensaio permite determinar o ponto no tempo, durante a ciclagem, quando a amplificação de um produto de PCR é detectada pela primeira vez, isto é, quando a intensidade de emissão do corante repórter eleva-se acima do ruído de fundo. Esse número de ciclos é referido como o Ciclo limiar-“cycle threshold” (Ct), sendo determinado na fase exponencial, onde todas as amostras podem ser comparadas. O número de ciclos é inversamente proporcional ao número de

cópias do alvo, desta forma, quanto maior o número de cópias iniciais do ácido nucleico alvo, mais cedo ocorre aumento significativo na fluorescência e menos ciclos são necessários (Oliveira, 2010).

Quando o DNA amplificado é proveniente do RNA mensageiro (RNAm), a partir da transcrição reversa, o primeiro passo da reação consiste na síntese de uma fita de DNA utilizando como “template” uma fita de RNA, numa reação catalisada pela enzima transcriptase reversa. O estudo do DNA complementar (cDNA) gerado consiste em uma ferramenta útil para analisar a expressão gênica, pois avaliando o RNAm, pode-se detectar quais proteínas estão sendo efetivamente expressas, uma vez que, o estudo de RNA, sobretudo do RNAm apresenta certa dificuldade, em virtude da sua alta sensibilidade, especialmente, às altas temperaturas.

Para análise é necessário observar o limiar (“threshold”) e o ponto “Cycle threshold” (Ct). O “threshold” corresponde ao limiar mínimo de detecção de fluorescência do instrumento, considerado o ruído de fundo do equipamento, é automático e arbitrariamente definido pelo software do equipamento e o Ct, denominado de “cycle threshold”, corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectável, ou seja, para que haja amplificação. Neste ponto, a fluorescência detectada ultrapassa o limiar da fase exponencial (Heid et al., 1996; Kubista et al., 2006).

Baseado nesses conceitos, o valor de Ct, na maioria dos protocolos da PCR em tempo real, varia entre 17 (aproximadamente 10 milhões de moléculas iniciais) a 37 ciclos (aproximadamente 01 molécula inicial), com padrão de 40 ciclos (Van Pelt-Verkuil, Van Belkum, Hays, 2008).

Nessa reação é importante avaliar a eficiência (E) da amplificação, que deve variar entre os 90% e 100% ($-3.6 > \text{declive} > -3.1$) e pode ser influenciada por inúmeros fatores, isto é, comprimento do amplicon, existência de estruturas secundárias na amostra, qualidade dos “primers” utilizados, procedimentos laboratoriais incorretos, presença ou utilização de inibidores da PCR como hemoglobina, ureia, heparina, glicogênio, gorduras, íons cálcio, etc, presença ou utilização de promotores da PCR (glicerol, DMSO, BSA, proteína gene 32, Taq Extender), entre outros. Uma equação básica para avaliar eficiência é: $E = 10^{(-1/\text{declive})} - 1$ (Oliveira, 2010).

Para o protocolo desse método, é utilizado um termociclador que procede às oscilações de temperaturas, necessárias aos três ciclos da PCR. Esses equipamentos

apresentam ainda um sistema óptico, uma fonte de iluminação ultra-violeta e um detector de fluorescência. A mensuração da fluorescência é realizada a cada instante pelo computador conectado ao sistema. Podem-se utilizar dois tipos de compostos fluorescentes: os corantes intercalantes ou sondas de sequência específica (Van Pelt-Verkuil, Van Belkum, Hays, 2008).

Os corantes intercalantes são fluorocromos sem especificidade para uma sequência particular de DNA, que se intercalam na dupla cadeia de qualquer produto da PCR permitindo a sua detecção, são exemplos mais conhecidos o SYBR® Green (Molecular Probes®, Inc). Sondas de sequência específica são oligonucleotídeos dispostos em sondas lineares ou em alça específica para uma sequência associada ao fluorocromo, a fim de detectar a sequência em todos os produtos da PCR. O exemplo mais utilizado é a tecnologia TaqMan® (Applied Biosystems Foster City, CA, EUA) destinada à detecção de sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na qRT-PCR. Nessa tecnologia a atividade exonucleotídica 5'-3' da Taq DNA polimerase é de fundamental importância (Holland et al., 1991).

A tecnologia TaqMan® é constituída por dois “primers” específicos de uma determinada sequência de DNA e uma sonda Taqman® homóloga à região do fragmento de DNA entre os “primers”. A sonda apresenta na extremidade 3' uma molécula que aceita a energia da molécula repórter e a dissipa na forma de luz ou calor, designada por quencher, e na extremidade 5' um fluorocromo repórter (Heid et al., 1996; Novais e Pires-Alves 2004). A proximidade física da molécula repórter e do quencher, no princípio da análise suprime a detecção da fluorescência, esta será emitida quando a molécula é clivada, separando o quencher do repórter, baseado no princípio de transferência de energia ressonante por fluorescência (FRET) (Oliveira, 2010).

A técnica de qRT-PCR pode ser utilizada para avaliar expressão de RNAm, mensurar o número de cópias de DNA genômico ou DNA virais, cópias de transgenes, ensaios de discriminação de alelos e confirmação de dados de “microarray”. Por ser muito específica é indicada para análise de amostras limitadas como expressão de genes com variantes de “splice”, tecidos embebidos em parafina, material obtido por microdissecção à laser, células classificadas por fluxo ou RNA amplificado aleatoriamente de células isoladas, sendo, também, considerado o padrão-ouro para avaliar silenciamento gênico (Ginzinger, 2002).

Os dois métodos mais comumente utilizados na análise dos dados são quantificação absoluta e quantificação relativa. A quantificação absoluta determina o número de cópias do gene, geralmente baseado no sinal fluorescente em relação a uma curva padrão. A quantificação relativa é utilizada para determinar as mudanças na expressão de um gene alvo relacionada à amostra teste e à amostra controle, sendo o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ adequado para analisar essas mudanças relativas na expressão gênica na reação (Livak e Schmittgen, 2001).

A quantificação absoluta geralmente é desnecessária, uma vez que o conhecimento do número de cópias absolutas do transcrito, não oferece a elucidação a respeito de uma situação que poderia alterar a expressão gênica, no entanto, a quantificação relativa permite avaliar um gene específico em situações experimentais diferentes. Então, é mais adequado observar o aumento da expressão de um gene na ordem de 2,5 em relação à situação em estudo, do que o aumento no número de suas cópias (Livak e Schmittgen, 2001).

A quantificação relativa é o método analítico de escolha para a maioria dos estudos, pois é realizada uma comparação do gene de interesse dentro de uma amostra (DNA ou cDNA) nas situações controle e teste. Neste método é necessário que a eficiência da PCR de todos os genes seja semelhante e de preferência igual ou acima de 90%. Para o cálculo da expressão gênica deve ser realizada a normalização com gene endógeno e determinado um calibrador. O gene controle ou endógeno geralmente é um gene constitutivo (“housekeeping”) presente na maioria das células e que se mantém estável nas situações teste e controle, ou seja, apresenta pouca variação de Ct. O objetivo de determinar um controle interno é normalizar a PCR para um total de RNA adicionado à reação de transcrição reversa (Livak e Schmittgen, 2001). A quantificação é feita a partir da diferença entre o Ct do gene de interesse em relação ao gene controle (endógeno). Esta diferença entre o gene de interesse e o gene controle é denominado ΔCt , em seguida é realizada a diferença entre o ΔCt da amostra teste, e o ΔCt da amostra controle, que é denominado $\Delta\Delta Ct$. Para saber o grau de expressão gênica se utiliza a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ representando a variação (“fold change”), para esses dois genes. A comparação com um gene de controle tem tanto conotações positivas quanto negativas.

O calibrador nessa reação, em um desenho simples de experimento, é considerado a mostra controle. Os dados são então apresentados segundo a variação (“fold-change”) da expressão de um gene normalizado para um gene de referência

endógeno e em relação ao controle não tratado (calibrador). Para a amostra-controle não tratada, $\Delta\Delta\text{ct}$ é igual a zero então $2^{-0} = 1$, assim valores maiores que 1 indicam aumento da expressão gênica e abaixo de 1, diminuição da expressão gênica (Livak e Schmittgen, 2001).

A Expressão gênica é o processo pelo qual a informação contida em um gene é traduzida em estruturas presentes em um determinado tipo celular como RNAm ou proteínas. A identificação do RNAm expresso em um dado organismo ou tecido permite comparar o perfil de expressão gênica em diferentes condições ambientais, estados patológicos, fisiológicos ou de desenvolvimento e identificar genes e vias moleculares envolvidas em processos biológicos: genes com perfil de expressão semelhante podem estar funcionalmente relacionados ou sob o mesmo mecanismo de controle. Este conhecimento possibilita a manipulação de drogas, melhoramento de plantas, identificação de marcadores para diagnóstico molecular de doenças e de alterações no proteoma e/ou metaboloma.

As tecnologias que avaliam o perfil transcricional permitem analisar populações de RNAm a partir de células ou tecidos selecionados, produzindo medidas de expressão gênica, porém, cada tecnologia fornece dados com diferentes utilizações e interpretações. As tecnologias fechadas como os microarranjos de DNA, baseiam-se na existência do conhecimento prévio dos genes, com sondas desenhadas para se ligarem a transcritos conhecidos (Kuo et al., 2002). A diferença de duas vezes ou mais entre os sinais de fluorescência dos cDNAs marcados tem sido utilizada como medida de expressão diferencial e significativa de um gene sob duas situações experimentais diferentes (Ruan, Gilmore, Conner, 1998).

Os “microarrays” são dispositivos biomoléculais que medem o transcriptoma de uma célula de interesse. O fluxo de trabalho de um experimento utilizando “microarrays” compreende:

1. Extração de RNA;
2. Obtenção do cDNA;
3. Hibridação em “microarray”;
4. Intensidade de pontos em valores numéricos;
5. Normalização;
6. Análise dos resultados.

A normalização no “microarray” consiste na suposição de que a grande maioria dos genes não é diferencialmente expresso entre as duas classes, permitindo a remoção do viés técnico para detecção das diferenças biológicas (Ruan, Gilmore, Conner, 1998).

Os “microarrays” de DNA permitem uma identificação rápida de genes expressos. A partir desta informação pode-se desenvolver biomarcadores, elucidar mecanismos moleculares de doenças e agrupar amostras semelhantes com base em assinaturas de genes. A avaliação dos genes diferencialmente expressos fornecem uma base para a compreensão de questões biológicas, servindo de ponto de partida para análises de acompanhamento e classificação de condições patológicas.

3.4 Silenciamento gênico

O termo RNAi foi criado, após a descoberta de que a introdução de RNA dupla fita em nematódeos da espécie *Caenorhabditis elegans* promovia o silenciamento específico de genes, cuja sequência era altamente homóloga ao RNA dupla fita (dsRNA) administrado (Fire et al, 1998).

O RNAi está ligado ao silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), em que a célula apresenta uma maquinaria própria, provavelmente por ser um mecanismo de proteção do genoma contra elementos móveis, denominados transposon e vírus que produzem RNAs aberrantes ou dsRNA (*double strand RNA*- RNA dupla fita), quando ativos.

Em 2001, Tuschl et al. confirmaram que a utilização de dsRNAs com pequena quantidade de nucleotídeos (ntd), aproximadamente 21, era capaz de induzir o silenciamento de gene endógeno em mamíferos, especificamente para o RNAm. A partir de então, esta técnica tornou-se uma ferramenta de extrema importância na pesquisa científica.

O dsRNA, com pequeno número de nucleotídeos 20-23, apresenta ação bloqueadora sobre o RNAm e, portanto, promove bloqueio da síntese protéica relacionada, por ação da clivagem e degradação do RNAm de modo sequência-específica. É um mecanismo de “Knockdown”, pois não bloqueia totalmente o RNAm, mas diminui a tradução (Martinez et al., 2002).

O RNAi participa em processos biológicos de desenvolvimento, formação da heterocromatina, proteção celular contra vírus e proliferação de transposons. É uma técnica de ampla aplicação em pesquisa científica, permitindo o “knockdown” simples, mas eficaz de genes de interesse (Dykxhoorn et al., 2003).

A técnica de RNAi está indicada no teste de hipótese para confirmar a participação de um gene, em uma situação fisiológica ou patológica; na validação de alvos para determinar qual o melhor à ação de medicamentos; na análise de via metabólica; no reconhecimento de genes, chamados redundantes, pois executam a mesma função de um gene fundamental à função vital da célula; no screening funcional, isto é como bibliotecas de siRNA para avaliar situações fisiológicas e patológicas e como ferramenta terapêutica.

Existem dois métodos básicos de silenciamento: o siRNA (“short interfering”) entregue sozinho na célula ou o shRNA (“short hairpin” RNA), associado a um vetor viral ou plasmídeo, com posterior processamento em siRNA. Existem vantagens e desvantagens nos dois métodos, que devem ser escolhidos de acordo com o objetivo do experimento.

Os shRNAs são mais demorados para serem construídos e testados necessitando de cuidados específicos na manipulação, pois são transportados ao interior das células alvo por meio de vetores virais (retrovírus, adenovírus ou lentivírus) ou plasmídeo, podendo induzir mutagênese e imunogenicidade. A vantagem deste tipo de RNAi, no entanto, é quanto ao tempo de duração da ação que é mais prolongada (Bantounas, Phylactou, Uney, 2004). Por outro lado, o siRNA é mais prático e fácil de utilizar, pois consiste de pequenas sequências de nucleotídeos, que atravessam a membrana celular para realizar sua função, mas apresentam meia-vida curta, e uma vez transfectado, a inibição do alvo é passageira, por até 48h, no caso do gene e 72h no caso da proteína.

O uso de siRNA *in vivo*, por conseguinte, apresenta certas limitações referentes à via de administração e a sua estabilidade nos meios intra e extracelular. É importante considerar a sua estabilidade, pureza, meios de proteger a sua degradação, durante a trajetória até o tecido alvo e da excreção rápida, que pode ocorrer antes da degradação (Soutschek et al., 2004). Pode ser administrado por via local ou sistêmica, devendo-se avaliar sua estabilidade até a célula alvo, pois os líquidos corporais apresentam alta concentração de endonucleases.

À vista disso, estudos estão sendo realizados para avaliar as vias de administração local, que pode ser tópica, intranasal, intra ou trans-timpânica, intracerebral e intra-vitreal e administração sistêmica, pelas vias intravenosa ou intraperitoneal, com resultados satisfatórios (Li et al., 2005, Taishi et al., 2007). A injeção intravitreal de siRNA no globo ocular, para evitar a degeneração macular, inclusive, encontra-se no estudo de fase II (Guzman- Aranguéz, Loma, Pintor, 2013).

A dupla fita de siRNA administrado deve ter características bem específicas, que são um grupo fosfato na extremidade 5' (5'-P) e dois nucleotídeos não pareados na extremidade 3' (2 nts 3' *overhang*). Esta dupla fita é incorporada a um complexo efetor ribonucleoprotéico, denominado RISC (RNA- “induced silencing complex”) havendo clivagem de uma das fitas e reconhecimento da molécula de RNAm que será bloqueada, a partir da complementariedade entre esta fita e a fita guia antisense (Martinez et al., 2002).

A fita com a extremidade 5' menos estável da dúplex, isto é, com menor temperatura de Melting, é incorporada no RISC e serve de guia para encontrar a fita complementar do RNAm a ser silenciado, enquanto a outra fita é eliminada (Martinez et al., 2002). A escolha da fita depende das características termodinâmicas da mesma, definido nos termos da energia livre de Gibbs ($\Delta G = \text{Kcal/mol}$) (Rand et al., 2005).

A proteína argonauta (ago), faz parte do complexo RISC e participa de todas as vias do RNAi. É caracterizada por dois únicos domínios, PAZ e PIWI, cujo funcionamento não está bem esclarecido. Na ago 2, o domínio PAZ se liga à extremidade 3' da duplex do siRNA, que apresenta dois nucleotídeos “overhang” e o PIWI realiza a atividade nucleolítica. Estes domínios, além de promoverem a separação da dupla-fita, são essenciais no reconhecimento e clivagem do RNAm alvo (Elbashir et al., 2001).

Desta forma, quando ocorre o emparelhamento do tipo Watson-Crick entre a fita-guia e o RNAm alvo, a atividade endonucleolítica da Ago 2 quebra a ligação fosfodiéster, entre o décimo e décimo primeiro nucleotídeo, medido a partir da extremidade 5' da fita guia, inativando o RNAm e bloqueando a tradução da proteína (Elbashir et al., 2001).

Maeda et al. (2005) avaliaram o silenciamento do gene *GJB2-Gjb2* em células embrionárias renais humanas (HEK293) e em células P19 de camundongos, respectivamente e observaram uma eficiência de transfecção *in vitro* de $90.3 \pm 3.1\%$

(HEK293) e $78.6 \pm 3.6\%$ (P19 cells). A administração trans-timpânica de siRNA em ratos mostrou-se eficiente para investigar a participação da proteína NOX3 NADPH oxidase na perda auditiva, causada pela cisplatina (Mukherjea et al., 2010, 2011) e a administração via janela redonda do siRNA *Stat1*, para promover preservação dos limiões auditivos e das células ciliadas, por supressão da inflamação ocasionada pela cisplatina (Kaur et al., 2011).

Inúmeros testes clínicos e experimentais com células e animais estão sendo realizados em todo o mundo, objetivando a utilização em humanos, no entanto, sua administração continua uma questão importante a ser avaliada, sobretudo na otoproteção, com maior número de pesquisas sendo necessárias para seu uso efetivo.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP, de acordo com o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e Resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, sob o protocolo:146/15.

4.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar do sexo masculino com cerca de 30 dias de idade e 50g de peso, mantidos em gaiolas plásticas apropriadas, devidamente identificadas, forradas com maravalha, trocadas diariamente, sob condições controladas de temperatura (entre 22-23°C) e umidade ($60 \pm 5\%$).

Os animais livres de germes patogênicos específicos (Specific Pathogen Free-SPF), fornecidos pelo Biotério do Instituto de ciências biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) foram aclimatizados por 72h no novo alojamento para reduzir o estresse do transporte e do novo ambiente (Fish et al., 2008).

A água e a alimentação balanceada para os roedores foram fornecida *ad libitum*, em ciclos de luz / escuridão de 12h, com manuseio de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Lapchik, Mattaraia, Ko, 2010).

Para verificar o efeito do silenciamento no limiar eletrofisiológico, vinte animais foram utilizados. Cada animal foi submetido à cirurgia trans-timpânica binaural, para introdução do siRNA *Tnfa* em uma orelha e do siRNA *scramble* (controle negativo) na orelha contralateral de forma randomizada (www.randomization.com) previamente à exposição ao ruído. Para a realização do qRT-PCR na placa de Taqman® array 96- well FAST plate da via metabólica do *Tnfa* (lote n.: 1605216-001 Applied biosystemsInc. Foster City CA USA) 20 cócleas (10 animais) foram divididos em dois grupos: grupo siRNA *scramble* (10 cócleas) e grupo siRNA *Tnfa* (10 cócleas).

Para análise comparativa da expressão gênica de animais expostos ou não ao ruído, 20 cócleas (10 animais) foram utilizadas e divididas em dois grupos: grupo ruído (10 cócleas) e grupo não ruído (10 cócleas).

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

Previamente à realização do exame eletrofisiológico o reflexo de *Preyer* foi pesquisado (Jero, Coling, Lalwani, 2001). Em seguida os animais foram submetidos à otoscopia e ao exame Peate clique, antes dos experimentos, para seleção dos mesmos.

Foram incluídos os animais com reflexo de *Preyer* positivo e limiar auditivo no Peateclique de 50 dBSPL e excluídos os animais conforme alguns critérios patológicos listados abaixo:

- Patologia sistêmica determinada pelo estado de hidratação, aspecto geral de pelagem, postura e consistência das fezes
- Patologia da orelha externa, tais como, edema, hiperemia do conduto auditivo externo, tumoração ou rolha de cerúmen
- Patologia da orelha média, opacificação, abaulamento, hiperemia ou perfuração de membrana timpânica

4.4 Anestesia

O exame foi realizado sob anestesia inalatória com isoflurano, com taxa de fluxo de O₂ de 2,5 l/min. Na indução, em gaiola acrílica, por cerca de 5 min, a taxa de isoflurano utilizada foi de 4%, em seguida, os animais foram colocados sob máscara e a taxa reduzida (Figuras 3 e 4). Para evitar desconforto, durante a colocação dos eletrodos subdérmicos, utilizou-se isoflurano a 2,5%, com redução para 1,5 a 1,8%, na realização do exame (Figura 4). Para cada animal foi determinada a concentração mínima de isoflurano entre 1,5% a 1,8%, a fim de promover sedação sem interferência na resposta auditiva, em condição controle e pós-ruído (Gourévitch et al., 2009, Melgas-Rojas et al., 2015).

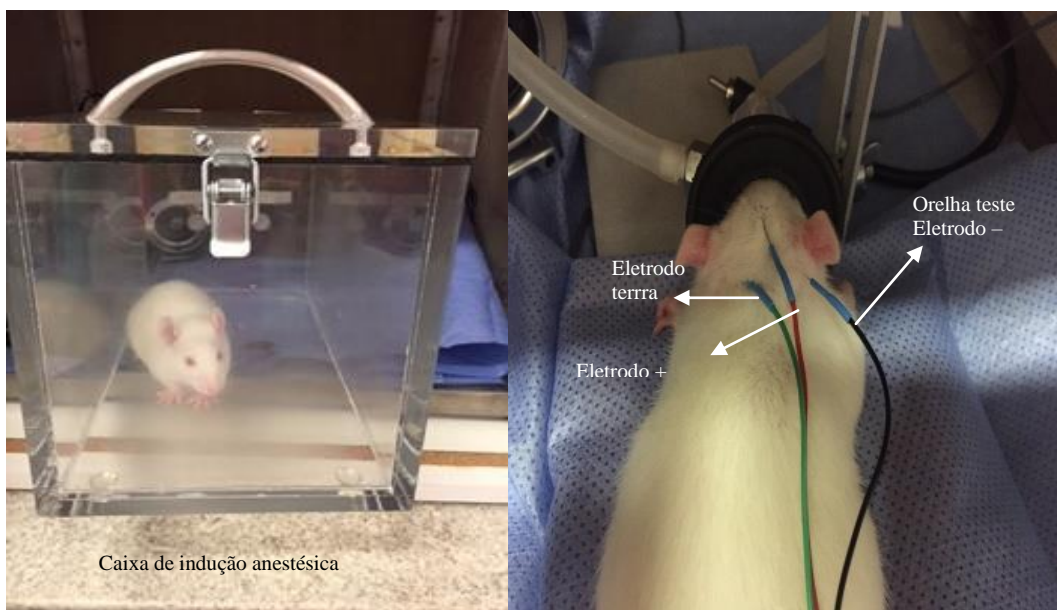
Como movimentos musculares e sedação inadequada poderiam interferir no teste, a avaliação do plano anestésico foi realizada através do teste de pinçamento da pata e cauda, com ausência de movimentação indicando plano anestésico satisfatório, mantendo-se o menor nível anestésico possível (Filho, 2006).

A temperatura corpórea foi mantida em torno de 37,5°C através de manta térmica e os olhos foram protegidos com epitezan® pomada oftálmica (Melgas-Rojas et al., 2015).



Fonte: Banco de imagens do autor

Figura 3. Indução da anestesia



Caixa de indução anestésica

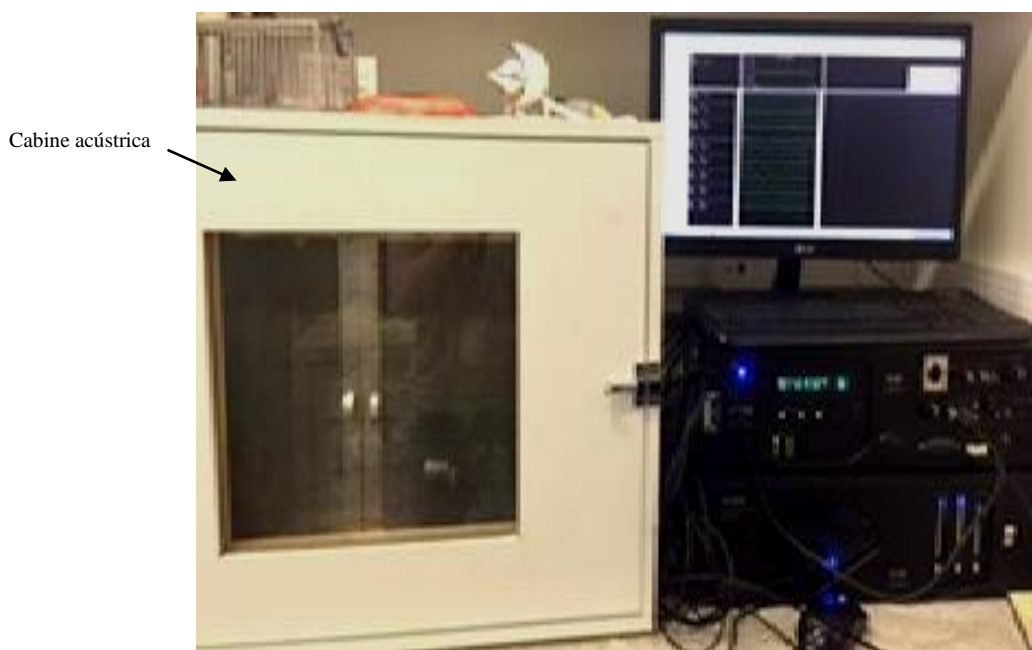
Banco de imagens do autor

Figura 4. Indução da anestesia e Inserção dos eletrodos

4.5 Exame do Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico (Peate)

Utilizou-se o aparelho TDT System 3 RZ6 (Tucker-Davis Technologies, inc. Alachua, FL. EUA) especificamente desenvolvido para o uso em animais de laboratório. A metodologia utilizada foi a do fabricante, mas também, baseada em estudos semelhantes na literatura (Gourévitch et al., 2009; Alvarado et al., 2012; Melgas-Rojas et al., 2015).

O animal foi mantido sob anestesia inalatória, no interior de uma gaiola de Faraday aterrada (25 x 18 x 10 cm) contida em uma caixa de isolamento de som à prova de luz (dimensões internas: 76 x 48,5 x 70,5 cm) (Insight - Equipamentos, Pesquisa e Ensino©. Ribeirão Preto-SP, Brasil) (Figuras 6 e 7), a fim de evitar interferência acústica e elétrica no exame. O procedimento durava em média 60 minutos para cada animal, não havendo sinais aparentes de estresse excessivo, como comportamento estereotipado, durante e após as gravações.



Banco de imagens do autor

Figura 5. Equipamento para Peate- TDT System 3 RZ6 (Tucker-Davis Technologies, inc. Alachua, FL. EUA) com cabine acústica



Banco de imagens do autor

Figura 6. Cabine de atenuação do som e blindagem elétrica (Gaiola de Faraday)

Os eletrodos de agulha subdérmicos com 12 mm de comprimento, 27 mm de diâmetro, com cabos de ligação codificados por cores e conectores de segurança de 1,5 mm, fornecidos com o equipamento, foram introduzidos no vértex (base do crânio-positivo), na posição retroauricular da orelha teste (referência- negativo) e na posição retroauricular na orelha contralateral (terra) (Figura 4) e conectados na entrada apropriada do equipamento de baixa impedância (Ra4LI *headstage*) (Tucker-Davis Technologies, Inc. Alachua, FL, USA) (Figura 7).

A impedância é a medida de resistência do eletrodo negativo e do eletrodo positivo, em relação ao eletrodo terra. A alta impedância pode resultar em uma resposta diminuída, por isso foi mantida em 1-3 KOhm individualmente.

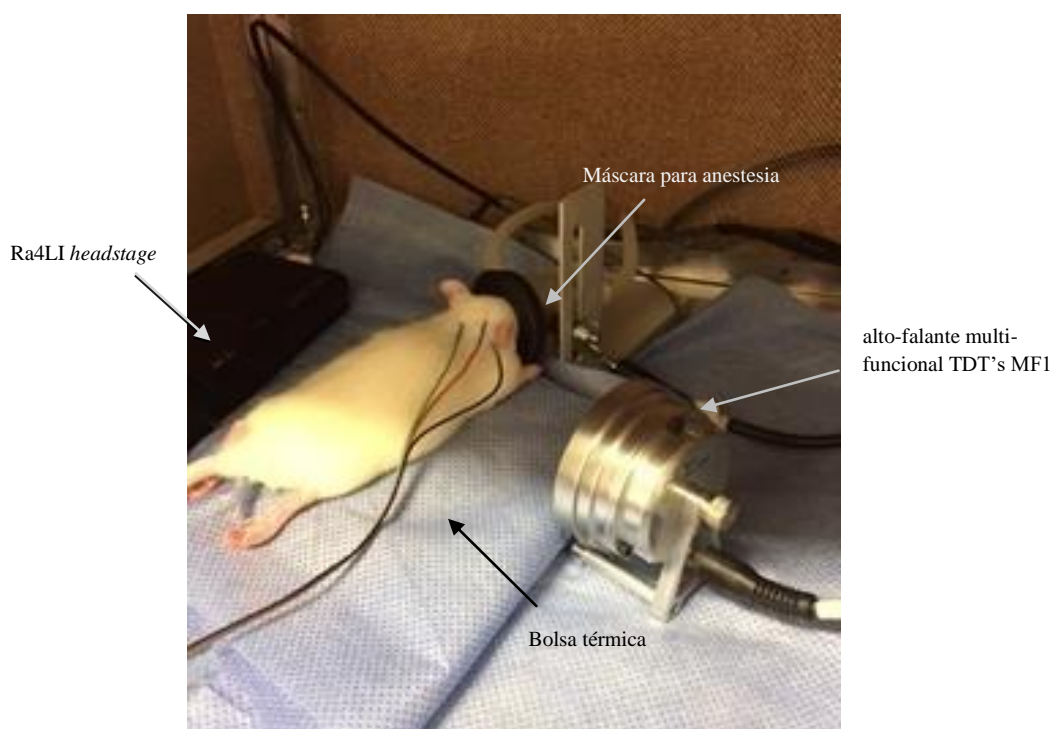
A estimulação sonora e gravação foram realizadas pelo software BioSigRZ System III, os estímulos foram digitalmente gerados pelo software SigGenR e pelo hardware processador multifuncional RX6 piranha (Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, EUA), e consistiram de estímulos tipo clique que são estímulos sonoros em ampla faixa de frequências do som.

Neste equipamento, uma janela de resposta de 10ms é adquirida de um único canal de aquisição no RA4PA, através da fibra óptica RZ6 e um total de 512 respostas são calculadas em média em cada nível. A intensidade do estímulo variou de 90 dB SPL a 40 dB SPL (decibel – nível de pressão sonora/”sound pressure level”) com redução sucessiva de 10 dB SPL. As respostas evocadas foram filtradas (0,3-3,0 kHz, NT=60 Hz) e armazenadas para análise off-line.

A estimulação em campo aberto foi utilizada pela dificuldade na inserção da sonda e na calibração do som em sistema fechado nesses animais. O alto-falante multifuncional TDT's MF1 (Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, EUA) foi posicionado a uma distância fixa, cerca de 5-10 cm, ao lado da orelha teste, com o centro do alto-falante em direção ao pavilhão auricular, alinhado ligeiramente fora do eixo com a parede da gaiola de Faraday, para evitar a reflexão cumulativa do som sobre a orelha teste. Foi certificado que o conduto auditivo externo estava completamente aberto e que não existiam obstáculos entre o alto-falante e a orelha estimulada (Figura 7).

Nesse tipo de estímulo, os alto-falantes estimulam as duas orelhas e provocam uma resposta binaural. Para obter respostas predominantemente monofônicas, com alto-falantes de campo livre, especialmente após-silenciamento e exposição ao ruído, a atividade contralateral foi eliminada por oclusão com tampão auricular (Murillo-Cuesta et al., 2017).

O ruído de fundo (“background noise”) foi medido antes de iniciar os exames, considerando-se aceitável entre 80 a 100 nV. A presença de resposta foi considerada apenas quando havia a reprodutibilidade do traçado, realizando-se, então, a estimulação em duplicata (Dantas, 2001).



Banco de imagens do autor

Figura 7. Posicionamento do animal na gaiola de Faraday

Na estimulação de alta intensidade, cinco formas de onda de resposta, cada uma constituída por um pico positivo, foram identificadas e rotuladas com números romanos, na seqüência de I a V (Shaw, 1988)

As ondas II-III-IV foram consideradas nesse estudo, nas altas frequências a onda II foi utilizada para avaliação do limiar eletrofisiológico, pois em ratos, é a onda mais proeminente, robusta e estável, podendo ser detectável em baixas intensidades, para estímulo de clique (Alvarado et al., 2012). O limiar eletrofisiológico considerado foi a menor intensidade de estímulo capaz de desencadear o aparecimento da onda II.

A avaliação eletrofisiológica nos animais foi realizada previamente à cirurgia de silenciamento (D0) e 16h após a exposição ao ruído (D3) (Figura 8). A análise foi manual, através da identificação de 4-5 ondas (I,II,III ...etc) e marcação dos picos positivos (P1,P2,P3...) para cada onda. Completada a análise, os dados foram exportados para uma planilha Excel.

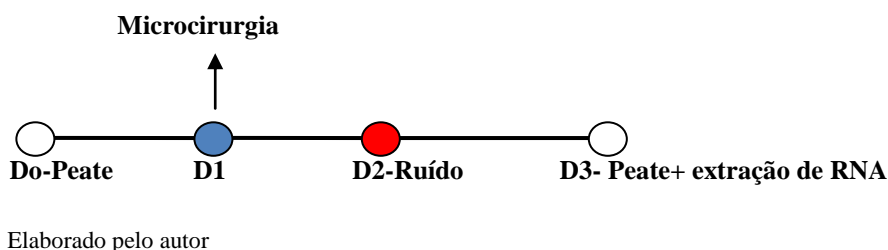


Figura 8. Realização de Peate no experimento de silenciamento gênico

4.6 Microcirurgia para introdução do siRNA *in vivo* através de injeção trans-timpânica

Foi utilizado o siRNA para o *Tnfa* (Thermo Fisher Scientific, núm. cat: AM 16830; ID: 189047; Lot: ASO23TR1) e para o *Sramble* (Thermo Fisher Scientific, núm. cat: AM16230; ID: 103860; Lot: ASO23URI). O siRNA *Tnfa* foi obtido na quantidade de 100.000 pmoles e ressuspenso em 400ul de água RNase *free* para uma concentração de 250 pmol/ul na solução estoque. O peso molecular no Certificado de Análise para o duplex anelado foi de 13325,4 g/mol, 10ul da solução estoque foi diluída em 40ul de água RNase *free*, sendo administrado 10ul na orelha, via transtimpânica, equivalendo a

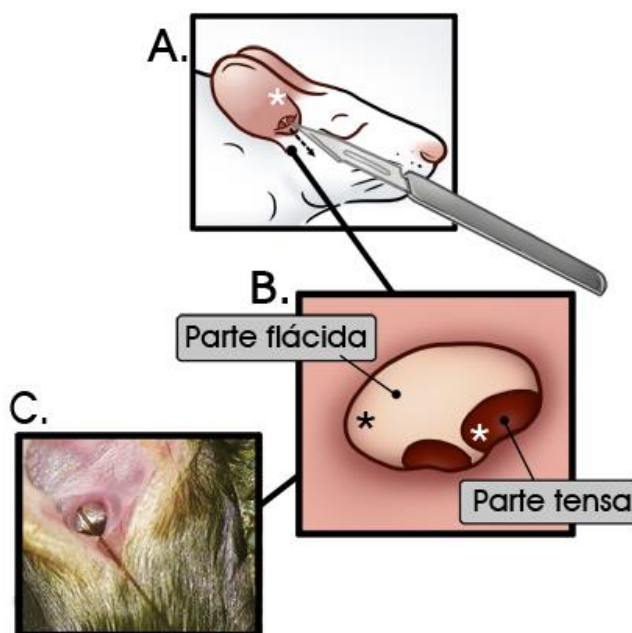
administração de 625 pmol por orelha. O mesmo cálculo foi realizado para o siRNA *scramble* que correspondia a sequência de nucleotídeos semelhante ao siRNA alvo, porém de forma embaralhada, para não produzir silenciamento, sendo considerado o controle negativo.

O animal foi submetido à anestesia com uma mistura de Ketamina (ketalar® Packe-Davis 50 mg/Kg) e xilasina (rompum® Bayer 10 mg/Kg) por via intraperitoneal. Após o procedimento o animal recebia analgesia com dipirona 100mg/kg a cada 12h, sendo realizada terapia antimicrobiana com penicilina benzatina 1000.000 UI/kg IM, dose única (Filho, 2006; Lapchik, Mattaraia, Ko, 2010)

O animal, no plano anestésico, foi colocado em decúbito lateral, sobre uma manta térmica, para manutenção da temperatura, e com os olhos protegidos com epitezan® pomada oftálmica. A assepsia local foi realizada com álcool a 70%, em toda a orelha, sobretudo na área cirúrgica, abaixo do meato auditivo externo.

O conduto auditivo externo e membrana timpânica foram examinados através do microscópio cirúrgico zeiss© (Carl Zeiss Corporative, Oberkochen, Alemanha) para limpeza e observação de alguma alteração e/ou inflamação na membrana timpânica ou conduto auditivo externo (Yu et al.2012).

Foi realizado incisão longitudinal de 0,5 cm na região vertical do meato acústico externo, próximo ao tragus (Figura 10A). Após hemostasia local, sob visão microscópica, identificou-se na membrana timpânica a *pars flaccida* superior e a *pars tensa* inferior, está dividida em duas regiões (anterior e posterior), pelo cabo do martelo (Figura 10B).



A: incisão na região inferior do conduto auditivo externo. B: visualização da membrana timpânica. Na parte tensa * indica o local da miringotomia, na parte flácida * indica o local de administração do siRNA. C: administração do siRNA no quadrante posterior externo da parte flácida. Adaptado de Murillo-Cuesta et al., 2017

Figura 9. Microcirurgia no Rato Wistar para introdução do siRNA

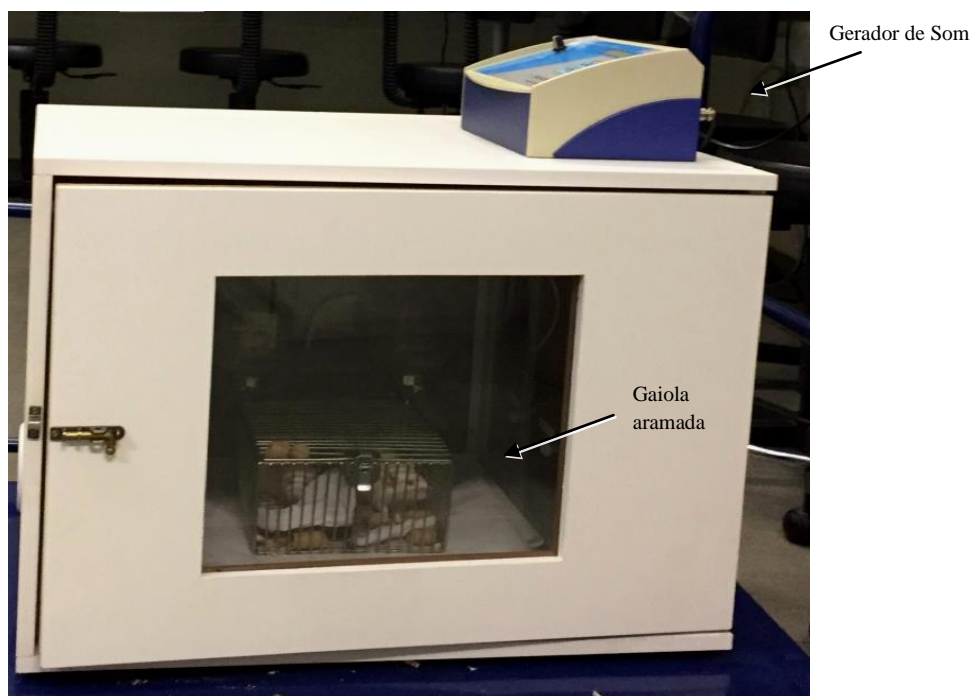
Uma pequena miringostomia foi realizada na região anterior da parte tensa (pars tensa) da membrana timpânica, para permitir a evacuação de ar durante a injeção, seguida por uma pequena incisão no quadrante posterior externo da parte flácida (pars flaccida), para administração do líquido (Murillo-Cuesta et al., 2017) (Figura 10B). Com micro-seringa de vidro de Hamilton de 10 μ l (“MicroLiter serie” 700 modelo 701N, núm. cat: 80330), 10 μ l de solução foi introduzido suave e lentamente por 5 segundos (s), próximo do nicho da janela redonda até que o ouvido médio ficasse claramente cheio (Figura 10 C). Sob visualização, a injeção da solução no interior da caixa timpânica não promoveu nenhum dano local. A agulha permaneceu no local por alguns segundos, após a injeção, sendo retirada muito lentamente (Yu et al., 2012). O animal permaneceu por 30 min em decúbito lateral sendo realizada sutura cirúrgica com fio seda 5-0 e limpeza local com álcool a 70%. O animal foi posicionado do outro lado e realizado mesmo procedimento na orelha contralateral, para injeção do siRNA *Tnfa* (Mukherjea et al., 2010; Yu et al., 2012; Murillo-Cuesta et al., 2017).

O rato foi aquecido e após recuperação anestésica, mantido em gaiola individual. A ferida cirúrgica e a membrana timpânica foram revisadas 24 e 48h após a cirurgia, sem observação de alteração considerável.

4.7 Exposição ao ruído

Os animais, em número de cinco por vez, foram colocados acordados em uma gaiola aramada no interior de uma caixa com isolamento acústico, exaustão e circulação de ar interna, medindo 760 x 485 x 705 mm, associada ao gerador de Sinais de Áudio - EP 125, com livre acesso à água e comida. O estímulo utilizado foi o ruído branco de alta frequência (12000 Hz à 20000 Hz), na intensidade sonora de 120 dBNPS por três horas, produzido por um gerador de som e reproduzido através de alto-falantes posicionados na parte superior da caixa, acima da gaiola dos animais (Insight - Equipamentos, Pesquisa e Ensino - © Ribeirão Preto/SP) (Figura 11).

O nível de ruído em toda a caixa foi constante e semelhante ao observado no campo sonoro da cabeça do animal, medido através de um decibelímetro digital (medidor de pressão sonora) AK 824. Este nível de ruído foi escolhido porque é capaz de induzir perda de audição permanente e apoptose de células sensoriais (Hu et al., 2009; Hu e Cai, 2010; Patel et al., 2013).



Banco de imagens do autor

Figura 10. Caixa de isolamento acústico com gerador de ruído e os animais no interior da caixa aramada

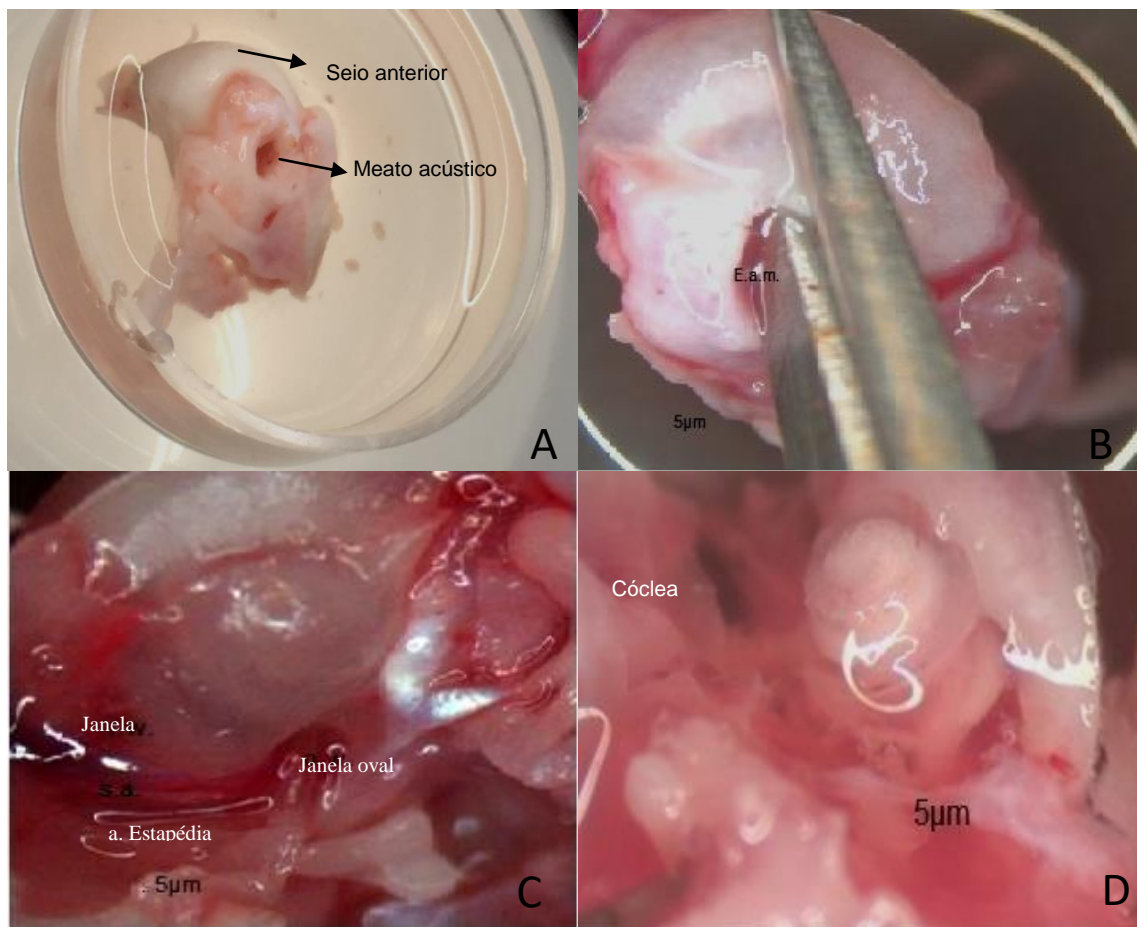
4.8 Análise da expressão gênica

4.8.1 Extração de RNA

Os animais, profundamente anestesiados, com 5% de isoflurano (1 L/min de fluxo de O₂), foram sacrificados através da decapitação. Os ossos temporais foram rapidamente removidos e colocados em tubo com solução gelada, utilizada para estabilização do RNA, RNA *later* (Qiagen, Valencia, CA, USA, núm. cat:76106). Todo o processo foi realizado em 6 a 8 min para evitar a degradação de RNA da amostra (Melgar-Rojas et al., 2015).

Previamente, o material cirúrgico foi limpo com RNase Zap (Sigma-Aldrich, núm. cat: R2020) e mantido a 4°C por 15 min, da mesma forma que toda a bancada e o local de dissecação sob microscopia, para evitar a degradação do RNA.

Para remoção da cóclea, a tesoura de dissecação foi colocada na região posterior da cabeça do animal, fazendo um corte longitudinal médio no crânio, abrindo a região no plano mediano. Em seguida, usando as mãos, com o meato auditivo externo como guia, a bula timpânica foi localizada com os polegares e, através de um movimento suave e rotatório foi separada das outras estruturas (Albuquerque et al., 2009) (Figura 11 A).



Eam (“External acoustic meatus” / Meato acústico externo). Banco de imagens do autor

Figura 11. Procedimento para extração do RNA

A bula timpânica foi aberta segurando-a com uma das mãos e colocando a tesoura no meato auditivo externo na direção do seio anterior, em um único movimento (Figura 11B). Então a parte óssea foi aberta expondo a cóclea (Figura 11C).

A cóclea membranosa foi exposta, após a remoção da cobertura óssea por meio de cortes com pinça, ao nível da janela redonda e na lateral dessa estrutura (Figura 11D). A estrutura membranosa foi colocada em tubo contendo 1 ml (1000 μ l) TRIzol[®] (Thermo Fisher Scientific, núm. cat: 15596018) mantido no gelo.

Após a colocação das cócleas no TRIzol[®], realizou-se a homogeneização do tecido com Rotor-stator a 5.000 rpm por 90 s ou até a total homogeneização. O lisado celular em TRIzol[®] permaneceu em temperatura ambiente por 5 min, para permitir a dissociação dos complexos nucleoprotéicos.

Em seguida realizou-se a extração de RNA, segundo protocolo da ThermoFisher scientific, iniciando-se com a fase de separação Trizol-clorofórmio, onde o clorofórmio foi associado à solução e após a centrifugação a $12,000 \times g$ por 15 min a 4°C , a fase superior aquosa de $\sim 600 \mu\text{l}$ foi adicionada à mesma quantidade de álcool à 70%, sendo essa mistura colocada em uma coluna de purificação (Pure Link[®] RNA Mini Kit) (Thermo Fisher Scientific, núm. cat: 12183018A)(www.lifetechnologies.com)

Durante a purificação de coluna, foi realizado tratamento com enzima DNase, para que todo o DNA fosse degradado e não comprometesse a amostra, através do kit Pure Link[®] DNase for on-column (Thermo Fisher Scientific, núm. cat: 12185010). Ao final dos procedimentos, o RNA foi eluído com 35-40 μl de água RNase free (Pure Link[®] RNA Mini Kit - Thermo Fisher Scientific, núm. cat: 12183018A).

Para avaliar a qualidade do RNA da amostra, 1 μl foi analisado por meio do NanoDrop[™] 2000/2000c espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, modelo: NanoDrop[™] 2000/2000c), sendo considerado adequado, a amostra com valores de razão de absorvância ultravioleta de A260/A280 de 1.8-2.2 e A260/A230 > 2 (Wilfinger et al., 1997).

Para avaliar a integridade do RNA da amostra foi realizada a eletroforese em gel de agarose. Agarose é um polissacarídeo em forma de pó que suspenso em solução aquosa dissolve-se completamente, solidificando-se quando resfria. Na forma líquida foi colocado num molde para adquirir o formato de bloco e feito pequenos furos (poços) em uma das suas extremidades, perpendicularmente ao seu comprimento, com o uso de um “pente”; onde foi colocada a amostra de RNA (Oliveira, 2010). O gel é coberto com uma solução tampão TAE 1x e colocado 8 μl da amostra por poço, em seguida, exposto a 80-150 volts. Após a corrida do gel, procedeu-se a coloração das bandas com brometo de etídeo (Thermo Fisher Scientific Inc, núm. cat: 15585011). Foi considerado RNA de boa qualidade quando se observou razão para o RNA ribossômico (RNAr) 28S/18S de 2:1 (Aranda, Lajoie, Jorcyk, 2012).

Todas as amostras de RNA obtidas, a partir das cócleas, foram normalizadas para uma concentração de 30 ng/ μl por meio de fórmula e função *NORMALIZAR* no Microsoft *Excel*. A partir dessa concentração padrão, foi realizada transcrição reversa para obtenção do cDNA.

4.8.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) – Transcrição reversa

Todas as amostras foram normalizadas para uma concentração final de 30 ng/ μ l de RNA, por meio de planilha do Excel fornecida pela Thermo Fisher Scientific, para realização da transcrição reversa e obtenção do cDNA. Foi utilizado o SuperScript® VILO™ Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc, núm. cat: 11755050) que permite a obtenção do cDNA, em quantidades de RNA até 2,5 μ g numa reação total de 20 μ l. O cDNA final obtido para o teste de silenciamento estava na concentração de 15 ng/ μ l e para o teste ruído/não ruído, 24 ng/ μ l.

4.8.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qRT-PCR).

Após obtenção do cDNA, foi utilizado o ensaio de qRT-PCR com sondas de Taqman® em placa pré-configurada de 96 poços (TaqMan® Array Fast Plates- Thermo Fisher Scientific Inc) com painel de genes da via metabólica do *Tnfa* segundo Tabela 2 para equipamento Step one plus™ (Thermo Fisher Scientific- Waltham, MA USA). A PCR em tempo real quantitativa foi realizada com um programa de ciclagem em duas etapas com início 50°C para ativar a DNA polimerase, a 95°C durante 20 min, seguido de 40 ciclos de amplificação (95°C durante 3 s, 60°C durante 30 min).

Para analisar o grau de silenciamento do gene *Tnfa* e a expressão dos genes da sua via metabólica foi utilizada uma placa por grupo siRNA *Tnfa* e siRNA *scramble* (Thermo Fisher Scientific n. de lote: 1605216-001) numa proporção de 160 μ l de cDNA, 520 μ l de TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, núm. cat: 4444964) e 360 μ l de água destilada ultrapura *DNASE/RNASE-Free* (Thermo Fisher Scientific, núm. cat:10977015) totalizando 1040 μ l e aproximadamente 23 ng em 10 μ l/poço.

Para realizar screening de genes alterados na exposição ao ruído, foi utilizada uma placa por grupo ruído e não ruído na proporção de 145 μ l de cDNA, 540 μ l de TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, núm. cat:4444964) e 395 μ l de água destilada ultrapura *DNASE/RNASE-Free* (Thermo Fisher Scientific, núm. cat:10977015) totalizando 1080 μ l e aproximadamente 32 ng em 10 μ l /poço.

Após preparo das placas, o qRT-PCR foi realizado no modo FAST em equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™ - Thermo Fisher Scientific, núm. cat:4376600).

Tabela 2. Genes da placa metabólica *Tnfa*

Gene	Nome do gene	Gene	Nome do gene
<i>18S*</i>	<i>Eukaryotic 18S Rrna</i>	<i>Map2k4</i>	<i>mitogen activated protein kinase kinase 4</i>
<i>Agfg1</i>	<i>ArfGAP with FG repeats 1</i>	<i>Map3k1</i> <i>LOC100912399</i>	<i>mitogen activated protein kinase kinase kinase 1</i>
<i>Apaf1</i>	<i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>	<i>Map3k14</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14</i>
<i>Arhgdib.</i>	<i>Rho, GDP dissociation inhibitor beta</i>	<i>Map3k7</i> <i>LOC100910771</i>	<i>mitogen activated protein kinase kinase kinase 7</i>
<i>Bag4</i>	<i>BCL2-associated athanogene 4</i>	<i>Tab1</i>	<i>TGF-beta activated kinase 1</i>
<i>Bcl2</i>	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	<i>Mapk8</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 8</i>
<i>Bid</i>	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	<i>Nfkb1</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
<i>Cad</i>	<i>carbamoyl-phosphate synthetase</i>	<i>Nfkbia</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
<i>Casp2</i>	<i>caspase 2</i>	<i>Ngfr</i>	<i>nerve growth factor receptor</i>
<i>Casp3</i>	<i>caspase 3</i>	<i>Ngfrap1</i>	<i>nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1</i>
<i>Casp8</i>	<i>caspase 8</i>	<i>Pak1</i>	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1</i>
<i>Cd27</i>	<i>CD27 molecule</i>	<i>Pak2</i> <i>LOC100910732</i>	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2</i>
<i>Cd40</i>	<i>CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5</i>	<i>Parp1</i>	<i>poly (ADP-ribose) polymerase 1</i>
<i>Cd40lg</i>	<i>CD40 ligand</i>	<i>Pglyrp1</i>	<i>peptidoglycan recognition protein 1</i>
<i>Cd70</i>	<i>Cd70 molecule</i>	<i>Psmg2</i>	<i>proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 2</i>
<i>Cflar</i>	<i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i>	<i>Rb1</i>	<i>retinoblastoma 1</i>
<i>Chuk</i>	<i>conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i>	<i>Relt</i>	<i>RELT tumor necrosis factor receptor</i>

Continua...

Continuação Tabela 2. Genes da placa metabólica *Tnfa*

Gene	Nome do gene	Gene	Nome do gene
<i>Cyts</i> <i>LOC100363502</i>	<i>cytochrome c</i>	<i>Ripk1</i>	<i>receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1</i>
<i>Dffa</i>	<i>DNA fragmentation factor, alpha subunit</i>	<i>Sptan1</i>	<i>spectrin, alpha, non-erythrocytic 1</i>
<i>Dusp1</i>	<i>dual specificity phosphatase 1</i>	<i>Tank</i>	<i>TRAF family member-associated NFKB activator</i>
<i>Fadd</i>	<i>FasTNFRSF6)-associated via death</i>	<i>Tnf</i> <i>LOC103694380</i>	<i>tumor necrosis factor</i>
<i>Faf1</i>	<i>Fas (TNFRSF6) associated factor 1</i>	<i>Tnfrsf 10b</i>	<i>TNF receptor superfamily, member 10b</i>
<i>Faz</i>	<i>Fas cell surface death receptor</i>	<i>Tnfrsf 11b</i>	<i>TNF receptor superfamily, member 11b</i>
<i>Faslg</i>	<i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</i>	<i>Tnfrsf 12 a</i>	<i>TNF receptor superfamily, member 12 a</i>
<i>Fbf1</i>	<i>Fas (TNFRSF6) binding factor 1</i>	<i>Tnfrsf14</i>	<i>TNF receptor superfamily, member 14</i>
<i>Ikkkap</i>	<i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein</i>	<i>Tnfrsf17</i>	<i>TNF receptor superfamily, member 17</i>
<i>Ikkkb</i>	<i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta</i>	<i>Tnfrsf1 a</i>	<i>TNF receptor superfamily, member 1 a</i>
<i>Ikkbg</i>	<i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma</i>	<i>Tnfrsf1b</i>	<i>TNF receptor superfamily, member 1b</i>
<i>Jun</i>	<i>jun proto-oncogene</i>	<i>Tnfrsf21</i>	<i>TNF receptor superfamily, member 21</i>
<i>Lmna</i>	<i>lamin A/C</i>	<i>Tnfrsf25</i>	<i>TNF receptor superfamily, member 25</i>
<i>Lmnb1</i>	<i>lamin B1</i>	<i>Tnfrsf 4</i>	<i>TNF receptor superfamily, member 4</i>
<i>Lta</i>	<i>lymphotoxin alpha</i>	<i>Tnfrsf 8</i>	<i>TNF receptor superfamily, member 8</i>
<i>Ltb</i> <i>LOC103694381</i>	<i>lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3);lymphotoxin-beta</i>	<i>Tnfrsf 9</i>	<i>TNF receptor superfamily, member 9</i>
<i>Ltbr</i>	<i>lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)</i>	<i>Tnfsf 10</i>	<i>TNF (ligand) superfamily, member 10</i>

Continua...

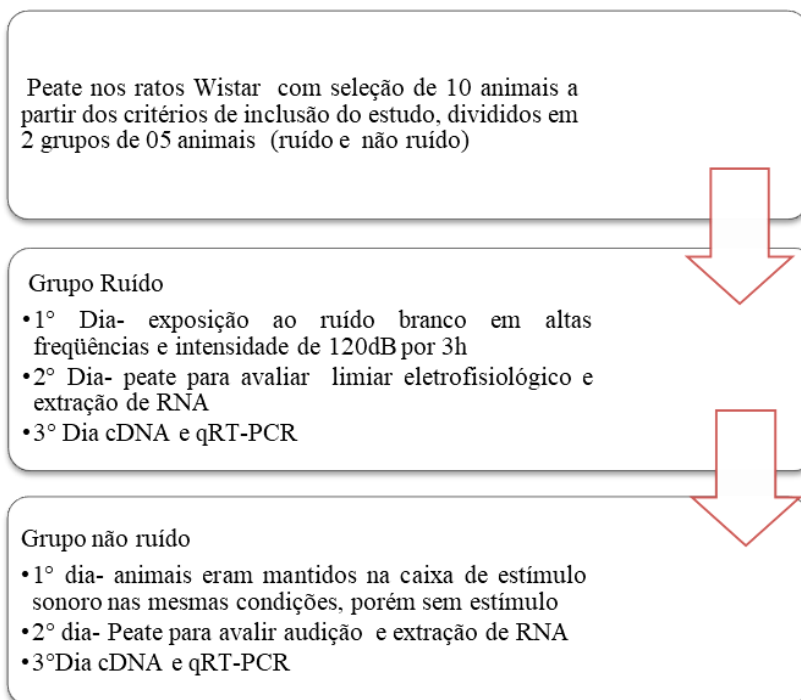
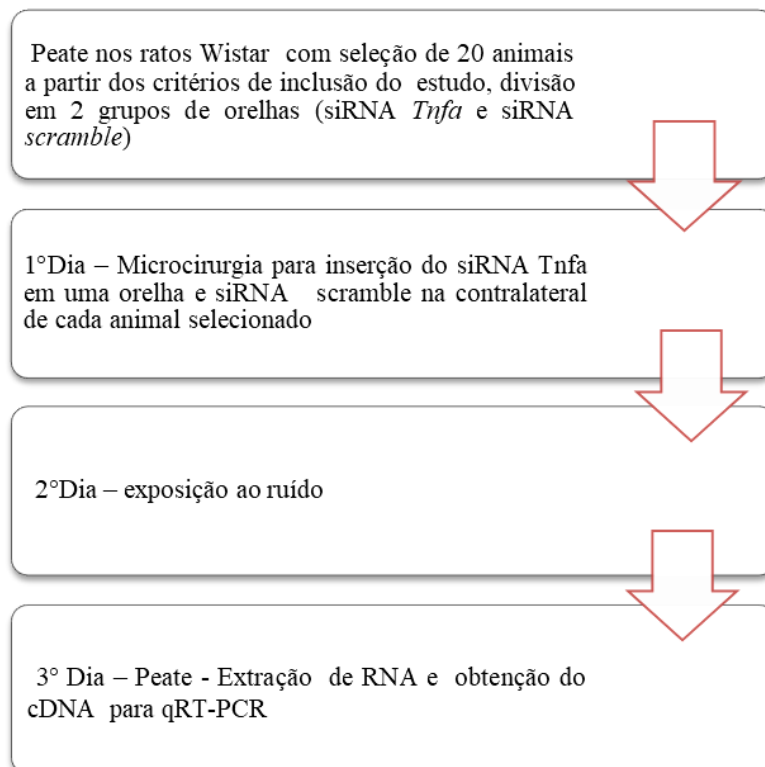
Conclusão Tabela 2. Genes da placa metabólica *Tnfa*

Gene	Nome do gene	Gene	Nome do gene
<i>Madd</i>	<i>MAP-kinase activating death domain</i>	<i>Map2k4</i>	<i>mitogen activated protein kinase kinase 4</i>
<i>Tnfsf 11</i> <i>LOC103689974</i>	<i>TNF (ligand) superfamily, member 11</i>	<i>Tradd</i>	<i>TNFRSF1A-associated via death domain</i>
<i>Tnfsf 12</i>	<i>TNF ligand superfamily member 12</i>	<i>Traf2</i>	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
<i>Tnfsf 13</i>	<i>TNF (ligand) superfamily, member 13</i>	<i>Traf3</i>	<i>TNF receptor-associated factor 3</i>
<i>Tnfsf 14</i>	<i>TNF (ligand) superfamily, member 14</i>	<i>Traf4</i>	<i>TNF receptor associated factor 4</i>
<i>Tnfsf 15</i>	<i>TNF (ligand) superfamily, member 15</i>	<i>Traf6</i>	<i>TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase</i>
<i>Tnfsf 18</i>	<i>TNF (ligand) superfamily, member 18</i>	<i>Traf7</i>	<i>TNF receptor-associated factor 7, E3 ubiquitin protein ligase</i>
<i>Tnfsf4</i>	<i>TNF (ligand) superfamily, member 4</i>	<i>Gapdh**</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
<i>Tnfsf9</i>	<i>TNF (ligand) superfamily, member 9</i>	<i>Hprt1*</i>	<i>hypoxanthinephosphoribosyltransferase 1</i>
<i>Gusb*</i>	<i>glucuronidase, beta</i>	<i>Rplp0</i>	<i>ribosomal protein, large, P0</i>
<i>Actb*</i>	<i>actin, beta</i>	<i>Pgk1</i>	<i>phosphoglycerate kinase 1</i>
<i>B2m</i>	<i>beta-2 microglobulin</i>	<i>Rplp2</i>	<i>ribosomal protein, large P2</i>
<i>Hmbs**</i>	<i>hydroxymethylbilane synthase</i>	<i>Tbp*</i>	<i>TATA box binding protein</i>
<i>Tfrc</i>	<i>transferrin receptor</i>	<i>Ywhaz*</i>	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta</i>
<i>Ubc</i>	<i>ubiquitin C</i>		

.*Genes constitutivos ** genes referência para a normalização dos dados (siRNATnfa/"scramble") /****genes referência para normalização dos dados (ruído/não ruído)

4.9 Fluxogramas do Estudo

O estudo foi realizado através de etapas apresentadas nos fluxogramas I e II, de acordo com o tempo necessário para desenvolver uma perda auditiva permanente e para que o silenciamento ocorresse de forma satisfatória a nível celular.

FLUXOGRAMA 1. Representação das etapas realizadas no experimento de indução de perda auditiva pelo ruído**FLUXOGRAMA 2. Representação das etapas realizadas no experimento de silenciamento gênico**

4.10 Análise dos Dados

4.10.1 qRT-PCR

Para o cálculo da expressão gênica relativa (Rq), utilizou-se o método do $\Delta\Delta\text{CT}$ comparativo (Livak e Schmittgen, 2001). Por este método a quantificação relativa (Rq) é calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ que corresponde a quantas vezes, a mais ou a menos, o gene alvo foi expresso, comparando-se a amostra teste em relação à amostra controle (Livak e Schmittgen, 2001).

Ct (“Cycle threshold”) corresponde ao número de ciclos necessários para detectar amplificação de cDNA acima do ruído, ΔCt a diferença entre o gene alvo e o gene constitutivo (“house keeping”) em cada amostra (teste e controle) e $\Delta\Delta\text{Ct}$, a diferença entre o ΔCt das amostras (teste e controle).

Inicialmente, o nível de expressão de um dado gene foi normalizado para o nível médio dos genes de referência (*Gadph*, *Hmbs*, *Actb*, *18S*) a fim de gerar um valor ΔCt . A normalização remove o viés técnico para detectar as diferenças biológicas. O valor $\Delta\Delta\text{Ct}$ foi então calculado com a seguinte fórmula: ΔCt (grupo experimental/ siRNA *Tnfa* ou ruído) - ΔCt (grupo de controle/siRNA *scramble* ou não ruído) e depois realizado o cálculo $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

Nas duas condições analisadas (exposição ao ruído com e sem silenciamento), os valores de $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ abaixo de 1 foram indicativos de diminuição da expressão gênica e acima de 1, de aumento da expressão gênica. Esta mudança de expressão gênica é denominada “fold-change”. Para determinar o “fold change” nos valores abaixo de 1, utilizou-se a fórmula $-1/\text{valor de Rq}$ (Livak e Schmittgen, 2001, Schmittgen e Livak, 2008). O “fold change” foi então considerado biologicamente significativo quando maior ou igual (\geq) 1,5 para aumento de expressão ou menor ou igual (\leq) -1,5 para diminuição da expressão (Stankovic e Corfas, 2003; Yang et al., 2004).

Os dados foram também analisados através da metodologia descrita por Pfaffl (2001), onde a alteração da expressão gênica foi calculada como a média entre a amostra teste em relação à amostra controle, após a normalização. A expressão da amostra controle foi considerada 100%, desta forma o aumento ou diminuição em 50% a partir deste valor foi considerado importante.

Para mensurar a porcentagem de silenciamento ou knockdown induzido pelo siRNA *Tnfa in vivo*, utilizou-se a seguinte fórmula: $1 - 2^{-\Delta\Delta CT} \times 100$ (<https://www.thermofisher.com.br>).

4.10.2 Peate clique

Os dados foram armazenados no software BioSigRZ System III (Tucker–Davis Technologies, Alachua, FL, EUA) para análise “off-line”. Esta foi realizada manualmente identificando 5 ondas (I,II,III.....) e marcando os picos (P1,P2,P3....). Após concluída a análise, os dados foram exportados para uma planilha Excel, a fim de realizar a avaliação estatística.

Foi descrita amplitude e latência nas diferentes intensidades avaliadas nas orelhas dos animais normais, com uso de médias e desvios padrões e criados os limites de normalidade com 95% de normalidade para cada parâmetro, sendo ilustrados os resultados com Gráficos de linha e seus respectivos limites de normalidade (Kirkwood e Sterne, 2006).

Em relação ao efeito do silenciamento gênico sobre o exame eletrofisiológico, os parâmetros avaliados foram descritos segundo os tipos de tratamento dos animais do estudo com uso de médias e desvios padrões e comparados os valores utilizando-se o teste t-Student pareado (Kirkwood e Sterne, 2006), assim como o limiar de audição entre os lados.

Para análise dos dados foi utilizado o “software” IBM-SPSS para Windows versão 20.0 e para tabulação, o “software” Microsoft Excel 2003, empregando-se o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise dos parâmetros do Peate clique previamente ao procedimento cirúrgico

Uma vez que os dados na literatura, em relação aos parâmetros do Peate clique em ratos são escassos, realizamos a padronização, previamente ao experimento, com 30 animais, permitindo a análise em 60 orelhas.

O limiar médio de audição dos animais foi de 42,5 dB SPL (DP = 4,7 dB SPL), IN (95%): 33,2 dB SPL a 51,8 dB SPL.

A Tabela 3 mostra a média e desvio padrão da amplitude e latência das ondas e intervalos interpicos I-IV e I-V nas intensidades de 90 a 40 dB SPL.

Tabela 3. Descrição da amplitude e latência nos ratos sem intervenção

Variável	Intensidade					
	40dB (N = 44)	50dB (N = 60)	60dB (N = 60)	70dB (N = 60)	80dB (N = 60)	90dB (N = 60)
Latência						
Onda I	1,4 ± 0,22	1,36 ± 0,15	1,25 ± 0,12	1,2 ± 0,09	1,16 ± 0,09	1,13 ± 0,1
Onda II	2,3 ± 0,22	2,19 ± 0,18	2,07 ± 0,14	2,02 ± 0,16	1,99 ± 0,14	1,97 ± 0,15
Onda III	3,38 ± 0,2	3,2 ± 0,24	3,05 ± 0,13	3 ± 0,17	3 ± 0,19	3,02 ± 0,18
Onda IV	4,09 ± 0,23	3,99 ± 0,23	3,88 ± 0,18	3,8 ± 0,22	3,78 ± 0,16	3,76 ± 0,15
Onda V	5,16 ± 0,15	5,11 ± 0,33	5,09 ± 0,1	5,06 ± 0,13	5,04 ± 0,17	5,02 ± 0,17
Intervalo I-IV	2,68 ± 0,23	2,67 ± 0,37	2,62 ± 0,11	2,67 ± 0,27	2,61 ± 0,12	2,64 ± 0,1
Intervalo I-V	3,74 ± 0,29	3,77 ± 0,21	3,84 ± 0,13	3,85 ± 0,26	3,87 ± 0,15	3,89 ± 0,16
Amplitude						
Onda I	0,11 ± 0,16	0,21 ± 0,2	0,35 ± 0,25	0,51 ± 0,54	0,49 ± 0,38	0,52 ± 0,39
Onda II	0,43 ± 0,21	0,74 ± 0,31	1,16 ± 0,43	1,28 ± 0,68	1,4 ± 0,89	1,57 ± 0,94
Onda III	0,22 ± 0,29	0,45 ± 0,31	0,55 ± 0,38	0,64 ± 0,36	0,61 ± 0,5	0,58 ± 0,6
Onda IV	0,56 ± 0,21	0,88 ± 0,35	1,39 ± 0,43	1,79 ± 0,48	2,11 ± 0,5	2,04 ± 0,52
Onda V	-0,19 ± 0,23	-0,27 ± 0,31	-0,35 ± 0,34	-0,41 ± 0,49	-0,52 ± 0,46	-0,54 ± 0,49
Intervalo I-IV	0,44 ± 0,21	0,7 ± 0,39	1,03 ± 0,45	1,37 ± 0,52	1,64 ± 0,57	1,49 ± 0,61
Intervalo I-V	-0,33 ± 0,29	-0,43 ± 0,42	-0,69 ± 0,54	-0,91 ± 0,63	-0,95 ± 0,95	-1,08 ± 0,74

Dados expressos como média ± DP

As figuras 12 e 13 demonstram respectivamente os valores médios de latência das ondas e dos intervalos interpicos I-IV e I-V em relação à intensidade com o intervalo de normalidade de 95%; e as figuras 14 e 15, os valores médios de amplitude em relação à intensidade com seu respectivo intervalo de normalidade de 95%.

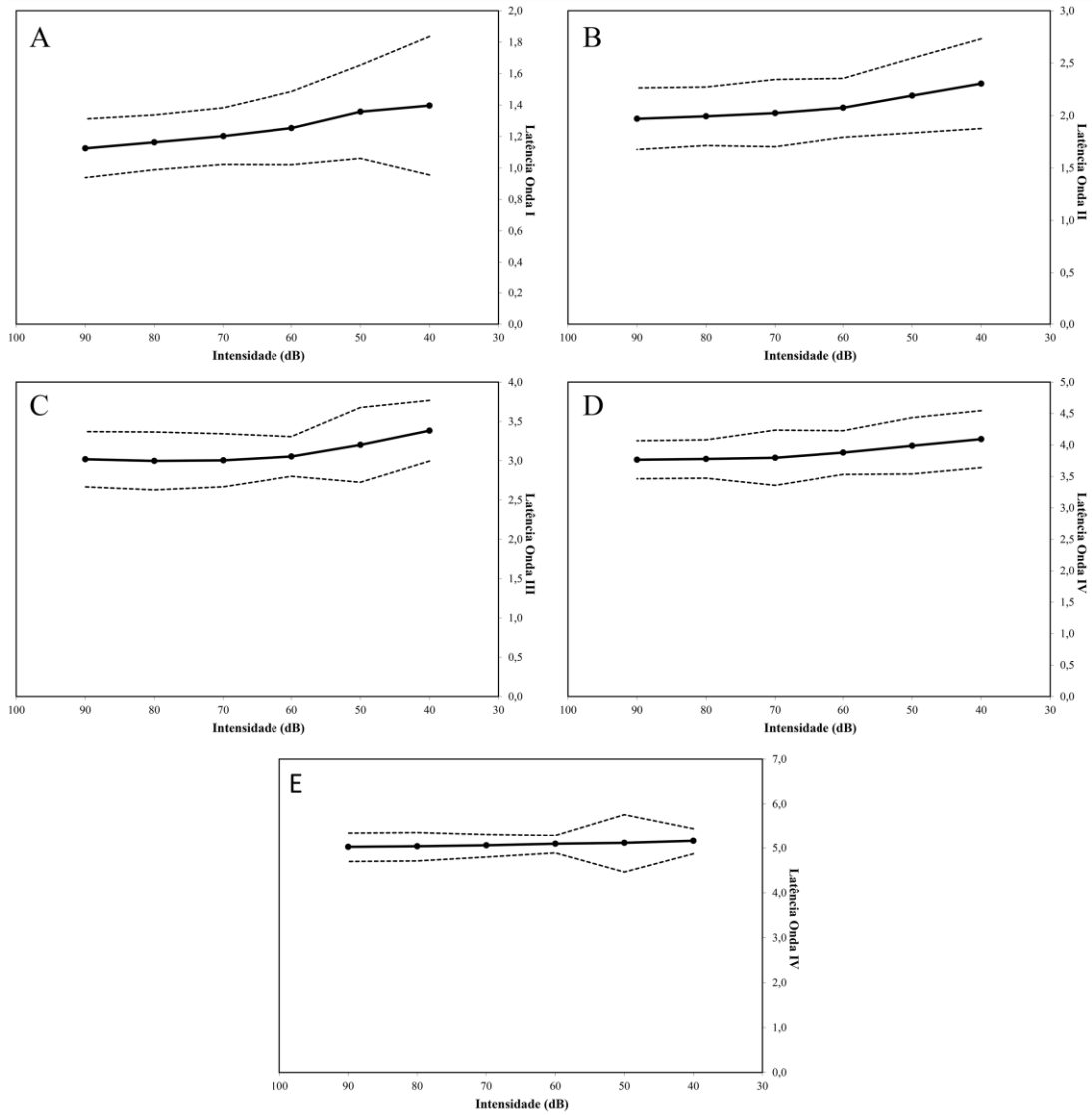


Figura 12. Valores médios de latência das ondas com intervalo de normalidade de 95%

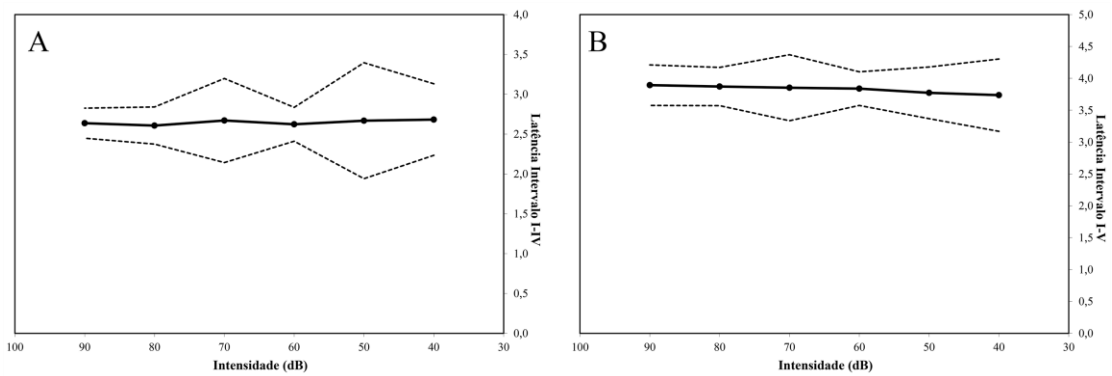


Figura 13. Valores médios de latência dos Intervalos interpico I-IV e I-V com intervalo de normalidade de 95%

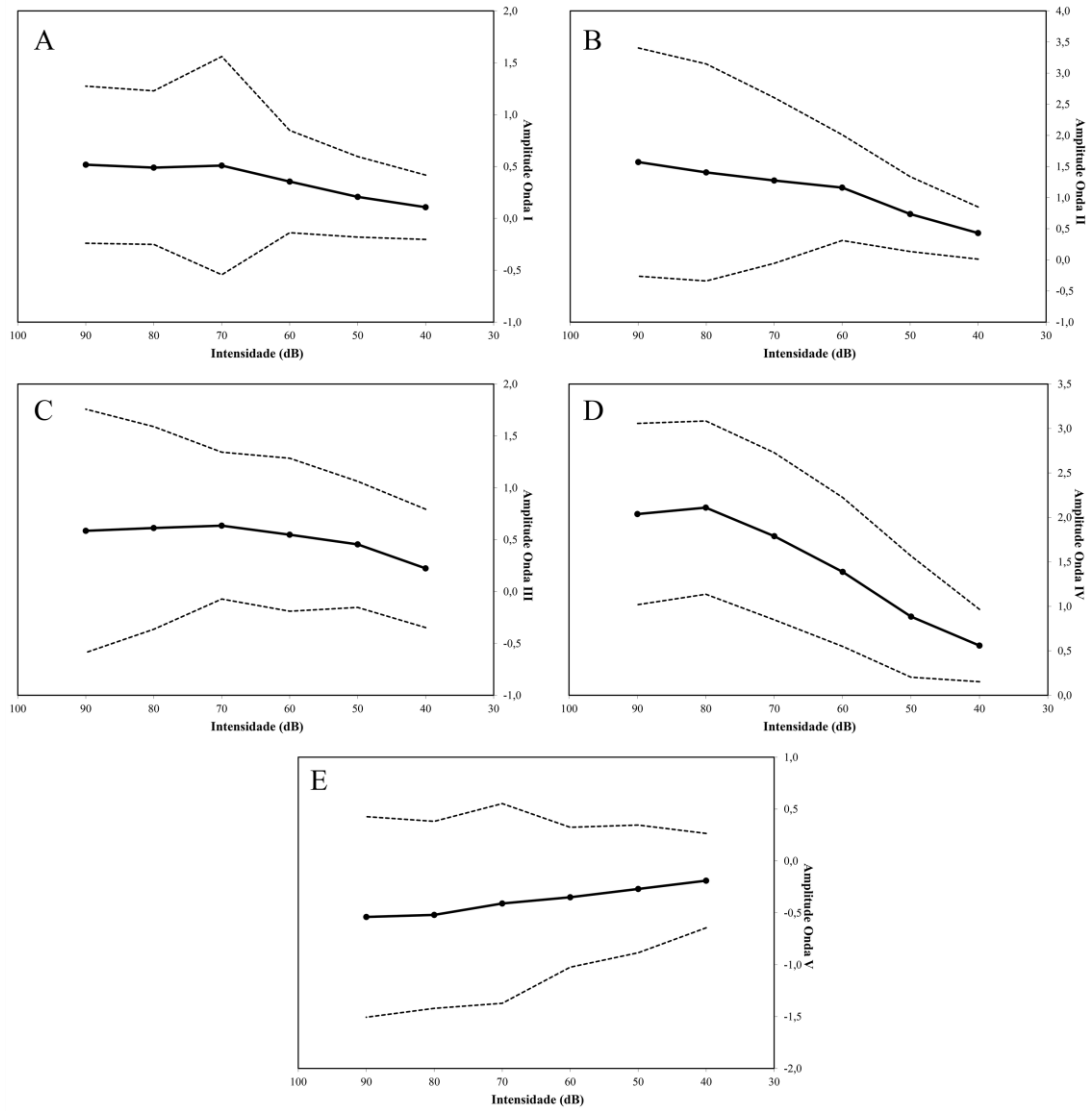


Figura 14. Valores médios de amplitude das ondas com intervalo de normalidade de 95%

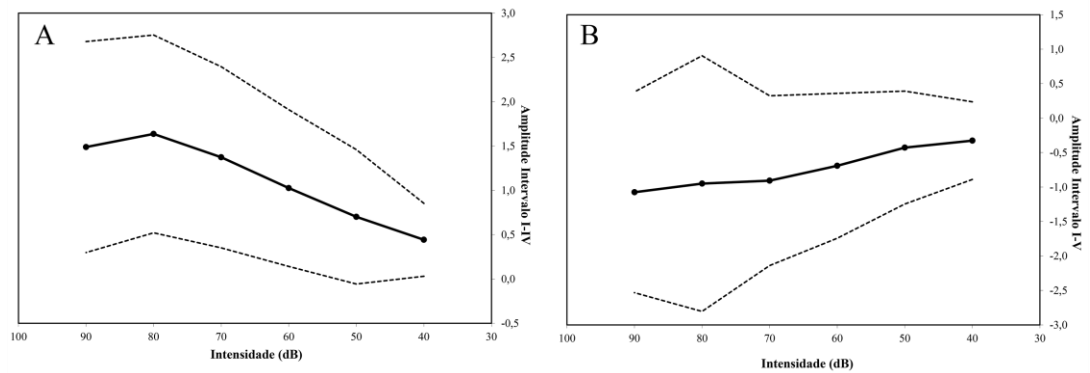


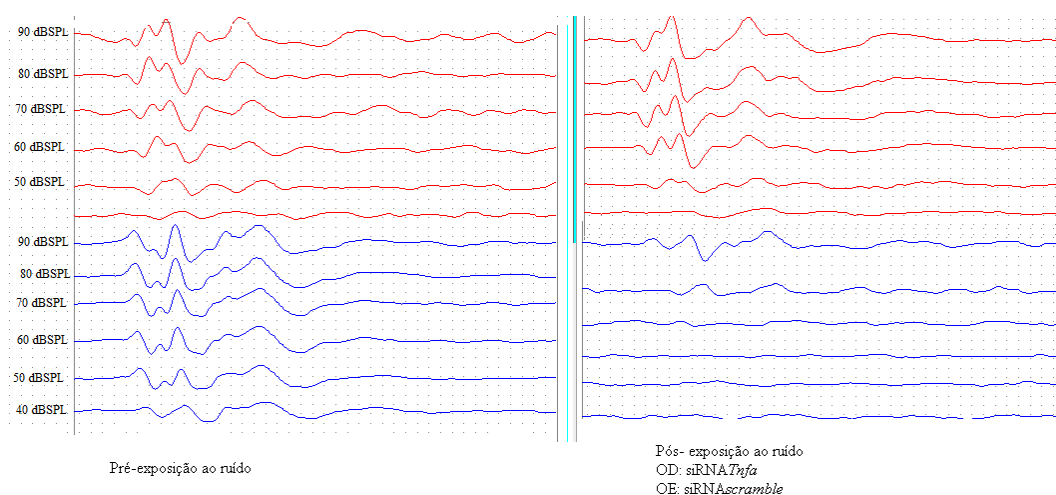
Figura 15. Valores médios de amplitude dos Intervalos interpico I-IV e I-V com intervalo de normalidade de 95%

5.2 Análise dos parâmetros do Peate clique após silenciamento gênico do *Tnfa*

Foi realizado o Peate clique após a introdução monoaural do siRNA *Tnfa* e siRNA *scramble* na orelha contralateral, com posterior exposição ao ruído branco de altas frequências por três horas.

Na Figura 16, observa-se o exemplo do Peate clique de dois animais (ratos A e B) antes e após a microcirurgia e exposição ao ruído. As orelhas que receberam siRNA *Tnfa* apresentaram preservação do limiar eletrofisiológico, enquanto as orelhas que receberam o siRNA *scramble*, perda auditiva significativa.

Rato A



Rato B

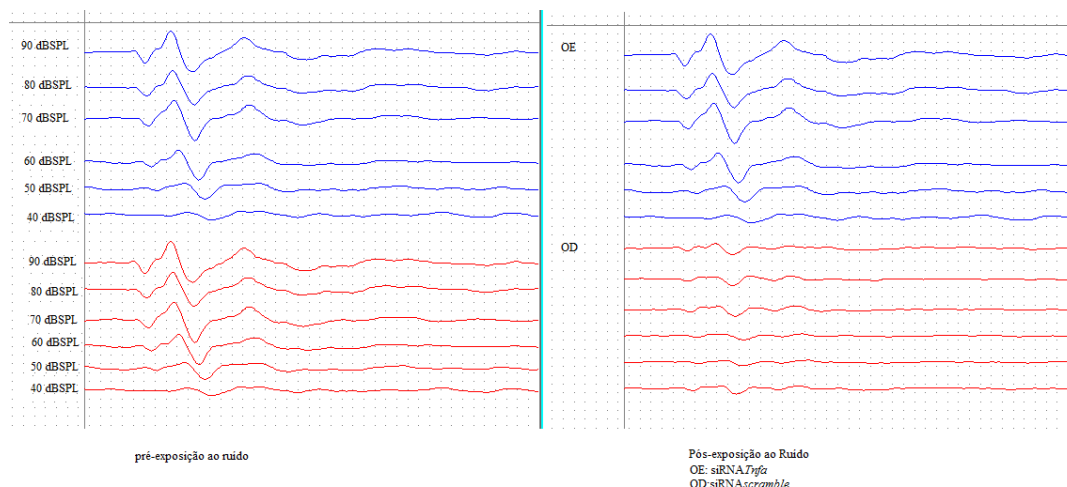


Figura 16. Exemplo de Peate clique nos ratos (A e B) antes e após silenciamento e ruído

A Tabela 4 indica que o limiar eletrofisiológico da orelha silenciada foi significativamente menor que a orelha *scramble* refletindo de forma indireta a preservação das células auditivas após exposição ao ruído.

Tabela 4. Limiar eletrofisiológico das orelhas siRNA *Tnfa* e siRNA “*scramble*”

Variável	siRNA <i>scramble</i>	siRNA <i>Tnfa</i>	P
	média ± DP	média ± DP	
Limiar de audição (dB)	81 ± 11,2	49,5 ± 10,5	<0,001

Teste t-Student pareado

A Tabela 5 expõe que nas intensidades audíveis por ambos os lados, não houve diferença significativa entre as orelhas para as medidas de latência ($p > 0,05$). Todavia na Tabela 6, em 80 dBSPL, a amplitude média da onda I e, em 90 dBSPL, a amplitude média das ondas II e IV foram estatisticamente maiores no lado tratado ativamente.

Tabela 5. Descrição das latências nas diferentes intensidades avaliadas no lado siRNA *Tnfa* e no lado siRNA *scramble* e resultado das comparações

Variável/Intensidade	siRNA <i>scramble</i>	siRNA <i>Tnfa</i>	P
	média ± DP	média ± DP	
40dB	(N = 0)	(N = 8)	
Onda I		1,43 ± 0,16	
Onda II		2,27 ± 0,14	
Onda III		3,27 ± 0,11	
Onda IV		3,9 ± 0,17	
Onda V		5,16 ± 0,2	
Intervalo I-IV		2,47 ± 0,24	
Intervalo I-V		3,73 ± 0,25	
50dB	(N = 1)	(N = 15)	
Onda I	1,48 ± 0	1,38 ± 0,2	
Onda II	2,34 ± 0	2,19 ± 0,17	
Onda III	3,21 ± 0	3,19 ± 0,19	
Onda IV	3,87 ± 0	3,85 ± 0,25	
Onda V	5,1 ± 0	5,12 ± 0,2	
Intervalo I-IV	2,39 ± 0	2,47 ± 0,24	
Intervalo I-V	3,62 ± 0	3,74 ± 0,25	
60dB	(N = 1)	(N = 19)	
Onda I	1,36 ± 0	1,35 ± 0,18	
Onda II	2,14 ± 0	2,18 ± 0,22	
Onda III	3 ± 0	3,02 ± 0,38	
Onda IV	3,66 ± 0	3,83 ± 0,31	
Onda V	5,14 ± 0	5,04 ± 0,19	
Intervalo I-IV	2,3 ± 0	2,48 ± 0,29	
Intervalo I-V	3,78 ± 0	3,69 ± 0,27	
70dB	(N = 6)	(N = 19)	
Onda I	1,23 ± 0,16	1,3 ± 0,2	0,573
Onda II	2,19 ± 0,19	2,09 ± 0,19	0,166
Onda III	3,06 ± 0,22	2,97 ± 0,25	0,509
Onda IV	3,73 ± 0,2	3,71 ± 0,24	0,304
Onda V	5,06 ± 0,33	5,01 ± 0,22	0,741
Intervalo I-IV	2,5 ± 0,28	2,41 ± 0,11	0,280
Intervalo I-V	3,83 ± 0,35	3,71 ± 0,26	0,896
80dB	(N = 10)	(N = 20)	
Onda I	1,21 ± 0,17	1,3 ± 0,48	0,310
Onda II	2,02 ± 0,12	2,01 ± 0,16	0,953
Onda III	3,04 ± 0,26	2,88 ± 0,24	0,445
Onda IV	3,66 ± 0,13	3,62 ± 0,19	0,403
Onda V	5,09 ± 0,21	4,98 ± 0,26	0,676
Intervalo I-IV	2,45 ± 0,22	2,44 ± 0,12	0,463
Intervalo I-V	3,88 ± 0,27	3,79 ± 0,25	0,621
90dB	(N = 20)	(N = 20)	
Onda I	1,24 ± 0,21	1,15 ± 0,13	0,108
Onda II	2,04 ± 0,2	1,97 ± 0,14	0,224
Onda III	2,9 ± 0,17	2,85 ± 0,26	0,457
Onda IV	3,62 ± 0,16	3,6 ± 0,22	0,777
Onda V	4,99 ± 0,2	4,95 ± 0,3	0,595
Intervalo I-IV	2,37 ± 0,18	2,45 ± 0,18	0,104
Intervalo I-V	3,74 ± 0,25	3,8 ± 0,28	0,459

Teste t-Student pareado

Tabela 6. Descrição das amplitudes nas diferentes intensidades avaliadas no lado siRNA *Tnfa* e no lado siRNA *scramble* e resultado das comparações

Variável/Intensidade	siRNA <i>scramble</i>	siRNA <i>Tnfa</i>	P
	média ± DP	média ± DP	
40dB	(N = 0)	(N = 8)	
Onda I		0,06 ± 0,07	
Onda II		0,3 ± 0,21	
Onda III		0,15 ± 0,15	
Onda IV		0,45 ± 0,16	
Onda V		0,05 ± 0,24	
Intervalo I-IV		0,39 ± 0,11	
Intervalo I-V		-0,01 ± 0,3	
50dB	(N = 1)	(N = 15)	
Onda I	0,14 ± 0	0,12 ± 0,13	
Onda II	0,33 ± 0	0,51 ± 0,26	
Onda III	0,23 ± 0	0,18 ± 0,18	
Onda IV	0,56 ± 0	0,55 ± 0,25	
Onda V	-0,1 ± 0	-0,1 ± 0,17	
Intervalo I-IV	0,41 ± 0	0,44 ± 0,22	
Intervalo I-V	-0,25 ± 0	-0,21 ± 0,23	
60dB	(N = 1)	(N = 19)	
Onda I	0,12 ± 0	0,2 ± 0,29	
Onda II	0,89 ± 0	0,95 ± 0,52	
Onda III	0,26 ± 0	0,31 ± 0,24	
Onda IV	0,89 ± 0	0,86 ± 0,43	
Onda V	-0,29 ± 0	-0,13 ± 0,19	
Intervalo I-IV	0,77 ± 0	0,66 ± 0,37	
Intervalo I-V	-0,41 ± 0	-0,33 ± 0,32	
70dB	(N = 6)	(N = 19)	
Onda I	0,14 ± 0,23	0,34 ± 0,34	0,224
Onda II	0,7 ± 0,5	1,35 ± 0,69	0,137
Onda III	0,35 ± 0,21	0,43 ± 0,32	0,380
Onda IV	0,97 ± 0,2	1,12 ± 0,51	0,494
Onda V	-0,16 ± 0,1	-0,2 ± 0,22	0,362
Intervalo I-IV	0,86 ± 0,14	0,77 ± 0,42	0,222
Intervalo I-V	-0,29 ± 0,27	-0,38 ± 0,56	0,242
80dB	(N = 10)	(N = 20)	
Onda I	0,21 ± 0,29	0,42 ± 0,38	0,040
Onda II	1,04 ± 1,05	1,76 ± 0,81	0,161
Onda III	0,3 ± 0,36	0,36 ± 0,49	0,128
Onda IV	1,13 ± 0,5	1,42 ± 0,53	0,074
Onda V	-0,18 ± 0,24	-0,21 ± 0,36	0,680
Intervalo I-IV	0,92 ± 0,52	1,04 ± 0,57	0,479
Intervalo I-V	-0,38 ± 0,39	-0,59 ± 0,49	0,053
90dB	(N = 20)	(N = 20)	
Onda I	0,48 ± 0,32	0,54 ± 0,42	0,521
Onda II	1,11 ± 0,63	1,84 ± 0,73	0,004
Onda III	0,18 ± 0,39	0,43 ± 0,65	0,109
Onda IV	1,22 ± 0,55	1,63 ± 0,58	0,045
Onda V	-0,31 ± 0,39	-0,41 ± 0,55	0,476
Intervalo I-IV	0,78 ± 0,46	1,06 ± 0,76	0,206
Intervalo I-V	-0,71 ± 0,64	-0,96 ± 0,79	0,235

Teste t-Student pareado

5.3 Análise da qualidade do RNA extraído

A qualidade do RNA de todas as amostras foi analisada por meio do NanoDrop™ 2000/2000c Espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, modelo: NanoDrop™ 2000/2000c) com valores de razão de absorvância ultravioleta de A260/A280 de 1.8 à 2.2 e A260/A230 > 2. As amostras foram normalizadas para uma concentração final de 30ng/μl, para realização da transcrição reversa e obtenção do cDNA (Tabela 7).

Tabela 7. Concentração da amostra, razão de absorvância ultravioleta A260/A280 e A260/A230 e Normalização para 30 ng/μl

Amostra / data da extração	Concentração da amostra ng/μl	A260/280	A230/280	FD	Água (μl)	RNA (μl)	Concentração fina ng/μl	Volume final μl
siTnf *01/06/17	93.00	2.02	1.43	3.10	21.00	10.00	30	93
SiTnf *02/06/17	32.20	2.03	1.44	1.07	0.73	10.00	30	32,19
SiTnf *06/06/17	101.60	2.02	1.58	3.39	23.87	10.00	30	101,61
SiTnf *09/06/17	68.50	2.09	1.90	2.28	12.83	10.00	30	68,49
<i>scramble</i> *01/06/17	34.20	2.00	0.67	1.14	1.40	10.00	30	34,2
<i>Scramble</i> *02/06/17	47.90	2.06	0.48	1.60	5.97	10.00	30	47,91
<i>scramble</i> *06/06/17	66.60	2.06	0.76	2.22	12.20	10.00	30	66,6
<i>Scramble</i> *09/06/17	118.80	2.03	0.83	3.96	29.60	10.00	30	118,8
**Ruído	261.20	2.06	1.98	8.71	77.07	10.00	30	348,28
**Não Ruído	307.00	2.05	1.85	10.23	92.33	10.00	30	409,32

*O RNA eluído em 30 μl ** RNA eluído em 40 μl, FD: Fator de diluição

A integridade do RNA das amostras foi satisfatória para realização dos experimentos seguintes, com base na análise da eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 24). Nesse gel, a amostra de RNA total foi corada com brometo de etídio

analisando-se a relação entre o padrão de peso molecular do RNA ribossômico (RNAr) 28S e 18S que em mamíferos é de aproximadamente 2,7: 1; porém um índice de 2:1 é considerado o padrão para o RNA intacto.

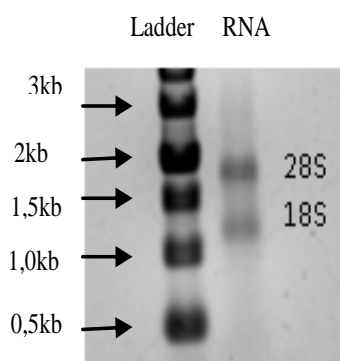


Figura 17. Electroforese em gel de agarose

5.4 Silenciamento Gênico do *Tnfa*

Houve diminuição da expressão do *Tnfa* em 26,31%, com Rq de 0,259. Como o valor foi abaixo de um, utilizou-se a fórmula $-1/\text{valor de Rq}$, o que correspondeu ao “fold-change” de -3,856 (Tabela4). Esse valor é interpretado como uma redução na expressão do RNAm em 3,85 vezes.

A taxa de silenciamento ou “knockdown” foi igual à 74,1%, pela fórmula:
 $1 - 2^{-\Delta\Delta CT} \times 100$, isto é $(1 - 0,259 \times 100)$.

5.5 Análise da Expressão Gênica na exposição ao ruído com e sem silenciamento gênico

A Tabela 8 demonstra diminuição da expressão de genes envolvidos na apoptose como *caspase 8* e receptores da família do TNF α com DD e a Tabela 9, aumento expressivo do *Pak1*, em oito vezes e dos genes *Traf2* e *Tnfrsf17* em duas vezes, relacionados à sobrevivência celular.

Tabela 8. Relação de genes cuja expressão diminuiu após silenciamento do *Tnfa*. Valores de Rq ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) e da percentagem média da amostra siRNA *Tnfa* calibrada com a amostra siRNA *scramble* e normalizada com os genes *Gadph*, *Hmbs*, *Actb*, *18S*. Considerado diminuição Rq $\leq -1,5$

Genes com expressão diminuída	Valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ $-1/2^{\Delta\Delta Ct}$	Percentagem média siRNA <i>Tnfa</i> em relação ao <i>scramble</i> %
<i>Arhgbid</i>	-1,65	61,36
<i>B2m</i>	-2,4	41,57
<i>Bcl2</i>	-1,73	58,62
<i>Bid</i>	-1,5	64,55
<i>Casp8</i>	-1,64	61,79
<i>Cd27</i>	-4,18	24,24
<i>Cd40</i>	-2,61	38,78
<i>Cd40lg</i>	-7,63	13,26
<i>Faz</i>	-2,6	37,80
<i>Lta</i>	-2,5	39,93
<i>Ltb</i>	-1,96	51,74
<i>Nfkbia</i>	-2,5	40,32
<u><i>Tnfa</i></u>	<u>-3,8</u>	<u>26,31</u>
<i>Tnfrsf1a</i>	-1,52	66,64
<i>Tnfrsf1b</i>	-5,18	19,57
<i>TnfrsF4</i>	-2,84	35,61
<i>Tnfrsf8</i>	-4,06	24,90
<i>Tnfrsf9</i>	-1,50	68,18
<i>Tnfrsf12a</i>	-1,56	64,73
<i>Tnfrsf14</i>	-4,83	20,96
<i>Tnfsf9</i>	-2,36	42,88
<i>Tnfsf11</i>	-2,11	47,91
<i>Tnfsf12</i>	-2,88	35,22
<i>Tnfsf 13</i>	-2,57	39,38
<i>Tnfsf 14</i>	-3,54	28,59
<i>Tnfsf 18</i>	-1,81	55,84

Tabela 9. Relação de genes cuja expressão aumentou após silenciamento do *Tnfa*. Valores de Rq ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) e da percentagem média da amostra siRNA *Tnfa* calibrada com a amostra siRNA *scramble* e normalizada com os genes *Gadph*, *Hmbs*, *Actb*, *18S*. Considerado aumento Rq $\geq 1,5$

Genes com expressão aumentada	Valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Percentagem média siRNA em relação ao <i>scramble</i> %
<i>Fadd</i>	1,65	167,30
<i>Fbfl</i>	1,617	163,97
<u><i>Pak1</i></u>	<u>8,640</u>	<u>876,31</u>
<i>Tnfrsf17</i>	2,091	212,06
<u><i>Traf2</i></u>	2,293	232,53

Nos ratos submetidos ao ruído, sem intervenção cirúrgica, o qRT-PCR na placa de *Taqman*® arrays demonstrou aumento na expressão do gene *Tnfa* com “fold-change” de 2,065 e dos genes da via da MAPK (*Map3k1* e *Map3k7*) com um “fold-change” acima de 4 (Tabela 10) e diminuição expressiva dos genes *Map3k14*, *Nfkbia*, *Tnfrsf17*, envolvidos na sobrevivência celular (Tabela 11).

Tabela 10. Relação de genes cuja expressão aumentou após exposição ao ruído. Valores de Rq ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) e da percentagem média da amostra ruído calibrada com a amostra não ruído e normalizada com os genes *Gadph*, *Hmbs*, *Actb*, 18S. Considerado aumento da expressão $Rq \geq 1,5$

Genes com expressão aumentada	Valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Percentagem média Ruído em relação ao não ruído %
<i>Map3k1</i>	4,52	449,9
<i>Map3k7</i>	4,847	482,52
<i>Tnf</i>	2,065	205,57

Tabela 11. Relação de genes cuja expressão diminuiu após exposição ao ruído. Valores de Rq ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) e da percentagem média da amostra ruído calibrada com a amostra não ruído e normalizada com os genes *Gadph*, *Hmbs*, *Actb*, 18S. Considerado diminuição da expressão $Rq \leq -1,5$

Genes com expressão diminuída	Valor de $2^{\Delta\Delta Ct} / -1/2^{\Delta\Delta Ct}$	Percentagem média Ruído em relação ao não ruído %
<i>Map3k14</i>	-5,02	19,81
<i>Nfkbia</i>	-2,59	38,28
<i>Tnfrsf17</i>	-5,02	19,79
<i>Tnfsf10</i>	-1,90	52,4
<i>Tradd</i>	-1,53	64,87
<i>Bcl2</i>	-1,64	60,4

Na Tabela 12 observa-se o perfil da expressão de genes na via metabólica do *Tnfa* agrupados nas respectivas famílias, comparando o “fold-change” na exposição ao ruído com e sem silenciamento gênico. O gene *Bid* - que transcreve a proteína BID - que interliga as vias extrínseca e intrínseca da apoptose apresentou diminuição da expressão no silenciamento, com aumento na exposição ao ruído. Os genes da família dos receptores do TNFR apresentaram alteração em relação ao silenciamento, com diminuição de *Tnfrsf 1A*, *Tnfrsf 1B*, *Tnfrsf 4*, *Tnfrsf 8* e aumento do *Tnfrsf 17*. Na família das caspases, a caspase 8 diminuiu no silenciamento, bem como, a caspase 3, com aumento no ruído, porém abaixo do valor considerado de -1,5 e 1,5. Na família dos

ligantes do TNF, o *Tnfa* diminuiu no silenciamento e aumentou na exposição ao ruído. Na família TRAF, o *Traf2* aumentou no silenciamento, diminuindo no ruído. Na família da MAPK, no silenciamento não houve uma alteração significativa, porém no ruído houve aumento da *Map3k1*, *Map3k7* e diminuição da *Map3k14*. Dos genes anti-apoptóticos, o *Pak1* apresentou um “fold-change” de 8 no silenciamento.

Tabela 12. Perfil de expressão de genes da via metabólica do *Tnfa* na exposição ao ruído com e sem o silenciamento gênico

	Fold Change siRNA <i>Tnfa</i> / <i>scramble</i>	Fold change Ruído/não ruído	Fold Change siRNA <i>Tnfa/scrambl</i> <i>e</i>	Fold change Ruído/não ruído
Família Bcl				
Via intrínseca				
Bcl2	-1,73	-1,6		
BID	-1,5	1,22		
Citocromo C	-1,18	-1,36		
Apaf 1	-1,09	-1,19		
Família dos				
receptores TNF				
Cd27	-4,18	-1,46		
Cd40	-2,61	1,25		
Lta	-2,5	1,17		
Ltb	-1,9	-1,56		
Ltbr	1,19	-1,08		
Tnfrsf1A	-1,52	1,18		
Tnfrsf1B	-5,18	-1,15		
Tnfrsf4	-2,8	1,05		
Tnfrsf8	-4,06	-1,09		
Tnfrsf9	-1,49	1,105		
Tnfrsf10B	-1,48	-1,01		
Tnfrsf11B	-1,39	1,143		
Tnfrsf12A	-1,56	1,098		
Tnfrsf14	-4,83	-1,36		
Tnfrsf 17	2,09	-5,02		
Tnfrsf21	1,16	-1,09		
Tnfrsf25	1,47	-1,09		
Faz	-2,68	1,04		
Família domínio				
de morte				
Fadd	1,65	-1,43		
Tradd	1,35	-1,53		
Família NfκB				
NfκB1	-1,3	-1,31		
NfκBia	-2,51	-2,59		
Iκbkg	1,11	-1,10		
Iκbkb	1,02	-1,10		
Iκbkap	1,158	-1,19		
Família				
caspase				
Casp 3	-1,26	1,24		
Casp 8	-1,64	1,3		
Família dos				
ligantes TNF				
Cd40L	-7,63	-1,75		
<i>Tnfa</i>	-3,8	2,065		
Tnfsf4	-1,18	-1,23		
Tnfsf9	-2,36	1,032		
Tnfsf10	1,23	-1,9		
Tnfsf11	-2,11	-1,05		
Tnfsf12	-2,88	1,0		
Tnfsf13	-2,5	-1,31		
Tnfsf14	-3,5	1,549		
Tnfsf15	-1,21	-1,38		
Tnfsf18	-1,8	-1,70		
FasL	-1,15	-1,24		
Família Traf				
Traf2	2,293	-1,2		
Traf3	1,03	-1,3		
Traf4	1,048	-1,2		
Traf6	-1,03	-1,19		
Traf7	1,142	-1,07		
Família				
MapK				
Map3K1	1,253	4,52		
Map2K4	1,268	-1,23		
Map3K7	1,011	4,847		
Mapk8	-1,07	-1,38		
Map3k14	1,18	-5,02		
Jun	1,07	1,07		
Genes anti-				
apoptose				
Pak1	8,640	-1,04		
Tradd	1,353	-1,53		

6 DISCUSSÃO

A proteína TNF α é uma citocina pró-inflamatória secretada na cóclea por fibroblastos do ligamento espiral, células ciliadas externas e células de suporte em resposta a inúmeros estados patológicos como: exposição ao ruído e vibração, meningite bacteriana, ototoxicidade à cisplatina, processos imunológicos e cirurgia de implante coclear (Zou et al., 2005; Park et al., 2012). Em linhagem de células embrionárias do órgão de Corti de camundongos (UB-OC1) e nas células ciliadas da cóclea explantada de ratos induziu apoptose segundo achados de Park et al. (2012) e Dihn et al. (2013).

Nesse estudo, na exposição ao ruído, houve aumento da expressão em 2x do *Tnfa* e em 4x da *Map3k7* e *Map3k1*, os quais funcionam como segundos-mensageiros na via da apoptose (Shen e Pervaiz, 2006), colaborando com dados na literatura que associam a ação do TNF α na apoptose das células ciliadas e na ativação da via de sinalização das MAPkinases/ JNK, em resposta ao ruído (Arpornchayanon, 2010).

Fujioka et al. (2006), observaram em ratos Sprague-Dawley o aumento do *Tnfa*, por qRT-PCR, nas primeiras 3h e por até 24h, após exposição ao ruído. Em vista disso, os animais do estudo foram expostos ao ruído branco e reavaliados 24h após o estímulo, pela mesma técnica, evidenciando o aumento da expressão gênica do *Tnfa*, do seu receptor e de outros genes da superfamília.

Os mesmos autores utilizaram ruído branco na intensidade de 124 dB SPL por 2h enquanto Sliwińska-Kowalska et al. (1992) utilizaram ruído de 112 dB SPL por 2h em cobaias, com perda auditiva importante. Em nosso estudo, os ratos wistar foram expostos ao ruído branco na intensidade de 120 dB SPL por 3h com o objetivo de induzir perda auditiva mensurada por meio do Peate por ser considerada uma técnica que permite medir com precisão e com alta reprodutibilidade, o nível auditivo em animais e estimar a alteração do limiar eletrofisiológico, após a exposição ao ruído.

Drogas que interferem com o TNF α , através da competição pelo seu receptor, removendo-o da circulação e dos espaços pericelulares, como o etanercepte, promoveram melhora significativa do processo inflamatório local na cóclea, com boa resposta na exposição ao ruído (Mohler et al., 1993; Satoh et al., 2002; Arpornchayanon et al., 2013; Liu et al., 2015). Desse modo, esses autores concluíram que essa proteína desempenha um papel fundamental na perda auditiva relacionada à inflamação e ao ruído, sugerindo que drogas inibidoras poderiam ser indicadas na terapêutica dessas patologias.

A partir dessas considerações realizamos o bloqueio da citocina por meio do silenciamento gênico, observando diminuição da expressão em 26,31%, com Rq de 0,259 que correspondeu ao “fold-change” de -3,856. Este valor é interpretado como uma redução na expressão do RNAm em 3,85 vezes decorrente do silenciamento (Livak e Schmittgen, 2001; Schmittgen e Livak, 2008), o que determinou preservação dos limiares eletrofisiológicos das orelhas expostas ao ruído.

O siRNA é utilizado para promover o bloqueio parcial do RNAm alvo e conseqüentemente, da síntese da proteína relacionada, por um curto período de tempo (48h para o gene e 72h para a proteína). Oishi et al. (2013) administraram pela via intra-timpânica siRNA*Nox3* em uma orelha e siRNA *scramble* na orelha contralateral de camundongos e avaliaram a fluorescência da proteína nas células ciliadas externas, detectando diminuição da fluorescência em 72h após a administração, com diferença significativa entre as orelhas. Da mesma forma, administramos siRNA *Tnfa* em uma orelha e siRNA *scramble* na orelha contralateral sem interferência de efeitos entre as orelhas obtendo uma diferença significativa em relação ao limiar eletrofisiológico e amplitude das ondas.

Kim et al. (2011) constataram *in vitro* que o siRNA*Stat6* introduzido nas células HEI-OC1 (células imortalizadas de camundongos), 36h antes da lesão pela cisplatina, reduziu a produção de TNF α e IL-4. Em 2015, Chen et al. introduziram siRNA*p85 α* , para observar a via metabólica PI3K / Akt, 72h antes da exposição ao ruído e em 2016 realizaram, com mesma metodologia, a inibição da desacetilação das histonas, obtendo redução gênica em 30% nas células ciliadas externas em relação ao controle. Mukherjea et al. (2008, 2010 e 2011), obtiveram uma taxa de silenciamento de 70% ao administrar, pela via transtimpânica, o siRNA*Nox3* em ratos com posterior estimulação com a cisplatina. Em nosso estudo, a expressão do gene *Tnfa* foi reduzida em 26,31%, que representou uma taxa de silenciamento ou “knockdown” de 74,1%.

In vivo, na maioria dos estudos, o siRNA foi administrado sem agente de transfecção e através da aplicação local, atingindo concentração desejada nas células alvo (Mukherjea et al., 2008, 2010). Por conseguinte, optamos por seu uso sem agente de transfecção, administrado pela via trans-timpânica, observando boa taxa de silenciamento pelo qRT-PCR e preservação dos limiares eletrofisiológicos no Peate clique.

Em 2017, Murillo-Cuesta et al. compararam a via intra-timpânica (bulostomia) e a via trans-timpânica em camundongos para introdução de drogas na orelha interna, e

observaram que, ambos os procedimentos cirúrgicos, não alteraram as respostas auditivas ao Peate clique e tone, quando comparados com controle não submetido à cirurgia. A via intra-timpânica, no entanto, promoveu um processo inflamatório maior em comparação a via trans-timpânica. Mukherjea et al. (2008) introduziram com sucesso o siRNA na cóclea de ratos por via trans-timpânica, produzindo “knockdown” dose-dependente do RNAm do gene *Nox3*, sem efeitos adversos na audição do rato ou na morfologia da orelha interna. Os mesmos autores, em 2010, observaram que a administração trans-timpânica de siRNANox3 protegeu as células ciliadas externas e neurônios do gânglio espiral da ação nociva da cisplatina com atenuação da perda auditiva. Dessa maneira, a via trans-timpânica foi considerada, nesse estudo, como método padrão para administração do siRNA na orelha interna, por ser uma técnica simples com reduzida morbi-mortalidade.

Através dessa via, a substância aplicada difunde-se através da membrana da janela redonda, sem danos às respostas auditivas (Borkholder, 2008; Rybak et al., 2012) e na avaliação da cinética de drogas distribuídas na orelha interna, observou-se que a substância nos fluidos perilinfáticos foi detectada em 24h, após a injeção, com eliminação em 3 a 5 dias (Xu et al., 2010).

Yu et al. (2012), relataram que a injeção trans-timpânica de lentivírus contendo shRNA em frangos promoveu silenciamento gênico satisfatório ao nível do gânglio acústico e células ciliadas. Os autores administraram 10 µl na orelha média de frangos, através do quadrante superior externo da membrana timpânica, semelhante ao que realizamos, sem observação de dano detectável, produzindo uma transfecção satisfatória do vírus nas células da orelha interna. Do mesmo modo, Mukherjea et al., (2010, 2011) não observaram dano significativo à membrana timpânica, com cicatrização da miringotomia em 72 h após a administração. Semelhante a esses autores, realizamos a técnica trans-timpânica com injeção lenta por 5s e posterior colocação dos animais em decúbito lateral, para manter o nicho da janela redonda banhado em solução por 30 min (Mukherjea et al., 2010, 2011; Yu et al., 2012).

Em nossa pesquisa, o ruído promoveu aumento da expressão do gene *Tnfa* e de seu receptor *Tnfrsf1A* 24h após a exposição, além do aumento da expressão de genes, relacionados à apoptose e diminuição de genes, relacionados à sobrevivência celular. Por outro lado, o silenciamento do *Tnfa* promoveu diminuição da sua expressão, do receptor *Tnfrsf1A*, de outros receptores e ligantes relacionados à apoptose, como as

caspsases 8 e 3 e aumento da expressão de genes relacionados à sobrevivência celular como *Tnfrsf17*(Cd27), *Traf2* e *Pak1*.

O *Tnfrsf17*(Cd27) apresentou aumento em 2x (Rq:2,091) da expressão gênica nos ratos silenciados. É um gene relacionado à ativação do NFkB e *Mapk8/Jnk*, estando associado aos membros da família TRAF, podendo transduzir sinais para sobrevivência e proliferação celular. Na exposição ao ruído, sem silenciamento, no entanto, houve diminuição em 5x da expressão desse gene (Rq: -5 / 19,79%).

Pak (*p21 protein Cdc42/Rac -activated kinase*) é uma serina/treonina quinase cuja ativação pelas Rho-GTPases *Cdc42* e *Rac1* e pela esfingosina resulta em mudança conformacional e autofosforilação (Bokoch et al., 1998). A família PAK pode atuar em eventos pro ou antiapópticos. A PAK1, quando não sofre clivagem pela caspase, está relacionada à sobrevivência celular, enquanto a PAK2, à apoptose. Metodologias baseadas em RNA como Northern plot, qRT-PCR e hibridação *in situ*, revelaram a expressão da família PAK nos tecidos, onde *Pak1* foi altamente expresso no cérebro, músculo e baço, *Pak2*, em inúmeros tecidos e *Pak3*, no cérebro (Manser et al., 1995; Teo et al., 1995). Nós constatamos a expressão de *Pak1* e *Pak2* na cóclea, com aumento da expressão em oito vezes no gene *Pak1*, no silenciamento gênico do *Tnfa* (Rq:8,64) e diminuição da expressão de *Pak2*.

Schurmann et al. (2000) e Frost et al. (2000) evidenciaram que o aumento da expressão do *Pak1* foi associado à promoção da sobrevivência celular, podendo estar relacionado à fosforilação e inibição de Bax na via intrínseca e/ou a ativação do fator de transcrição NFkB na via extrínseca. O aumento da expressão de *Pak1*, em células epiteliais diplóides normais do cólon, foi associado ao aumento da proliferação celular e diminuição da apoptose, e em tumor de ovário, foi relacionado a metástases, proliferação tumoral e mau prognóstico (Lu et al., 2013; Khare et al., 2015). No “knockdown” do *Tnfa*, em ratos expostos ao ruído, o aumento da expressão do *Pak1* foi associado à preservação auditiva; no entanto, experimentos mais específicos precisam ser realizados para caracterizar essa associação.

Na via de sinalização do TNF α , o recrutamento de proteínas da família TRAF, sobretudo TRAF2, pode levar à ativação de fatores de transcrição tais como NFkB e JNK promovendo a sobrevivência e diferenciação celular. Estudos revelaram que a deficiência ou diminuição da expressão de TRAF2 está relacionada a uma maior sensibilidade do receptor TNFRSF1A ao TNF α induzindo à morte celular (Devin et al.,

2000). No silenciamento, nós detectamos aumento em 2x na expressão do gene *Traf2* (Rq: 2,293) que está relacionado à via de sinalização anti-apoptótica, tal como o aumento na expressão do *Tradd*, que codifica a proteína de mesmo nome, cuja função é interligar o receptor de membrana ao TRAF 2 (Natoli et al.,1997).

Nos ratos submetidos ao ruído, sem intervenção cirúrgica, houve aumento dos genes *Map3k1* e *Map3k7* com um “fold-change” acima de 4 e diminuição expressiva dos genes *Map3k14*, *Nfkb1a*, *Tnfrsf17*, envolvidos na sobrevivência celular.

Em relação à família MAP3K (mitogen-activated protein kinase kinase), na exposição ao ruído, a expressão do gene *Map3k14* diminuiu em 5x (“fold-change” -5). Este gene codifica uma serina-treonina quinase que liga-se a *Traf2* e promove a atividade anti-apoptótica do NFkB. *Map3k7* e *Map3K1* aumentaram sua expressão em 4,8 e 4,5 vezes no ruído, respectivamente, (“Fold-change” 4,847;4,52). *Map3K7* codifica a proteína TAK 1 e pode ser ativada pelo TNFa, estando relacionada à via de sinalização MAPK-p38 e NFkB relacionado à inflamação e apoptose (Le Goff et al., 2016). A proteína *MAP3k1* localiza-se na superfície apical das células de suporte, próximo aos corpos basais na orelha interna em murinos, estando relacionada com a função auditiva (Yousaf et al., 2015). Em seu comprimento total apresenta ação anti-apoptótica, no entanto, quando é clivada por caspases, promove apoptose, sendo considerada uma proteína de regulação desse processo (Salema et al., 2017).

Os genes da via intrínseca da apoptose *Bcl2*, *apaf1* e *citocromo C*, presentes na placa, não apresentaram alteração na sua expressão gênica em resposta ao ruído, com e sem silenciamento, embora *Bid*, que interliga as vias, demonstrasse alteração. Dihn et al. (2013) observaram lesão de células ciliadas *in vitro* devido ao TNFa, com preservação celular devido ao silenciamento de *Bax*, sugerindo que a apoptose dessas células seria decorrente da ativação da via intrínseca, estabelecendo uma relação do TNFa com *BAX*. Os nossos dados, no entanto, sugerem que, na exposição ao ruído, a lesão apoptótica decorrente do aumento do TNFa não está relacionada à via intrínseca, porém como não foi realizado uma avaliação genética detalhada, apenas uma triagem de genes associados à sua via metabólica, seriam necessários maiores estudos, para observar a relação deste gene com os da via intrínseca.

Previamente à análise das características eletrofisiológicas, relacionadas ao silenciamento e exposição ao ruído, realizamos estudo normativo dos potenciais evocados auditivos obtidos de 30 ratos, ou seja, 60 orelhas, pois segundo Swan (1988)

a padronização do exame é importante, pois existe grande variabilidade tanto dentro como entre espécies.

De acordo com a literatura, a intensidade do sinal tem efeito significativo na latência e amplitude do potencial, logo, a sua diminuição é acompanhada de aumento da latência e diminuição da amplitude (Hall, 2007; Cavalcante, 2010). Neste estudo, nos exames realizados, o comportamento da latência e amplitude em relação à intensidade do estímulo foi semelhante ao observado em animais e humanos normo-ouvintes, com aumento da latência e diminuição da amplitude conforme a diminuição da intensidade do estímulo. Apenas a onda V apresentou aumento da amplitude na diminuição do estímulo, porém como não é uma onda de características regulares nos roedores e como se manteve dentro dos valores de normalidade, não foi considerada significativa nesse estudo.

A latência das ondas apresentou relação inversamente proporcional à intensidade do estímulo, havendo latências curtas em resposta à frequência de estímulo elevada da mesma forma que relatado por Overbeck e Church (1992).

A latência do interpico I-IV é um índice útil e muito empregado em ratos, representando o tempo de transmissão no tronco encefálico. Nossos achados para os valores da média e desvio padrão da latência interpico I-IV foram semelhantes aos encontrados por Shaw (1988).

A morfologia das ondas e os valores estão relacionados aos filtros utilizados na medição. Em nosso estudo, utilizamos os filtros padronizados para o equipamento com respostas satisfatórias e semelhantes à literatura (Shaw et al., 1988; Alvarado et al., 2012), pois o traçado foi característico do modelo animal e as ondas tornaram-se cada vez menos identificáveis à medida que se reduziu a intensidade do estímulo, com maior estabilidade da onda II, como descrito por Alvarado et al. (2012).

Segundo Popelar et al. (2000), a exposição ao ruído promove lesão periférica que é refletida em mudança no limiar auditivo e em respostas fracas ao som, na avaliação audiológica, após o silenciamento e exposição ao ruído, evidenciamos que a orelha que recebeu o *scramble* e, portanto sem bloqueio do gene, apresentou diferença significativa no limiar eletrofisiológico em relação à orelha silenciada, bem como, alteração na morfologia das ondas.

Davis et al. (1989) e Henry et al. (2011) observaram que chinchilas expostas ao ruído apresentaram aumento do limiar eletrofisiológico com alteração da morfologia das ondas ao Peate, em nossa avaliação houve aumento significativo do limiar nas orelhas

não silenciadas, porém na presença de resposta, em frequências mais elevadas, foi constatado que a morfologia das ondas foi semelhante à dos ratos silenciados, embora com alteração da amplitude.

Alguns autores relataram aumento da intensidade do estímulo, em animais expostos ao ruído, para obtenção de latências comparáveis às observadas em animais não expostos. Assim, intensidades mais elevadas foram necessárias para se obter latências semelhantes às dos animais silenciados. Como este parâmetro está relacionado à mielinização da via auditiva central, não houve alteração na exposição ao ruído, por se tratar de lesão periférica.

Na intensidade de 80 dBSPL a amplitude média da onda I foi estatisticamente maior na orelha siRNA *Tnfa* ($p = 0,040$) e na intensidade de 90 dBSPL, a amplitude média das ondas II e IV foram estatisticamente maiores no lado tratado ativamente ($p = 0,004$ e $p = 0,045$ respectivamente). Popelar et al. (2008) e Henry et al. (2011) associaram diminuição da amplitude das ondas no Peate ao comprometimento auditivo periférico, sendo observada sobretudo em resposta à exposição ao ruído.

Kujawa e Liberman (2009) relacionaram a redução da amplitude da onda I com a perda persistente das conexões sinápticas das fibras nervosas terminais às células ciliadas internas, o que caracteriza a sinaptopatia. Mesmo nos ratos que apresentaram retorno da audição, após o estímulo pelo ruído, as amplitudes da onda I permaneceram diminuídas. Stamper e Johnson (2015) observaram diminuição da amplitude da onda I no Peate clique em humanos, com história de exposição ao ruído, semelhante ao observado em modelo animal, essa redução de amplitude também foi identificada em pacientes com zumbido e audição aparentemente normal (Euteneuer e Praetorius, 2014). Esses dados ratificam a relação entre lesão coclear e diminuição da amplitude das ondas, sobretudo I.

Os resultados encontrados, em conjunto com todos os outros estudos, afirmam que o limiar eletrofisiológico e amplitude das ondas fornecem estimativas úteis de sensibilidade coclear e nesse estudo expressam a preservação auditiva significativa, à custa do bloqueio do *Tnfa*, por meio da técnica de silenciamento gênico. O “knockdown” desse gene preservou, não apenas o limiar eletrofisiológico dos animais, como evitou a lesão coclear, pois a orelha que recebeu *scramble* apresentou alteração na amplitude das ondas I, II e IV relacionada ao comprometimento coclear e sinaptopatia; o que não foi observado na orelha silenciada.

7 CONCLUSÃO

Em ratos, com perda auditiva induzida por ruído, observamos aumento de expressão do gene *Tnfa* e de genes envolvidos na apoptose. A administração prévia trans-timpânica do siRNA *Tnfa*, em ratos expostos a ruído intenso, promoveu preservação do limiar eletrofisiológico e da amplitude da onda I, II e IV no Peate clique, comparando-se com animais sob mesmas condições, submetidos a injeção trans-timpânica do siRNA *scramble*, sugerindo, que a inibição desse gene pode ser uma estratégia promissora de preservação auditiva. O “knockdown” do *Tnfa* inibiu a disfunção coclear após estímulo acústico, sugerindo que essa proteína é um dos principais agentes envolvidos na perda auditiva induzida pelo ruído, devendo ser considerada como alvo terapêutico na estratégia de preservação auditiva.

8 REFERÊNCIAS*

*De acordo com Estilo Vancouver

Akil O, Oursler AE, Fan K, Lusting LR. Mouse Auditory Brainstem Response Testing. *Bio-protocol*. 2016; 6: e1768.

Albuquerque AAS, Rossato M, Oliveira JAA, Hyppolito MA. Conhecimento da anatomia da orelha de cobaias e ratos e sua aplicação na pesquisa otológica básica. *Rev. Bras. Otorrinolaringol*. 2009; 75: 43-49.

Allen AR, Starr A. Auditory Brain Stem Potenciais in Monkey (M. Mullata). *Neurophysiology*. 1978, 45: 53-63.

Alvarado JC, Fuentes-Santamaría V, Jareño-Flores T, Blanco JL, Juiz JM. Normal variation in the morphology of auditory brainstem response (ABR) waveform: a study in wistar rats. *Neurosci Res*. 2012; 73: 302-11.

Anazetti MC, Melo PS, Durán N, Haun M. Comparative Cytotoxicity of Dimethylamide-Crotonin in the Promyelocytic Leukemia Cell Line (HL60) and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Toxicology*. 2003; 188:261-74.

Aranda OS, Lajoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*. 2012; 33:366-9.

Arpornchayanon W. *Effects of TNF- α inhibition on inner ear microcirculation and hearing function after acute loud noise in vivo* [Tese]. Munique/Alemanha: Faculdade de Medicina, Universidade Ludwig-Maximilians; 2010.

Arpornchayanon W, Canis M, Ihler F, Settevendemie C, Strieth S. TNF- α inhibition using etanercept prevents noise-induced hearing loss by improvement of cochlear blood flow in vivo. *Int J Audiol*. 2013; 52:545-52.

Arslan HH, Satar B, Serdar MA, Ozler M, Yilmaz E. Effects of hyperbaric oxygen and dexamethasone on proinflammatory cytokines of rat cochlea in noise-induced hearing loss. *Otol Neurotol*. 2012; 33:1672-8.

Bantounas I, Phylactou LA, Uney JB. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *J Mol Endocrinol*. 2004; 33: 545-57.

Bokoch GM, Reilly AM, Daniels RH, King CC, Olivera A, Spiegel S, Knaus UG. A GTPase-independent mechanisms of p21-activated kinase activation. *J Biol Chem.* 1998; 273:8137-44.

Borkholder DA. State-of-the-art mechanisms of intracochlear drug delivery. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 16: 472–7.

Buchwald JS, Hinman C, Norman RJ, Huang CM, Brown KA. Middle- and long-latency auditory evoked responses recorded from the vertex of normal and chronically lesioned cats. *Brain Res.* 1981; 205:91-109.

Cavalcante JMS. *Registro dos Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico por estímulos click etone burst em recém-nascidos a termo e pré- termo.* 2010. [Dissertação] Ribeirão Preto (SP). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2010.

Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science.* 2002; 31: 1634-5.

Chen J, Yuan H, Talaska AE, Hill K, Sha S-H. Increased Sensitivity to Noise-Induced Hearing Loss by Blockade of Endogenous PI3K/Akt Signaling. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2015; 16: 347–356.

Chen TJ, Chen SS. Generator study of brainstem auditory evoked potentials by a radiofrequency lesion method in rats. *Exp. Brain Res.* 1991; 85:537–542.

Dantas, CG - *Resolvendo casos em audiologia/ Márcia Regina Gama(org)- São Paulo: Summus, 2001.*

Davis RI, Ahroon WA, Hamernik RP. The relation among hearing loss, sensory cell loss and tuning characteristics in the chinchilla. *Hear Res.* 1989; 41:1-14.

Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2000; 10: 369-77.

Devin A, Cook A, Lin Y, Rodriguez Y, Kelliher M, Liu Z. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*.2000; 12: 419–429.

Devin A, Lin Y, Yamaoka S, Li Z, Karin M, Liu Zg.The alpha and beta subunits of IkappaB kinase (IKK) mediate TRAF2- dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Mol Cell Biol*. 2001; 21: 3986-94.

Dinh CT, Bas E, Chan SS, Dinh JN, VuL, Van De Water TR. Dexamethasone treatment of tumor necrosis factor-alpha challenged organ of Corti explants activates nuclear factor kappa B signaling that induces changes 77 in gene expression that favor hair cell survival. *Neuroscience*. 2011; 11: 157-67.

Doyle WJ, Fria TJ. The effects of hypothermia on the latencies of the auditory brain-stem response (ABR) in the rhesus monkey. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1985; 60:258-66.

Dykxhoorn DM, Novina CD; Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2003; 4: 457–467.

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*. 2001; 15: 188-200.

Euteneuer S, Praetorius M. Hearing research news: from the periphery to the Center. *HNO*. 2014; 62:88-92.

Filho APFS. Sedação, analgesia e anestesia geral em ratos In: Rhoden EL, Rhoden, CR. *Princípios e Técnicas em Experimentação Animal*. Porto Alegre: UFRGS Editora. 2006. p. 46-47.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double- stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 19: 806-11.

Fish ER, Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ. *Anaesthesia and Analgesia for Laboratory Animals*. 2nd Oxford: Ed. Elsevier; 2008.

Frost JA, Swantek JL, Stippec S, Yin MJ, Gaynor R, Cobb MH. Stimulation of NF kappa B activity by multiple signaling pathways requires PAK1. *J Biol Chem*. 2000; 30:19693-9.

Fujioka M, Kanzaki S, Okano HJ, Masuda M, Ogawa K, Okano H. Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. *J Neurosci Res*. 2006; 83: 575-83.

Fujioka M, Okano H, Ogawa K. Inflammatory and immune responses in the cochlea: potential therapeutic targets for sensorineural hearing loss. *Front Pharmacol*. 2014; 5:1-5.

Gama MR. *Resolvendo casos em audiologia* Márcia Regina Gama (org)- São Paulo: Summus, 2001.

Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*. 2002; 30: 503-512.

Gourévitch B, Doisy T, Avilla CM, Edeline J-M. Follow-up of latency and threshold shifts of auditory brainstem responses after single and interrupted acoustic trauma in guinea pig. *Brain Res*. 2009; 1304: 66-79.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998; 28:1309-12.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007; 53: 335-343.

Guzman-Aranguez A, Loma P, Pintor J. Small-interfering RNAs (siRNAs) as a promising tool for ocular therapy *Br J Pharmacol*. 2013; 170: 730- 747.

Haake SM, Dinh CT, Chen S, Eshraghi AA, Van De Water TR. Dexamethasone protects auditory hair cells against TNF alpha initiated apoptosis via activation of PI3K/Akt and NFkappa B signaling. *Hear Res*. 2009; 255: 22-32.

Hall, JW. *New handbook of auditory responses*. Boston, Mass. Person, 2007.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Research*. 1996; 6: 986-994.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 12: 770-6.

Henry KS, Kale S, Scheidt RE, Heinza MG. Auditory brainstem responses predict auditory nerve fiber thresholds and frequency selectivity in hearing impaired chinchillas. *Hear Res*. 2011; 280: 236–244.

Hirose K, Discolo CM, Keasler JR, Ransohoff R. Mononuclear phagocytes migrate into the murine cochlea after acoustic trauma. *J Comp Neurol*. 2005; 489:180-94.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *Bio-Technology*. 1992; 10: 413–7.

Holland PM, Abramson RD, Watson RE, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991; 88:7276-7280.

Hu BH, Cai Q, Manohar S, Jiang H, Ding D, Coling DE, Zheng G, Salvi R. Differential expression of apoptosis-related genes in the cochlea of noise-exposed rats. *Neuroscience*. 2009; 161: 915-25.

Hu BH, Cai Q. Acoustic overstimulation modifies Mcl-1 expression in cochlear sensory epithelial cells. *J Neurosci Res*. 2010; 88:1812–1821.

Janssen R, Hetzler BE, Creason JP, Dyer RS. Differential impact of hypothermia and pentobarbital on brainstem auditory evoked responses. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1991; 80:412-21.

Jero J, Coling DE, Lalwani AK. The use of Preyer reflex in evaluation of hearing in mice. *Acta Otolaryngol*. 2001; 121: 585-589.

Kamogashira T, Fujimoto C, Yamasoba T. Reactive oxygen species, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in hearing loss. *Biomed Res Int*. 2015; 1- 7.

Kaur T, Mukherjea D, Sheehan K, Jajoo S, Rybak LP, Ramkumar V. Short interfering RNA against STAT1 attenuates cisplatin-induced ototoxicity in the rat by suppressing inflammation. *Cell Death Dis*. 2011;2:e180.

Kelly JB, Masterton B. Auditory sensitivity of the albino rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1977; 91:930-6.

Khare V, Dammann K, Asboth M, Krnjic A, Jambrich M, Gasche C. Over expression of PAK1 promotes cell survival in inflammatory bowel diseases and colitis-associated cancer. *Inflamm Bowel Dis*. 2015; 21:287-96.

Kim HJ, Oh GS, Lee JH, Lyu AR, Ji HM, Lee SH, Song J, Park SJ, You YO, Sul JD, Park C, Chung SY, Moon SK, Lim DJ, So HS, Park R. Cisplatin ototoxicity involves cytokines and STAT6 signaling network. *Cell Res*. 2011; 21: 944-56.

Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biol*. 2016; 37:8471-86.

Kirkwood BR., Sterne JA. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Massachusetts, USA: Blackwell Science; 2006, p.502.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006; 27: 95-125.

Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *J Neurosci*. 2009; 29:14077-85.

Kuo WP, Jenssen T-K, Butte AJ, Ohno-Machado L, Kohane I. S. Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics*. 2002; 18: 405–12.

Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. *Cuidados e Manejos de Animais de Laboratório*. São Paulo: Atheneu, 2010; 551-5.

Le Goff C, Roger C, Le Goff W, Pinto G, Bonnet D, Chrabieh M, Alibeu O, Nistchke P, Munnich A, Picard C, Cormier-Daire V. Heterozygous Mutations in MAP3K7, Encoding TGF- β -Activated Kinase 1, Cause Cardiospondylocarpo facial Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*. 2016; 99: 407-413.

Li YC, Kong LH, Cheng BZ, Li KS. Construction of influenza virus siRNA expression vectors and their inhibitory effects on multiplication of influenza virus. *Avian Dis*. 2005; 49: 562-73.

Liu Y, Jolly C, Braun S, Janssen T, Scherer E, Steinhoff J, Ebenhoch H, Lohner A, Stark T, Kiefer J. Effects of a dexamethasone releasing implant on cochlea: A functional, morphological and pharmacokinetic study. *HearRes*. 2015; 327:89-101.

Livak JK, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻DDCT Method. *Methods*. 2001; 25:402–408.

Maeda Y, Fukushima K, Nishizaki K, Smith RJ. In vitro and in vivo suppression of GJB2 expression by RNA interference. *Hum Mol Genet*. 2005; 15: 1641-50.

Manser E, Chong C, Zhao ZS, Leung T, Michael G, Hall C, Lim L. Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J Biol Chem*. 1995; 270:25070-8.

Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. 2002;110:563-74.

Melgar-Rojas P, Alvarado JC, Fuentes-Santamaría V, Gabaldón-Ull MC, Juiz JM. Validation of Reference Genes for RT-qPCR Analysis in Noise-Induced Hearing Loss: A Study in Wistar Rat. *PLoS ONE*. 2015; 10: e0138027.

Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremmler KE, Fung VP, Madani H, Widmer MB. Soluble tumour necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol.* 1993; 151:1548-61

Motalebi kashani M, Saberi H, Hannani M. Prevention of Acoustic Trauma-Induced Hearing Loss by N-acetylcysteine Administration in Rabbits. *Arch Trauma Res.* 2013; 1: 145-50.

Mukherjea D, Jajoo S, Whitworth C, Bunch JR, Turner JG, Rybak LP, Ramkumar V. Short interfering RNA against transient receptor potential vanilloid 1 attenuates cisplatin-induced hearing loss in the rat. *J Neurosci.* 2008;28:13056-65.

Mukherjea D, Jajoo S, Kaur T, Sheehan KE, Ramkumar V, Rybak LP. Transtympanic administration of short interfering (si) RNA for the NOX3 isoform of NADPH oxidase protects against cisplatin-induced hearing loss in the rat. *Antioxid Redox Signal.* 2010;13:589-98.

Mukherjea D, Jajoo S, Sheehan K, Kaur T, Sheth S, Bunch J, Perro C, Rybak LP, Ramkumar V. NOX3 NADPH oxidase couples transient receptor potential vanilloid 1 to signal transducer and activator of transcription 1-mediated inflammation and hearing loss. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:999-1010.

Murillo-Cuesta S, Vallecillo N, Cediell R, Celaya AM, Lassaletta L, Varela-Nieto I, Contreras J. A Comparative Study of Drug Delivery Methods Targeted to the Mouse Inner Ear: Bullostomy Versus Transtympanic Injection. *J Vis Exp.* 2017; 121:1-11.

Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family Trends. *Biochem Sci.* 1998; 23:74-9.

Natoli G, Costanzo A, Moretti F, Fulco M, Balsano C, Levrero M. Tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 signaling downstream of TNF receptor-associated factor 2. Nuclear factor kappaB (NFkappaB)-inducing kinase requirement for activation of

activating protein 1 and NFkappaB but not of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1997; 272:26079-82.

Novais CM, Pires-Alves M. Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). *Rev. Biotecnol. Cienc. Des.* ed. 13. 2004, 4pp.

Oishi N, Chen FQ,Zheng HW,Sha SH.Intra-Tympanic Delivery of Short Interfering RNA into the Adult Mouse Cochlea. *Hear Res.* 2013; 296:36-41.

Oliveira JAA, Del Vecchio F, Marseillan RF. Respostas elétricas evocadas das vias auditivas de cobaias por estimulação com cliques. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia.* 1983; 49:7-15.

Oliveira TMS. *PCR em tempo real: métodos e aplicações* [Dissertação]. Aveiro/Portugal. Universidade de Aveiro, 2010.

Overbeck GW, Church MW. Effects of tone burst frequency and intensity on the auditory brainstem response (ABR) from albino and pigmented rats. *Hear Res.* 1992; 59: 129–13.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:e45.

Park HY, Lee MH, Kang SU, Hwang HS, Park, Choung Y-H, kim C-H. Nitric oxide mediates TNF- α -induced apoptosis in the auditory cell line. *The Laryngoscope.* 2012; 122: 2256–2264.

Patel M, Hu Z, Bard J, Jamison J, Cai Q, Hu BH. Transcriptome characterization by RNA-Seq reveals the involvement of the complement components in noise-traumatized rat cochleae. *Neuroscience.* 2013; 248:1-16.

Pirvola U, Xing-Qun L, Virkkala J, Saarma M, Murakata C, Camoratto AM, Walton KM, Ylikoski J. Rescue of hearing, auditory hair cells, and neurons by CEP- 1347/KT7515, an inhibitor of c-Jun Nterminal kinase activation. *J Neurosci.* 2000; 20:43-50.

Plano de randomização [on line]. Disponível em www.randomization.com

Popelar J, Grecova J, Rybalko N, Syka J. Comparison of noise-induced changes of auditory brainstem and middle latency response amplitudes in rats. *Hear Res.* 2008; 245:82-91.

Prasher D. Is there evidence that environmental noise is immunotoxic? *Noise Health.* 2009; 11: 151-155.

Ramos-Nino ME, Scapoli L, Martinelli M, Land S, Mossman BT. Microarray analysis and RNA silencing link fra-1 to cd44 and c-met expression in mesothelioma. *Cancer Res.* 2003; 63:3539-45.

Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell.* 2005; 123: 621-629.

Ruan Y, Gilmore J, Conner T. Towards *Arabidopsis* genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. *The Plant Journal.* 1998; 15: 821-833.

Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Kaur T, Ramkumar V. siRNA-mediated knock-down of NOX3: therapy for hearing loss? *Cell Mol Life Sci.* 2012; 69:2429-34.

Sakat MS, Kilic K, Bercin S. Pharmacological agents used for treatment and prevention in noise-induced hearing loss. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016; 273:4089-410.

Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y, Piao JH, Yagita H, Okumura K, Doi T, Nakano H. TNF-B inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J.* 2003; 22:3898-909.

Salema SM, Hamedb AR, Rehab MM. MTDH and MAP3K1 are direct targets of apoptosis-regulating miRNAs in colorectal carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherap.* 2017; 94: 767-773.

Santarelli R, Arslan E, Carraro L, Conti G, Capello M, Plourde G. Effects of isoflurane on the auditory brainstem responses and middle latency responses of rats. *Acta Otolaryngol.* 2003; 123:176-81.

Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Tumor necrosis factor- α , an initiator and etanercept and inhibitor of cochlear inflammation. *Laryngoscope.* 2002; 112: 1627-1634.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008; 3: 1101-8.

Schurmann A, Mooney AF, Sanders LC, Sells MA, Wang HG, Reed JC, Bokoch GM. p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 453–461

Shaw NA. The auditory evoked potential in the rat – a review. *Prog.Neurobiol.*1988; 31: 19–45.

Shen HM, Pervaiz S. TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *FASEB J.* 2006; 20:1589-98.

Simpson GV, Krorrr RT, Brailowsky S. Altered peripheral and brainstem auditory function in aged rats. *Brain Res.*1985; 348: 28-35.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome-c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 1999; 144:281-92.

Sliwińska-Kowalska M, Sułkowski W, Chrześcijanek M, Kameduła T. Auditory brainstem responses (ABR) in guinea pigs to loud tones noise: a preliminary study. *Otolaryngol Pol.* 1992; 46 :409-14.

Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. 2004; 432:173-8.

Stamper GC, Johnson TA. Auditory function in normal-hearing, noise-exposed human ears. *Ear Hear*. 2015; 36:172-84.

Stankovic KM, Corfas G. Real-time quantitative RT-PCR for low-abundance transcripts in the inner ear: analysis of neurotrophic factor expression. *Hear Res*. 2003; 185: 97-108.

Taishi P, Churchill L, Wang M, Kay D, Davis CJ, Guan X, De A, Yasuda T, Liao F, Krueger JM. TNF alpha siRNA reduces brain TNF and EEG delta wave activity in rats. *Brain Res*. 2007; 1156:125-32.

Teo M, Manser E, Lim L. Identification and molecular cloning of a p21cdc42/rac1-activated serine/threonine kinase that is rapidly activated by thrombin in platelets. *J Biol Chem*. 1995; 270: 26690 –7.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998; 28: 1312-6.

Tucker-Davis Technologies, Inc. A Guide to ABR Testing with the TDT System 3 RZ6[online]. 2015. Disponível em: <http://www.tdt.com/files/manuals/ABRGuide.pdf>

Tuschl T. RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem*. 2001; 2: 239-45.

Van Looij MA. Impact of conventional anesthesia on auditory brainstem responses in mice. *Hear Res*. 2004; 193:75-82, 2004.

Van Pelt-Verkuil E, Van Belkum AT, Hays JP. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Berlim. *Springer Science & Business Media*, 2008.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation*. 2003; 1045–65.

Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski, P. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity: *BioTechniques*. 1997; 22: 474-481.

Xu L, Heldrich J, Wang H, Yamashita T, Miyamoto S, Li A, Uboh CE, You Y, Bigelow D, Ruckenstein M, O'Malley B, Li D. A controlled and sustained local gentamicin delivery system for inner ear applications. *Otol Neurotol*. 2010; 31:1115-21.

Yang WP, Henderson D, Hu BH, Nicotera TM. Quantitative analysis of apoptotic and necrotic outer hair cells after exposure to different levels of continuous noise. *Hear Res*. 2004; 19: 669–76.

Yousaf R, Meng Q, Hufnagel RB, Xia Y, Puligilla C, Ahmed ZM, Riazuddin S. MAP3K1 function is essential for cytoarchitecture of the mouse organ of Corti and survival of auditory hair cells. *Dis Model Mech*. 2015; 8:1543-53.

Yu J, Xiang, M, Wu H, Chen, S. Intratympanic injection of shRNA-expressing lentivirus causes gene silencing in the inner ear in chicken. *Neurosci Lett*. 2012; 510:132-7.

Zou J, Pyykkö I, Sutinen P, Toppila E. Vibration induced hearing loss in guinea pig cochlea: expression of TNF- and VEGF. *Hear Res*. 2005; 202:13-20.

APÊNDICE

Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação da Resposta auditiva do tronco cerebral em ratos expostos ao ruído após Administração Transtimpânica do RNA de interferência(si) para a isoforma da NOX3 NADPH oxidase**”, protocolo nº **146/15** sob a responsabilidade de **Rubens Vuono de Brito Neto** e **Janaina Candida Rodrigues**, apresentado pelo Departamento de Otorrinolaringologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSAO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 07.10.2015.

Vigência do Projeto	Dezembro/2015
Espécie/linhagem	Rato Wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	9 semanas
Origem	Biotério ICB

CEUA-FMUSP, 07 de Outubro de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais



DISCIPLINA DE CLÍNICA OTORRINOLARINGOLÓGICA
AV. DR. ENÉAS DE CARVALHO AGUIAR, 255 - 6º ANDAR - ICHC - SALA 6166
CEP: 05403-000 - CERQUEIRA CÉSAR - SÃO PAULO - BRASIL
FONE: (11) 3063-4121

São Paulo, 11 de outubro de 2017

Ao Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Venho através desta solicitar a alteração no título do trabalho "Avaliação da Resposta auditiva do tronco cerebral em ratos expostos ao ruído após Administração Transtimpânica do RNA de interferência(si) para a isoforma da NOX3 NADPH oxidase", protocolo no 146/15 sob a responsabilidade do Prof. DR. Rubens Vuono de Brito Neto e da Doutoranda Janaina Cândida Rodrigues, apresentado pelo Departamento de Otorrinolaringologia para **Efeito do silenciamento gênico do *Tnfa* na preservação auditiva em ratos Wistar expostos ao ruído e análise da expressão gênica da via metabólica do *Tnfa*.**

Esta mudança deve-se a melhor resposta do gene *Tnfa* ao objetivo do estudo. A metodologia manteve os mesmos cuidados com os animais preconizados pelo CEUA.

RUBENS VUONO DE BRITO NETO
Professor Livre Docente e Associado da Faculdade de Medicina da USP


COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A **CEUA** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 23.10.17, **APROVOU o documento** abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº **146/15** intitulado “**Avaliação da Resposta auditiva do tronco cerebral em ratos expostos ao ruído após Administração Transtimpânica do RNA de interferência(si) para a isoforma da NOX3 NADPH oxidase**” apresentado pelo Departamento de Otorrinolaringologia.

- Alteração de título para: “**Efeito do silenciamento gênico do *Tnfa* na preservação auditiva em ratos wistar expostos ao ruído e análise da expressão gênica da via metabólica do *Tnfa***”

Pesquisador Responsável: **Rubens Vuono de Brito Neto**

CEUA-FMUSP, 23 de Outubro de 2017



Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais