



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE

**DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE E
PATOLOGIA DELL'INVECCHIAMENTO CEREBRALE**

TESI

**PROTOCOLLO AUDIOLOGICO NELLO STUDIO
DEGLI ISOLATI GENETICI**

Coordinatore

Chiar.mo Prof. L. Annunziato

Tutor

Prof. E. Marciano

Candidato

Dott. ssa Renata Iovine

Anno accademico 2004-2005

INDICE

Introduzione	pag. 3 - 20
Scopo	pag. 21 - 24
Materiali e Metodi	pag. 25 - 28
Risultati	pag. 29 - 46
Discussione	pag. 47 - 66
Conclusioni	pag. 67 - 69
Bibliografia	pag. 70 -75

INTRODUZIONE

L'ipoacusia rappresenta una delle condizioni morbose più diffuse ed invalidanti; essa è caratterizzata da una ampia eterogeneità genetica ed espressione fenotipica variabile, anche nelle forme eredo-familiari.

Da recenti ricerche e proiezioni statistiche si stima che vi siano in Italia circa 6.000.000 di soggetti con difetti uditivi e tra questi un numero considerevole è affetto da sordità congenita (1/1000) o acquisita prima della normale epoca di apprendimento del linguaggio con severa compromissione dello sviluppo del linguaggio, delle capacità comunicative e quindi dell'inserimento sociale dell'individuo ipoacusico ^{1,2,3}.

Negli ultimi anni sono stati effettuati notevoli progressi circa la conoscenza dell'etiopatogenesi delle sordità ereditarie, grazie al contributo delle ricerche di genetica molecolare che hanno portato all'individuazione di loci cromosomici connessi con la funzione uditiva, delle loro alterazioni e delle ripercussioni fisiologia dell'orecchio.

Il genoma umano consta di circa 25.000-30.000 geni ⁴, ed è stimato che il numero di quelli coinvolti nello sviluppo e nel funzionamento dell'orecchio interno sia superiore a 1000 ⁵.

Le sordità ereditarie vengono distinte in:

- a) Forme sindromiche, in cui l'ipoacusia si accompagna a manifestazioni cliniche dovute a compromissione di altri organi o apparati (es. renale, oculare, endocrino);

esse rappresentano circa il 30% delle forme eredo-familiari.

- b) Forme non sindromiche (70% delle ipoacusie ereditarie) in cui l'ipoacusia è dovuta ad esclusiva compromissione dell'apparato uditivo; la diagnosi di questo tipo di deficit può risultare più complessa in virtù dell'assenza del corteo di segni e sintomi clinici che accompagnano le forme sindromiche.

La modalità di trasmissione di queste ipoacusie può essere:

- Autosomica recessiva: circa il 70-80% delle ipoacusie non sindromiche;
- Autosomica dominante (15-25%);
- X linked (2-3%);
- Mitocondriali (2-3%)

La ricerca genetica ha ottenuto notevoli successi nell'individuazione di numerosi geni coinvolti nella sordità eredo-familiare, soprattutto infantile; sono stati identificati almeno 70 loci per sordità non sindromiche (51 loci dominanti, 39 recessivi e 7 loci X linked); ancora pochi sono tuttavia i geni determinanti la malattia identificati in questi loci ⁶.

I geni o le regioni cromosomiche (loci) associate alle varie forme di sordità genetica non sindromica sono indicati con la sigla DFN, dall'inglese **DeaFN**ess (sordità):

- **DFNA** per le forme ad eredità autosomica dominante
- **DFNB** per le forme ad eredità autosomica recessiva
- **DFN** per le forme ad eredità recessiva legata al cromosoma X.

La sigla è seguita da un numero che indica l'ordine cronologico con cui le regioni cromosomiche sono stati identificati. La tabella 1 riassume alcuni loci ed geni delle sordità non sindromiche .

Autosomico Recessivo		Autosomico Dominante		X-Linked	
Locus	Gene	Locus	Gene	Locus	Gene
<i>DFNB1</i>	<i>GJB2 (Cx26)</i>	<i>DFNA1</i>	<i>DIAPH1</i>	<i>DFN3</i>	<i>POU3F4</i>
<i>DFNB1</i>	<i>GJB6 (Cx30)</i>	<i>DFNA2</i>	<i>GJB3 (Cx31)</i>		
<i>DFNB2</i>	<i>MYO7A</i>	<i>DFNA2</i>	<i>KCNQ4</i>		
<i>DFNB3</i>	<i>MYO15</i>	<i>DFNA3</i>	<i>GJB2 (Cx26)</i>		
<i>DFNB4</i>	<i>SLC26A4</i>	<i>DFNA3</i>	<i>GJB6 (Cx30)</i>		
<i>DFNB6</i>	<i>TMIE</i>	<i>DFNA4</i>	<i>MYH14</i>		
<i>DFNB7/DFNB11</i>	<i>TMC1</i>	<i>DFNA5</i>	<i>DFNA5</i>		
<i>DFNB8/DFNB10</i>	<i>TMPRSS3</i>	<i>DFNA6/DFNA14</i>	<i>WFS1</i>		
<i>DFNB9</i>	<i>OTOF</i>	<i>DFNA8/DFNA12</i>	<i>TECTA</i>		
<i>DFNB12</i>	<i>CDH23</i>	<i>DFNA9</i>	<i>COCH</i>		
<i>DFNB16</i>	<i>STRC</i>	<i>DFNA10</i>	<i>EYA4</i>		
<i>DFNB18</i>	<i>USH1C</i>	<i>DFNA11</i>	<i>MYO7A</i>		
<i>DFNB21</i>	<i>TECTA</i>	<i>DFNA13</i>	<i>COL11A2</i>		
<i>DFNB22</i>	<i>OTOA</i>	<i>DFNA15</i>	<i>POU4F3</i>		
<i>DFNB23</i>	<i>PCDH15</i>	<i>DFNA17</i>	<i>MYH9</i>		
<i>DFNB29</i>	<i>CLDN14</i>	<i>DFNA20/26</i>	<i>ACTG1</i>		
<i>DFNB30</i>	<i>MYO3A</i>	<i>DFNA22</i>	<i>MYO6</i>		
<i>DFNB31</i>	<i>WHRN</i>	<i>DFNA28</i>	<i>TFCP2L3</i>		
<i>DFNB36</i>	<i>ESPN</i>	<i>DFNA36</i>	<i>TMC1</i>		
<i>DFNB37</i>	<i>MYO6</i>	<i>DFNA48</i>	<i>MYO1A</i>		
<i>DFNB61</i>	<i>PRES (Prestin)</i>	<i>DFNA49</i>	<i>CRYM</i>		

Sono tuttavia ancora molte le forme di ipoacusia a trasmissione eredo-familiare a penetranza completa o incompleta per le quali non si conoscono i geni le cui mutazioni siano responsabili della sordità.

Alcune forme di compromissione della capacità uditiva non ereditarie inoltre, quali ad esempio quelle dovute ad farmaci ototossici, a danno da rumore, a presbiacusia, sono considerate attualmente delle patologie multifattoriali, ovvero in cui esiste una suscettibilità genetica legata ad uno o più geni, che interagendo con fattori ambientali determinano la manifestazione fenotipica del tratto ipoacusico. Anche per queste forme di sordità sono ancora pochi gli studi volti all'identificazione della componente genetica, alla correlazione con il fenotipo espresso e con le variabili ambientali.

Il nostro studio in questi anni di dottorato si è incentrato nell'ambito della genetica delle sordità, in particolare delle mutazioni dei geni della connessina, cui si devono più del 50% delle sordità non sindromiche recessive ad insorgenza preverbale ^{7,8,9,10}, ed impegnandosi in un progetto multidisciplinare clinico-genetico condotto sugli "Isolati Genetici" volto allo studio delle malattie complesse ed alla correlazione genotipo-fenotipo.

Un tratto complesso è determinato da una componente genetica non strettamente mendeliana e una componente ambientale. Il fenotipo dei tratti complessi, quali ad esempio malattie cardiovascolari, ipertensione, diabete ed alcune forme di ipoacusia, è il risultato dell'interazione di due o più geni tra di loro e di questi con fattori ambientali.

Nelle malattie monogeniche un singolo gene è necessario e sufficiente a produrre un fenotipo clinico e il ruolo del gene sul “rischio genetico” di sviluppare la malattia è lo stesso per qualsiasi individuo.

Nel caso delle malattie complesse una determinata combinazione di forme alleliche a più geni, può risultare in una “predisposizione genetica” per un certo fenotipo clinico; spesso le mutazioni genetiche non sono né sufficienti né necessarie per spiegare il fenotipo: lo stile di vita e l’ambiente sono talvolta i principali responsabili dell’insorgenza di queste malattie.

Per quanto concerne l’ipoacusia ancora molto deve essere approfondito circa la correlazione genotipo-fenotipo, sia per quanto riguarda le forme a trasmissione ereditaria sia per le forme non mendeliane.

Anche per alcune forme a trasmissione ereditaria, quali ad esempio quelle dovute a mutazioni del gene della connessina, abbiamo infatti riscontrato nei nostri studi che ad una stessa mutazione genetica corrisponde un diverso grado di perdita uditiva, ed un differente recupero protesico.

In relazione alle altre forme eredo-familiari ad insorgenza post verbale inoltre sono ancora poche le ricerche che possano chiarire le alterazioni genetiche che sottendono lo sviluppo della patologia e che effettuino una correlazione genotipo-fenotipo, volta a spiegare la diversità di espressione in termini ad esempio di età di insorgenza ovvero di gravità della compromissione della capacità uditiva anche tra individui appartenenti alla stessa famiglia.

Studi svolti in tal senso potrebbero risultare inoltre molto utili nella comprensione della patogenesi e dell'evoluzione di alcune forme di ipoacusia acquisita, quali ad esempio la presbiacusia; si ipotizza infatti che l'estrema variabilità inerente l'epoca di insorgenza, le caratteristiche audiometriche della perdita uditiva e la sua evoluzione a parità di sesso, esposizione a rumore etc., possano essere correlate ad una qualche "predisposizione" genetica ^{11,12,13}.

Anche per ciò che riguarda il danno uditivo da ototossici o da rumore si ritiene che possa esistere una qualche suscettibilità genetica circa lo sviluppo della sordità solo in alcuni soggetti esposti e la variabilità interindividuale dell'entità del danno uditivo manifestato ^{14,15,16}.

In questi anni il nostro lavoro scientifico si è dunque incentrato sulla genetica delle sordità e sulla interrelazione tra costituzione genetica dell'individuo con la sua espressione fenotipica e lo stile di vita.

La ricerca effettuata si inserisce nell'ambito del progetto multidisciplinare nato circa tre anni fa per lo studio delle popolazioni isolate del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano, ed in particolare del comune di Campora (Sa), promosso dalla Prof.ssa G. Persico dell'Istituto di Genetica e Biofisica "Adriano Buzzati-Traverso" del CNR di Napoli e dal Prof. P. Gasparini del Dipartimento di Patologia, della II Università di Napoli, che prevede il coinvolgimento di diversi medici specialisti quali cardiologi, audiologi, neurologi, ortopedici, oculisti, e di un team di genetisti.

Il fine dello studio multidisciplinare condotto sulle popolazioni dell'isolato genetico, ovvero su popolazioni sviluppatesi a partire da un ristretto numero di individui (effetto fondatore) e che, grazie all'isolamento geografico ed alla scarsa immigrazione, hanno sviluppato un elevato grado di endogamia e quindi trasmesso in maniera omogenea e senza commistioni il loro patrimonio genetico, è quello di costituire un unico *database* sulle condizioni di salute generali e sull'analisi genetica dell'intera popolazione, che come espresso nella definizione di isolato genetico conserva lo stesso patrimonio genetico dei fondatori, e poter effettuare una correlazione genotipo-fenotipo per i vari tratti complessi esaminati .

Il requisito essenziale perchè il comune incluso nel progetto “Isolato Genetico” fosse ritenuto idoneo per la ricerca è stato la disponibilità di archivi per la costruzione degli alberi genealogici, andando indietro di vari secoli, e che consentisse di valutare la presenza di un alto grado di endogamia (matrimoni contratti all'interno della popolazione del paese) fino ad oggi.

Ogni specialità medica afferente al progetto ha il fine ultimo di effettuare, per la patologia presa in esame, le proprie correlazioni con il profilo genetico ottenuto mediante le analisi genetico-molecolari e con lo stile di vita dei soggetti valutati, per una migliore conoscenza della patogenesi della malattia, dei geni coinvolti e dell'influenza dei fattori ambientali.

Nel comune di Campora prescelto in base alle condizioni menzionate si è proceduto alla:

1. Ricostruzione genealogica della popolazione.

Tutti i dati storici riguardanti il paese, quali le dimensioni della popolazione, la consanguineità, la velocità di crescita nei secoli passati, l'età del comune e il numero di fondatori, sono stati utili per chiarire l'idoneità del paese e definire la metodologia da seguire.

La genealogia della popolazione di Campora a partire dalla seconda metà del XVI secolo ad oggi è stata ricostruita e resa disponibile in formato digitale.

Il pedigree include 10.737 individui (5256 femmine e 5441 maschi) distribuiti in 15-17 generazioni.

Dall'analisi dei documenti delle parrocchie e degli archivi della Curia di Vallo della Lucania si è risaliti fino ad una

pestilenza verificatasi nel 1656 a Campora che ha decimato la popolazione e costituito il cosiddetto “effetto collo di bottiglia” che ha fortemente ristretto il numero di individui; è stato calcolato che l’attuale popolazione di Campora (600 individui) derivi dunque da circa 20 coppie di soggetti, e questo è stato verificato attraverso l’analisi computerizzata del pedigree dell’aplotipo sul cromosoma Y e dell’mtDNA.

Attraverso le indagini condotte negli archivi comunali, è stato ricostruito un unico albero genealogico della popolazione di Campora risalendo in maniera retrograda fino al 1600.

2. Valutazione dello stato generale di salute della popolazione attuale mediante differenti esami:

- Raccolta di informazioni circa malattie personali e familiari, con particolare attenzione alla patologia cardiovascolare, diabete, malattie renali e tiroidee, terapie farmacologiche pregresse e/o attuali, abitudini di vita (alimentazione, ambiente di lavoro, fumo, alcool, etc.).
- analisi ematochimiche: albuminemia, transaminasi, GGT, azotemia, creatininemia, elettroliti sierici, glicemia, TSH, colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi, emocromo con formula.
- Valutazione del *body mass index* (BMI).

- Esami obiettivi e strumentali specialistici: cardiologici, neurologici, audiologici, oculistici, ortopedici.

3. Analisi genotipica-genome screening:

E' stato effettuato un prelievo venoso da ogni soggetto, conservato in EDTA per la successiva caratterizzazione genetica della popolazione attraverso uno studio di linkage disequilibrium, per il quale sono stati utilizzati circa 1094 microsatelliti (STRs markers) che coprono una distanza sul genoma di 3,4 cM.

4. La nostra partecipazione al progetto di studio multidisciplinare dell'isolato genetico è stata volta all'inserimento, nell'ambito delle indagini genetiche e cliniche previste, di un accurato protocollo diagnostico audiologico mirato ad accertare la tipologia, la gravità e l'incidenza della ipoacusia nella popolazione oggetto dell'indagine, sia riguardo alle forme eredo-familiari, sia per quelle non mendeliane.

E' la prima volta in Italia e a livello internazionale che le metodiche proprie dell'audiologia, vengono associate ai protocolli clinici e biologici di solito eseguiti per la valutazione delle popolazioni degli isolati genetici.

SCOPO

Lo scopo dello studio delle popolazioni dell'isolato genetico è quello di costituire una mappa genetica dei geni responsabili dei tratti complessi ed effettuare una correlazione genotipo-fenotipo.

Una prima fase del progetto consiste nella caratterizzazione della struttura genetica della popolazione e nella verifica dei requisiti per essere considerata isolata.

In una seconda fase si è proceduto alla raccolta dei dati relativi:

- Al fenotipo degli individui: stato generale della popolazione valutato attraverso indagini anamnestiche, biochimiche e strumentali per ogni specialità medica coinvolta nel progetto.

- Genotipizzazione dei soggetti al fine di correlare i dati fenotipici a quelli genotipici.

Lo scopo della nostra ricerca specialistica è stato quello di esaminare, attraverso un preciso protocollo di indagini audiologiche, l'incidenza e le caratteristiche dell'ipoacusia nella popolazione di un isolato genetico del Cilento, Campora, di chiarirne mediante studio degli archivi comunali l'eventuale modalità di trasmissione eredo-familiare, e di inserire i dati concernenti questa patologia nell'insieme dei dati clinici e genetici ottenuti per le altre patologie studiate nel progetto, per costituire una sorta di mappa genetica delle condizioni morbose prese in esame e potere successivamente effettuare analisi

di correlazione tra il genotipo individuato, il fenotipo espresso e lo stile di vita.

La possibilità di avere alla fine della ricerca un unico archivio integrato nel quale accanto ai vari dati clinici ed anagrafici siano contemplati anche i risultati delle prove audiometriche, fornirà un utile strumento per la correlazione con le analisi di linkage e dunque per la possibilità di individuare eventuali geni implicati nella patogenesi dell'ipoacusia, sia per quanto riguarda le forme a trasmissione familiare, sia per quanto concerne le ipoacusie in cui è riconosciuta una qualche suscettibilità genetica (es. presbiacusia, ototossicità).

In relazione alla possibilità offerta dallo studio delle popolazioni dell'isolato genetico di avere un campione ampio, omogeneo in cui i dati clinici sono stati

attentamente valutati, abbiamo ritenuto inoltre utile impiegare in maniera sperimentale la metodica dell'audiometria ad alte frequenze che è attualmente una tecnica non ancora adeguatamente standardizzata e sulla cui applicazione clinica non sono presentati in letteratura molti dati ^{17,18}.

MATERIALI E METODI

Sono stati valutati per lo studio 331 abitanti del comune di Campora di cui 152 maschi e 179 femmine con un età media di 56,2 anni.

Tutti i soggetti esaminati sono stati sottoposti ad una visita audiologica che mirava ad un accurato esame obiettivo e ad un'attenta anamnesi patologica personale e familiare, prossima e remota, al fine di valutare lo stato di salute generale dei soggetti e poter individuare alcune presumibili cause di ipoacusia (ototossicità, esposizione a rumore ambientale e lavorativo, ipossia peri e post natale, traumi cranici, infezioni batteriche e virali), in modo da creare un *database* clinico-strumentale dei soggetti

esaminati e poter successivamente selezionare gruppi omogenei di ipoacusici e normoacusici.

L'indagine strumentale audiologica è stata articolata in due fasi; nella prima sono stati effettuati i test base necessari per determinare il grado della funzionalità uditiva dei soggetti esaminati; nella seconda si è proceduto all'esame degli individui che nella prima fase manifestavano particolari problematiche cliniche risolvibili con terapia medica (es. otiti catarrali) ovvero necessitavano d'indagini più approfondite e specifiche.

I test audiometrici eseguiti sono stati i seguenti:

- 1- *Audiometria tonale multifrequenziale* per via aerea ed ossea nel range 125 Hz – 20.000 Hz, con cuffia Sennheiser HDA 200;
- 2- *Impedenzometria*;

3 - *Misura del riflesso stapediale ipsi e controlaterale alle frequenze di 500, 1000, 2000 e 4000 Hz;*

4 - *Misura dei prodotti di distorsione (DPOAE) mediante la tecnica delle otoemissioni acustiche;*

5 - *Potenziali evocati acustici al tronco (ABR).*

Per l'esecuzione dell'audiometria ad alte frequenze è stato utilizzato un audiometro clinico Amplaid 319 con trasduttore a cuffia tipo Sennheiser HDA 200.

Gli esami sono stati condotti in cabina insonorizzata; è stata effettuata la calibrazione delle apparecchiature prima, durante e dopo lo studio, secondo le normative ANSI ¹⁹ e per le cuffie circumaurali calibrazione con accoppiatore secondo le specifiche IEC 318. E' stato effettuato l'esame test-retest a distanza minima di quattro

ore tra le sessioni per verificarne l'attendibilità ed escludere un'eccessiva variabilità intraindividuale.

L'impedenzometria è stata eseguita mediante impedenzometro Amplaid 728.

I prodotti di distorsione DPOAE sono stati valutati per le frequenze di 1000, 2000, 3000, 4000, 6000 e 8000 Hz utilizzando stimoli tonali F1 di 70 dB e F2 di 75 dB mediante un sistema ILO; le frequenze di 250 e 500 Hz non sono state valutate per una rumorosità ambientale che rendeva l'esame in questione poco affidabile.

Al fine di dirimere eventuali dubbi diagnostici in alcuni soggetti sono stati valutati anche i potenziali acustici evocati al tronco (ABR) mediante un sistema Amplaid MK22.

RISULTATI

Sono stati esaminati 331 individui di cui 152 maschi e 179 femmine con un età media di $56,2 \pm 22,5$ anni . Le figure 1e 2 mostrano la distribuzione per sesso ed età della popolazione di Campora, in cui è stata osservata una prevalenza di soggetti anziani e di sesso femminile.

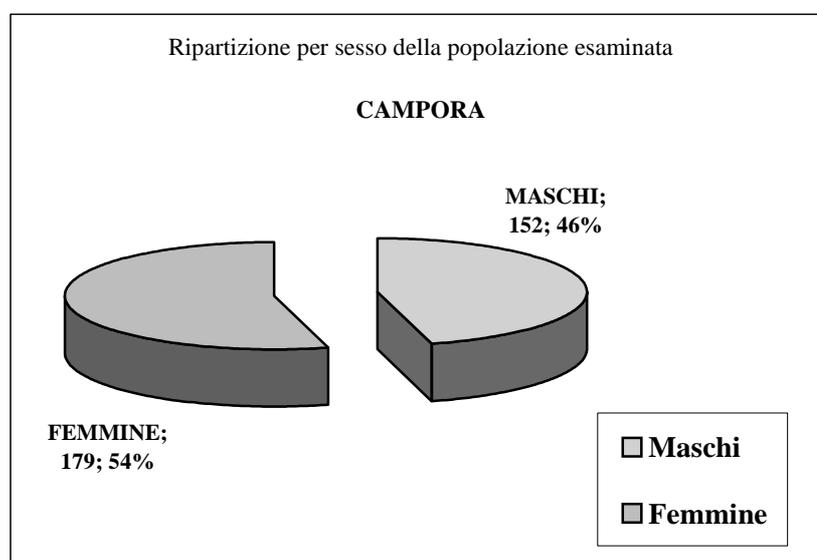


Fig. 1: Ripartizione per sesso della popolazione

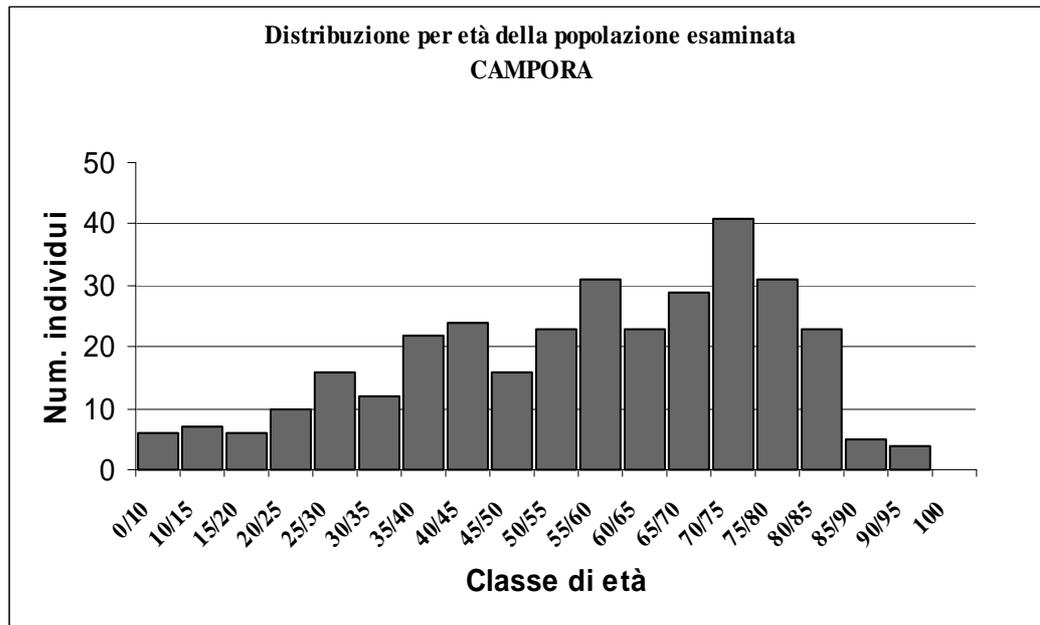


Fig. 2: distribuzione per età del campione

Gli esami audiologici sono stati effettuati in cabina insonorizzata secondo le procedure descritte nel capitolo dei materiali e metodi.

Dall'analisi degli esami audiometrici praticati con metodica convenzionale è stata evidenziata una percentuale pari al 16% (55 casi) di soggetti normoudenti e del 83% di ipoacusici (276 pazienti); abbiamo sorprendentemente riscontrato come in una percentuale (10%) di soggetti compresi in una fascia di età tra i 40 e 50 anni vi fosse già un certo grado di compromissione uditiva (>25 dB).

Per quanto concerne il tipo di ipoacusia l'1,1% presentava una perdita uditiva di tipo misto mentre il resto dei

soggetti risultati ipoacusici mostrava un tracciato di tipo neurosensoriale (fig. 3,4).

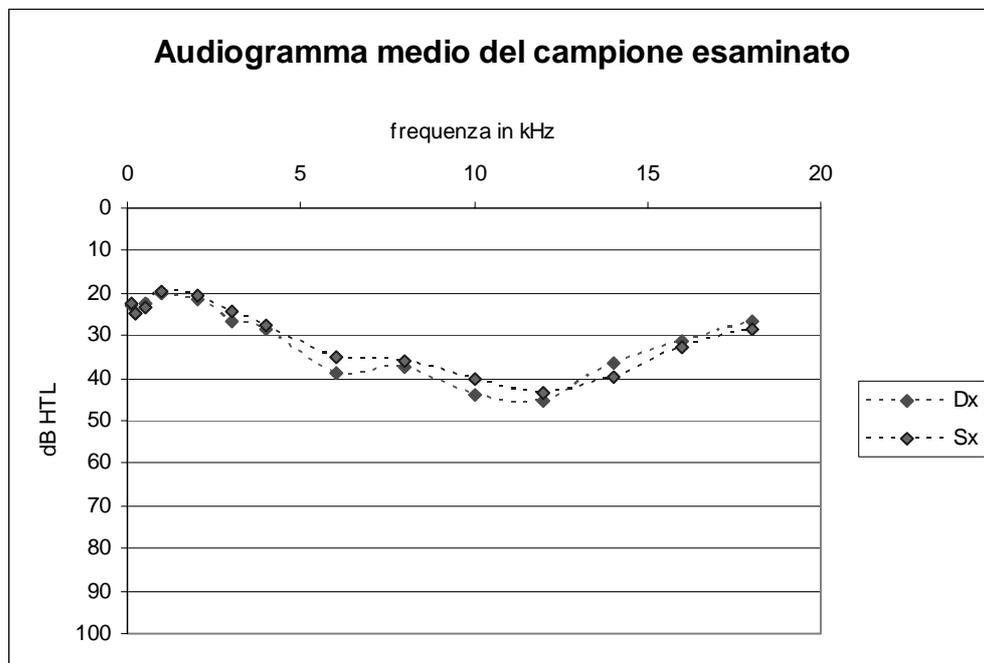


Fig. 3: il grafico riporta l'audiogramma medio del campione esaminato per le frequenze comprese tra 125 e 18000 Hz.

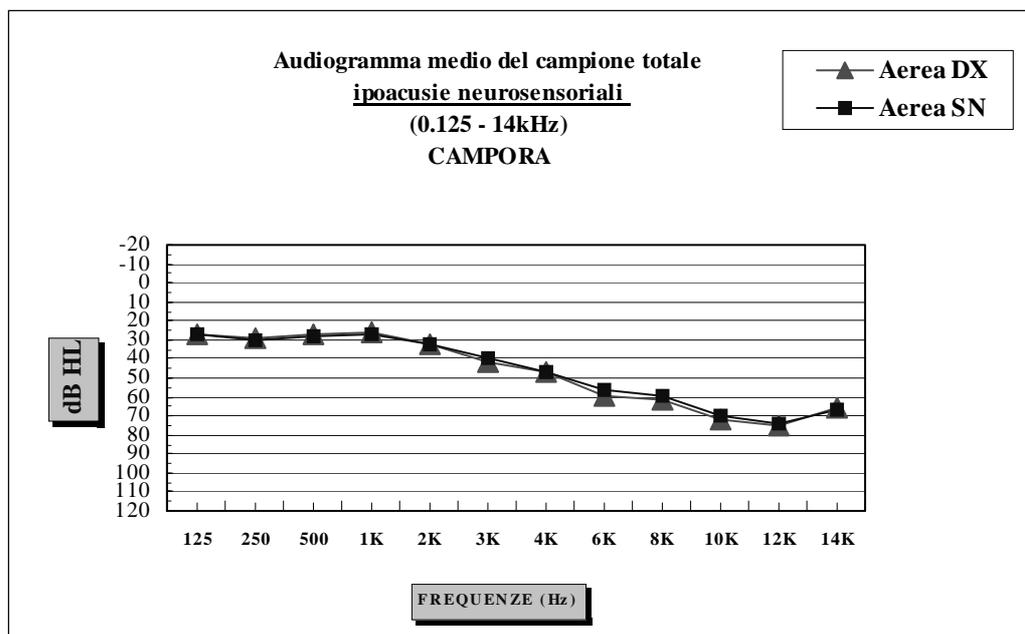


Figura 4: - Audiogramma medio dei soggetti con ipoacusia neurosensoriale

Riguardo alla metodica audiometrica ad alte frequenze da noi impiegata abbiamo rilevato che:

- la soglia uditiva media per ogni frequenza testata è simile a quella riportata nella ISO 1998. Abbiamo riscontrato tuttavia un'ampia deviazione standard e distribuzione di soglia che indicano una alta variabilità interindividuale, specialmente alle frequenze di 14 e 16 kHz che tendeva ad aumentare con l'età del campione e le frequenze testate.
- Le soglie uditive alle alte frequenze non differiscono in base al sesso, all'orecchio testato o alla sessione d'esame, mentre sembrano aumentare con l'età del campione.

- Le soglie medie ad alte frequenze sono risultate simili nell' esame test-retest; la ripetitività è stata determinata confrontando le differenze di soglia per un campione di individui (80) tra due sessioni di esame a distanza minima di quattro ore: abbiamo verificato in circa il 96% di essi differenze di soglia minime, nel range di $\pm 10\text{dB}$ per le frequenze comprese tra 8 e 14 kHz. Questo dato testimonia la correttezza dell'esecuzione dell'esame e la scarsa variabilità intraindividuale e dunque falsi positivi per tale tipo di audiometria multifrequenziale.
- La valutazione dei tracciati audiometrici ci ha portato ad osservare come una certa percentuale (34% - 19 casi) di soggetti classificati come normoudenti sulla base dell'audiogramma con

frequenza massima di 8000 Hz, (audiometria tonale convenzionale) presentavano invece alla stimolazione delle alte frequenze una perdita uditiva più accentuata per le frequenze di 10.000 e 12.000 Hz. (in media 35dB); la curva audiometrica migliorava poi per le frequenze superiori a 14.000.

Le figure 5 e 6 mostrano alcuni esempi di audiogrammi di soggetti che presentavano un tracciato audiometrico nella norma fino alla frequenza di 8000 Hz ed una perdita uditiva sulle frequenze più alte. Nella figura 7 è riportato l'audiogramma medio dei soggetti considerati normoacusici secondo l'audiometria convenzionale ed ipoacusici in quella ad alte frequenze. Gli istogrammi rappresentati nelle figure 8 e 9

mostrano la distribuzione dei soggetti ipoacusici in relazione all'età ed in relazione alle frequenze del campo tonale considerate, ed evidenziano la riduzione percentuale del numero di soggetti considerati come normoacusici con l'audiometria convenzionale che vengono rivalutati come ipoacusici con l'esame ad alte frequenze.

- Dal confronto di questo ultimo dato con i rilievi clinico-anamnestici abbiamo rilevato come il 40% di questi soggetti è risultato essere stato esposto a rumore, mentre il 5% a sostanze ototossiche (in particolare chemioterapici, aminoglicosidi).

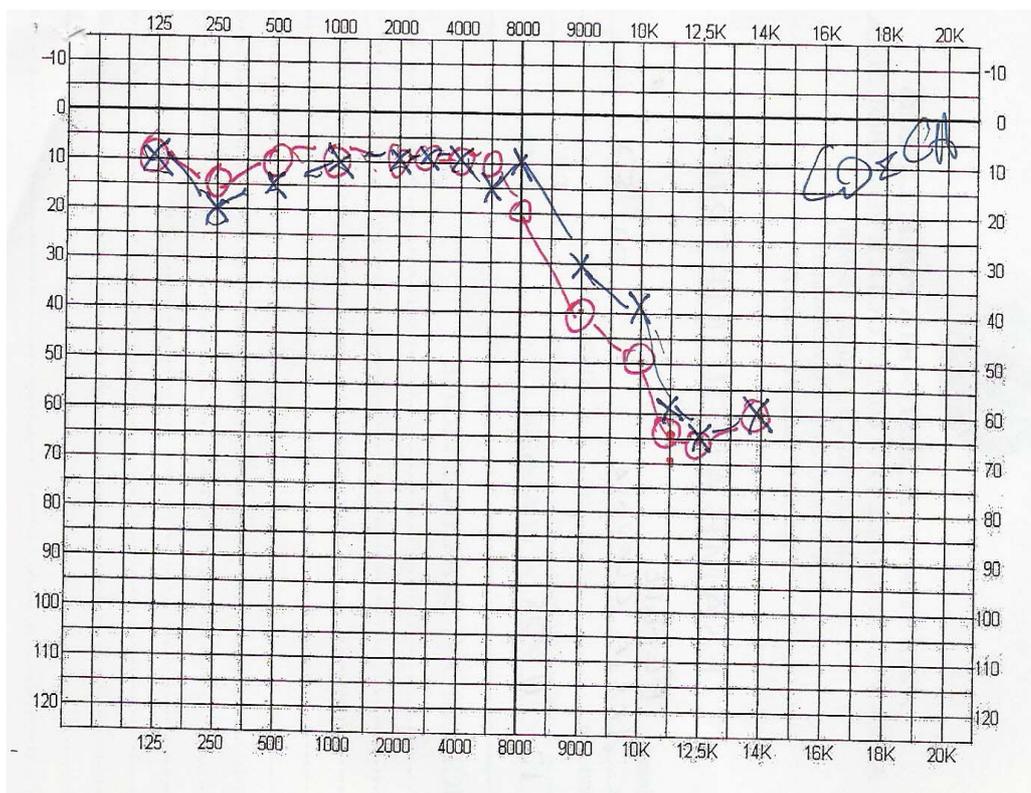


Fig. 5: F. M.C. : l'audiogramma mostra valori normali di capacità uditiva fino alle frequenze di 8000 Hz, e caduta per le frequenze da 9000 a 14000 Hz.

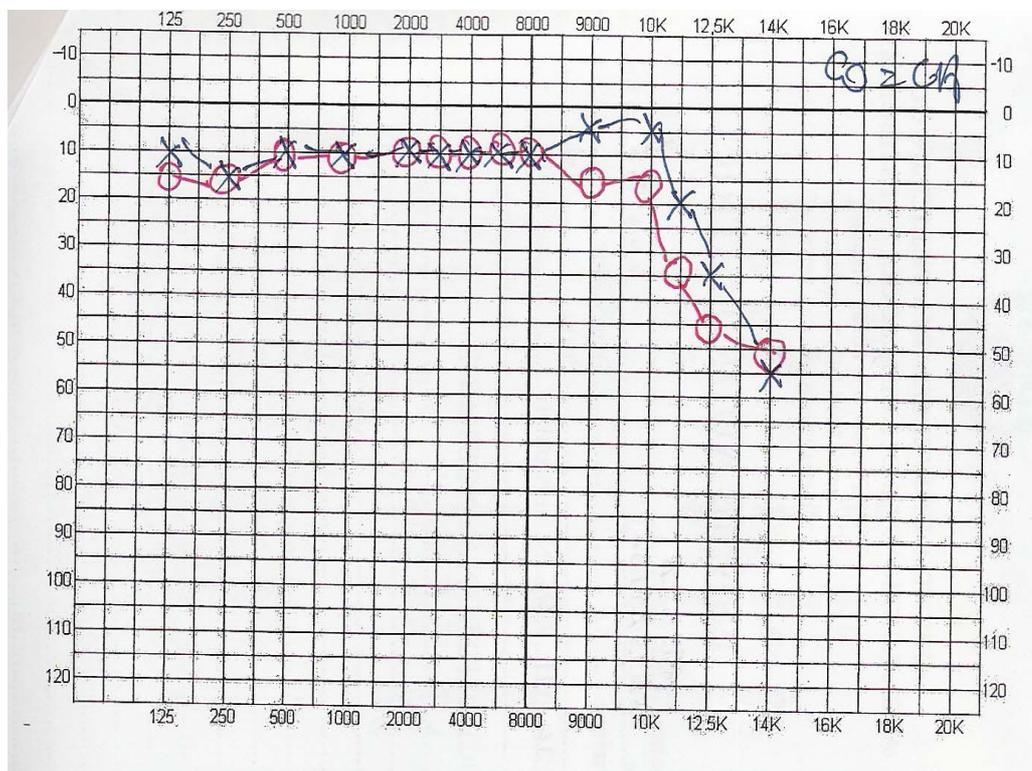


Fig. 6: F. S. : l'audiogramma mostra la perdita uditiva rilevata alle alte frequenze e la normoacusia fino alla frequenza convenzionale di 8000 Hz

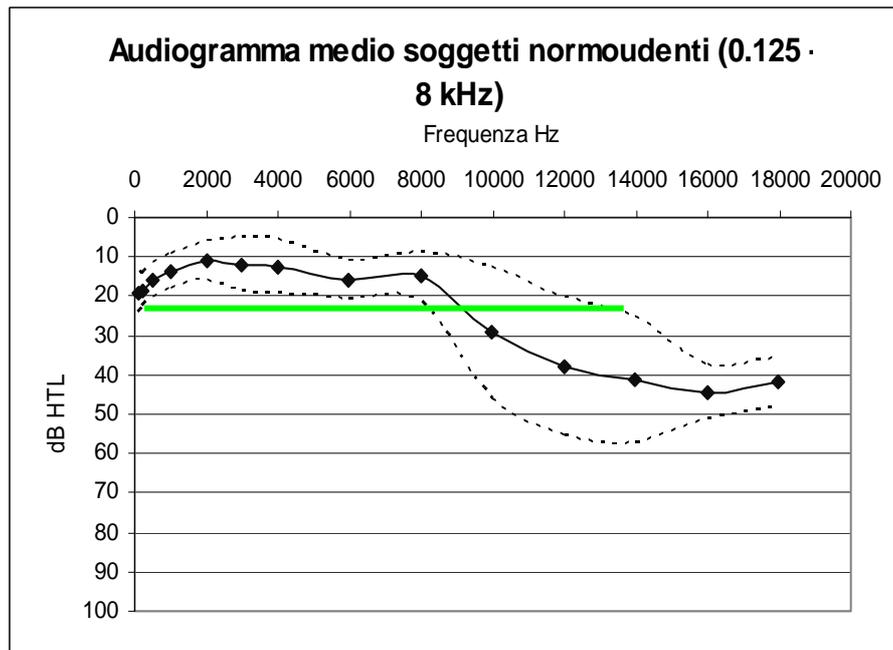


Fig. 7 : audiogramma medio dei soggetti normoudenti: si nota come in questi individui che sono considerati come normoudenti alle frequenze convenzionali (fino 8000Hz), si rilevi invece una perdita uditiva con le alte frequenze.

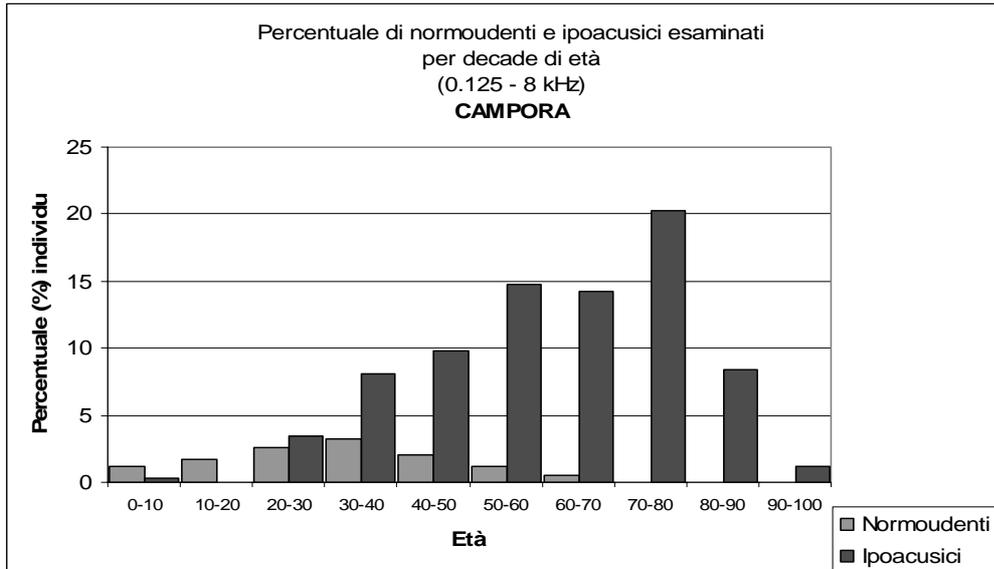


Fig.8 : - Percentuale di normoudenti ed ipoacusici esaminati per decade di età nel range 125 – 8 kHz; si nota una prevalenza dei soggetti ipoacusici già nelle classi di età 30 – 40 anni

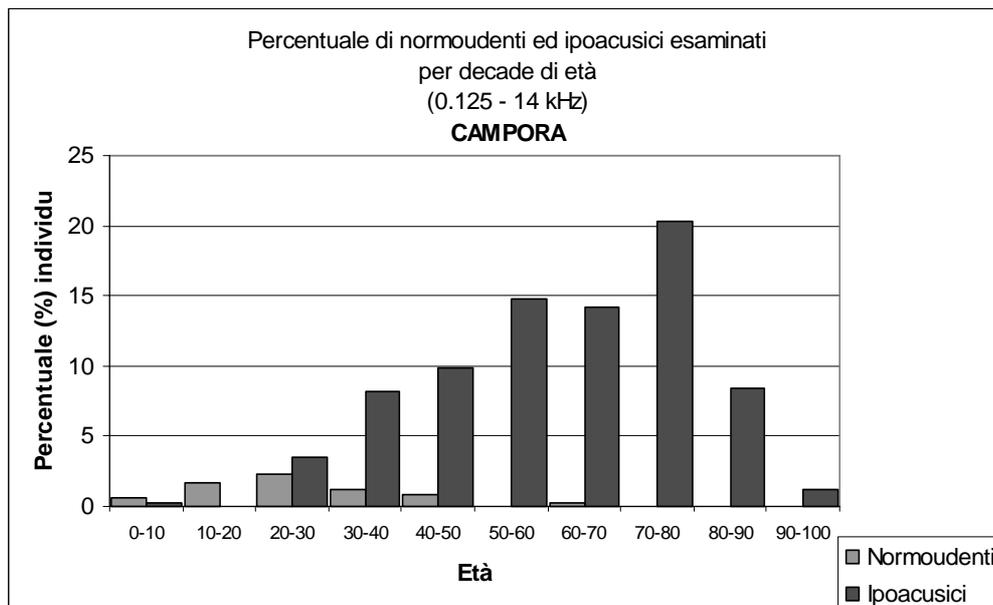


Fig. 9: Percentuale di ipoacusici e normoudenti per range di età valutati per le frequenze 125-14000 Hz: si evince una riduzione del numero di soggetti classificati come normoudenti

Dalla valutazione dei dati ottenuti con l'audiometria ad alte frequenze e dall'esame delle abitudini di vita e lavorative dei soggetti abbiamo osservato dunque come tale tecnica possa essere utile per individuare i soggetti che, in base all'audiogramma convenzionale fino ad 8000 Hz risultano normoacusici, e tuttavia presentano un'iniziale compromissione dell'orecchio interno testimoniata dal deficit uditivo sulle alte frequenze i cui recettori acustici sono posti al giro basale della chiocciola e sono i primi ad essere interessati da eventi otolesivi.

- L'analisi statistica mostra un discreto grado di correlazione tra i valori delle soglie audiometriche relative alle frequenze di 1000, 12000 e 14000 Hz con quelle a 4000 e 8000 Hz nei soggetti

normoudenti e tra i 16000 Hz e 4000-6000 Hz per gli ipoacusici (fig.10).

Soggetti normoudenti														
kHz	0,125	0,25	0,5	1	2	3	4	6	8	10	12,5	14	16	18
0,125	1,00													
0,25	0,85	1,00												
0,5	0,88	0,87	1,00											
1	0,72	0,88	0,68	1,00										
2	0,78	0,66	0,55	0,81	1,00									
3	0,54	0,56	0,52	0,73	0,75	1,00								
4	0,82	0,76	0,72	0,79	0,86	0,87	1,00							
6	0,47	0,67	0,46	0,82	0,73	0,81	0,73	1,00						
8	0,68	0,69	0,57	0,87	0,87	0,90	0,91	0,75	1,00					
10	0,69	0,78	0,71	0,89	0,80	0,92	0,92	0,82	0,94	1,00				
12,5	0,76	0,85	0,74	0,95	0,85	0,87	0,91	0,88	0,93	0,96	1,00			
14	0,53	0,35	0,53	-0,18	0,20	0,42	0,67	0,26	0,08	0,53	0,61	1,00		
16	0,20	0,16	0,20	-0,08	0,19	0,41	0,49	0,59	0,04	0,41	0,69	0,83	1,00	
18	-0,18	-0,41	-0,26	-0,37	0,22	0,57	0,32	0,51	0,00	0,06	0,20	0,36	0,71	1,00

Soggetti ipoacusici														
kHz	0,125	0,25	0,5	1	2	3	4	6	8	10	12,5	14	16	18
0,125	1,00													
0,25	0,39	1,00												
0,5	0,46	0,37	1,00											
1	0,60	0,41	0,19	1,00										
2	0,40	0,23	0,23	0,82	1,00									
3	0,53	0,24	0,39	0,87	0,94	1,00								
4	0,47	0,19	0,27	0,82	0,93	0,95	1,00							
6	0,67	0,54	0,59	0,81	0,80	0,90	0,88	1,00						
8	0,64	0,39	0,72	0,65	0,63	0,81	0,78	0,93	1,00					
10	0,81	0,53	0,74	0,65	0,39	0,57	0,47	0,75	0,80	1,00				
12,5	0,82	0,61	0,75	0,70	0,50	0,65	0,52	0,82	0,79	0,95	1,00			
14	0,81	0,76	0,68	0,61	0,40	0,55	0,43	0,79	0,75	0,86	0,94	1,00		
16	0,67	0,71	0,78	0,77	0,76	0,84	0,91	0,92	0,86	0,59	0,80	0,87	1,00	
18	0,38	0,00	0,00	0,43	0,63	0,31	0,17	0,00	0,12	0,55	0,25	0,10	-0,32	1,00

Fig. 10: correlazioni tra le frequenze testate

Riguardo allo screening genetico, è in corso l'analisi di linkage sull'intera popolazione.

Per quanto concerne le forme eredo-familiari abbiamo sinora individuato attraverso la valutazione degli alberi genealogici due grosse famiglie in cui è presente una elevata incidenza del carattere ipoacusico (fig. 11 e 12). Sono in corso le caratterizzazioni genetiche dei soggetti; l'analisi di linkage effettuata utilizzando 1034 microsatelliti come marcatori, sembra rilevare per una delle due famiglie una associazione con un locus genetico situato sul cromosoma 1 e per l'altra sul cromosoma 15. Tali dati devono essere tuttavia ancora completati; sarà tuttavia importante individuare in questi loci la possibilità di associazione tra geni specifici ed ipoacusia, e la

correlazione con i dati anamnestici, quali epoca di insorgenza, esposizione al rumore etc..

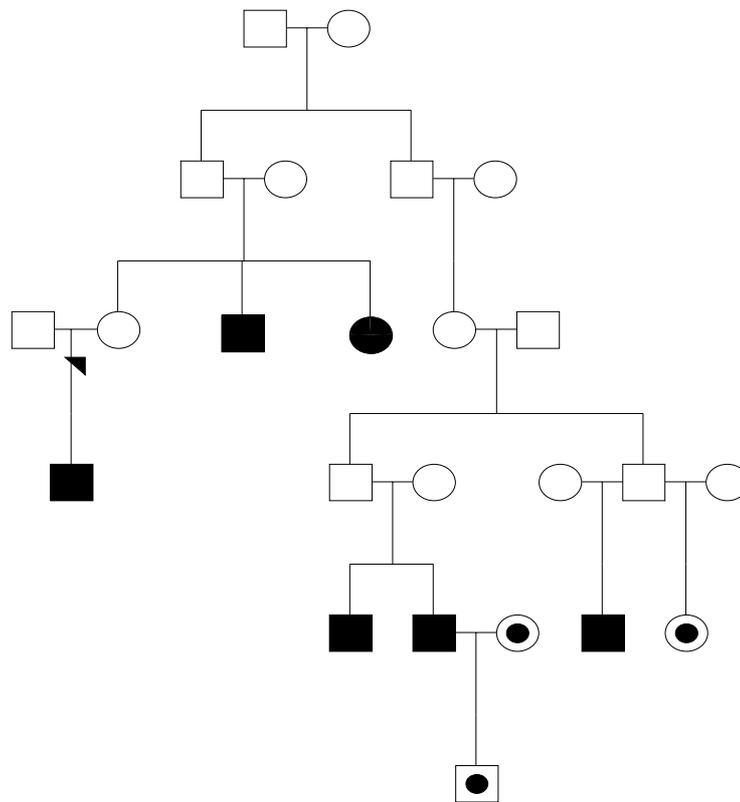


Fig 11: famiglia 1: sono rappresentati i soggetti affetti da ipoacusia neurosensoriale bilaterale ■ e monolaterale ●

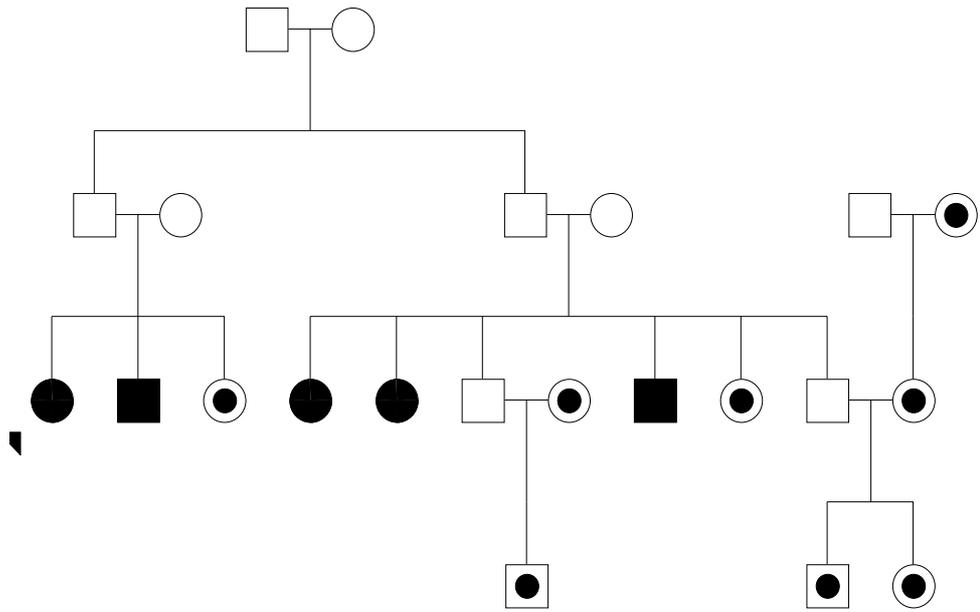


Fig. 12: famiglia 2: sono rappresentati i soggetti affetti da ipoacusia neurosensoriale bilaterale ■ e monolaterale ◐

DISCUSSIONE

Le patologie multifattoriali quali ad esempio neoplasie, diabete, ipertensione, ipoacusia, rappresentano le condizioni morbose più frequenti e la causa maggiore di mortalità e di handicap sociale delle società industrializzate, alla cui patogenesi concorrono sia fattori genetici legati ad alterazione di un gene o di un gruppo di geni, sia ambientali inclusi quelli relativi allo stile di vita ed all'alimentazione.

A differenza delle malattie monogeniche, nelle quali l'alterazione di un singolo gene è facilmente associabile alla manifestazione clinica, nelle patologie multifattoriali vi sono diversi geni di predisposizione che conferiscono

una sorta di “susceptibilità genetica” per un determinato fenotipo che, dunque è il risultato dell’interazione tra questi geni e fattori ambientali.

La ricerca genetica sta recentemente puntando l’attenzione sull’utilizzo degli isolati genetici, ovvero di siti in cui gli individui si trovano da più generazioni in una condizione di isolamento geografico e culturale tale da aver acquisito un patrimonio genetico omogeneo.

Studi svolti in tal senso hanno ad esempio consentito di utilizzare gli isolati per mappare geni responsabili di malattie mendeliane recessive, che hanno in questi luoghi una più elevata incidenza dovuta alla presenza di incroci casuali: ad esempio una forma di atassia cerebellare recessiva²⁰, la sordità recessiva non sindromica legata ad alterazioni del gene della connessina 26^{21,22}.

Recentemente si è prospettato l'utilizzo di popolazioni isolate anche nello studio di malattie complesse, in cui vi sia una suscettibilità genetica ed influenza di fattori ambientali; a tale gruppo di patologie appartengono anche alcune forme di ipoacusia (es. presbiacusia, danno da rumore, ovvero da ototossici).

Affinché una popolazione isolata possa essere utilizzata in studi di mappaggio genetico è necessario poter ricostruire la sua storia demografica, conoscere il numero esatto dei fondatori e l'estensione e la durata dell'isolamento; l'utilità genetica di queste popolazioni infatti risiede nella possibilità di ottenere dati circa famiglie multigenerazionali che discendono principalmente da un piccolo numero di fondatori ²³.

Nei luoghi prescelti per questo tipo di studi gli individui isolati geograficamente e culturalmente da centinaia di anni, condividono lo stesso stile di vita, l'ambiente naturale e l'alimentazione; risulta così più agevole il riconoscimento del ruolo della variabilità ambientale (abitudini alimentari e comportamentali) sul fenotipo studiato, consentendo conseguentemente l'identificazione dei fattori di rischio genetici.

L'inincrocio e l'effetto fondatore hanno ridotto in queste popolazioni la variabilità genetica; gli isolati inoltre presentano lunghe regioni di linkage disequilibrium grazie ai numerosi eventi meiotici che si sono verificati nei cromosomi fondatori ²⁴.

Un isolato genetico, rappresentato dunque da un sito in cui la popolazione, a causa dell'isolamento geografico e

della scarsa immigrazione, ha conservato nel corso dei secoli caratteri genetici più omogenei rispetto ad altre popolazioni “aperte”, presenta un’elevata omogeneità che permette di identificare varianti genetiche associate a particolari tratti somatici (es. calvizie, altezza, tendenza all’obesità) o clinici (diabete, allergie, asma).

L’obiettivo del progetto “Isolato Genetico” è quello di scoprire alcuni geni determinanti per malattie comuni, nel nostro studio l’ipoacusia. La conoscenza di questi geni, il confronto con le variabili ambientali e lo stile di vita permetterà dunque una migliore comprensione della patogenesi della malattia, una identificazione precoce delle persone suscettibili, in modo da poter intervenire sui fattori ambientali che possono scatenarle.

Il nostro studio è stato condotto nell'ambito del progetto multidisciplinare per la valutazione delle popolazioni isolate del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano, promosso dalla Prof.ssa G. Persico dell'Istituto di Genetica e Biofisica "Adriano Buzzati-Traverso" del CNR di Napoli e dal Prof. P. Gasparini del Dipartimento di Patologia, della II Università di Napoli. Il comune prescelto in base alle indagini archiviali e geografiche che ne hanno documentato l'isolamento e la scarsa immigrazione, un ristretto numero di fondatori (20 coppie) ed un'elevato grado di endogamia è stato Campora (Sa). In tale isolato è stata effettuata una raccolta di dati circa lo stato di salute generale e lo stile di vita degli individui, compreso alimentazione e abitudini

voluttuarie, indagini biochimiche e strumentali specialistiche (cardiologi, audiologi, oculisti, neurologi)

Per quanto concerne il nostro impegno di ricerca nell'ambito di questo progetto multidisciplinare abbiamo condotto su un campione di 331 abitanti di questo comune cilentano precise indagini cliniche (anamnesi patologica prossima e remota, stato di salute generale, abitudini di vita) e strumentali: audiometria convenzionale e ad alte frequenze, impedenzometria, DPOAE, ABR.

Abbiamo valutato la capacità uditiva mediante l'audiometria convenzionale evidenziando un'alta incidenza di ipoacusia neurosensoriale, compatibile con un campione di screening costituito prevalentemente da soggetti anziani; abbiamo tuttavia rilevato una percentuale elevata di soggetti classificati come presbiacusici

(ipoacusia neurosensoriale bilaterale da senescenza dell'organo dell'udito, non esposti a rumore) anche nelle fasce d'età comprese tra i 40 e 50 anni.

Questo dato ci è sembrato significativo, in relazione al vantaggio di avere come campione di individui omogeneo e che condivide le stesse abitudini di vita. Il riscontro di questa popolazione di ipoacusici in età giovanile ci consentirà attraverso il confronto con la caratterizzazione genetica e lo stile di vita di individuare i geni coinvolti nella “predisposizione” alla manifestazione della senescenza dell'organo dell'udito^{25,26}.

La nostra ricerca si è inoltre incentrata sui risultati ottenuti dall'impiego della audiometria ad alte frequenze nella popolazione Campora.

L'audiometria a frequenze elevate (o multifrequenziale) prevede la determinazione della soglia tonale per quella porzione del campo uditivo posta al di sopra degli 8000 Hz. che è normalmente esplorata dall'audiometria convenzionale. L'orecchio umano è in grado di percepire suoni compresi in un campo di frequenza tra i 20 ed i 20000 Hz..

Per una determinata frequenza (“frequenza caratteristica”) risponde in maniera ottimale e con intensità liminare solo un gruppo di cellule uditive; questo avviene perché:

- Le caratteristiche vibratorie della membrana basilare sono diverse a seconda della sede cocleare, in dipendenza da un aumento in massa e spessore ed una riduzione della rigidità andando dai giri basali a quelli apicali della coclea.
- Le cellule ciliate presenti in ciascuna zona della coclea sono sintonizzate per frequenze di vibrazione diverse, hanno cioè differenti proprietà elettromagnetiche ovvero oscillazioni spontanee del loro potenziale di membrana diverse da zona a zona (“risonanza elettrica”).

- Selettività di frequenza; attuata mediante inibizione laterale pre e post sinaptica: a livello di ogni stazione sinaptica del campo recettoriale stimolato partono delle collaterali che vanno ad inibire le afferente provenienti dai recettori limitrofi a quello maggiormente stimolato. Tale organizzazione si mantiene per tutta la via nervosa acustica, anche a livello della corteccia cerebrale. (“organizzazione tonotopica” cocleare e centrale).

I giri basali della chiocciola sono quelli deputati alla risposta alla stimolazione sonora ad alte frequenze e sono quelli interessati precocemente dagli eventi otolesivi, quali ad esempio farmaci ototossici e danno da rumore, come dimostrato in studi sperimentali istologici su cavia

27,28,29

Nell'audiologia clinica lo studio delle frequenze elevate non ha sinora trovato una diffusa applicazione pratica; l'audiometria ad alte frequenze, a differenza della convenzionale, non è praticata in tutti i centri audiologici e risulta ancora una tecnica di difficile applicazione clinica. Una limitazione nell'esecuzione di questo tipo di esami risiede soprattutto mancanza di audiometri commerciali per le alte frequenze che abbiano diffusione come prodotto di serie. Altra difficoltà è dovuta all'accoppiamento tra la sorgente sonora e l'orecchio, poiché alle alte frequenze la posizione relativa tra la sorgente sonora e la membrana timpanica ha una notevole importanza sulla determinazione della soglia audiometria (la pressione sonora sul timpano alle alte frequenze varia sostanzialmente), e sono necessari precisi ed appositi

trasduttori. In relazione a tutto ciò a differenza dell'audiometria convenzionale si riscontra tuttoggi l'assenza di una normativa specifica per l'impiego delle alte frequenze a causa di una mancanza di standardizzazione circa la calibrazione, la strumentazione (trasduttori a cuffia o a inserto) e delle procedure metodologiche^{30,31,32}.

I lavori presenti in letteratura oltre ad essere esigui, evidenziano controversie circa il ruolo di questa metodica, specie per quanto riguarda l'individuazione della corretta percezione della parola; tuttavia alcuni autori, come Berlin³³, hanno osservato come in gruppi di bambini affetti da sordità grave la scarsa qualità del linguaggio che essi presentavano fosse altamente correlata alla conservazione dell'udito ultraaudiometrico.

Recentemente sono state presentate alcune direttive proposte grazie a studi sperimentali condotti ad esempio per il monitoraggio dell'ototossicità da antibiotici o chemioterapici: normative dell'American Speech language Hearing Association (ASHA)³⁴ e dell'International Standards Organization (ISO 389 del 1998); tali linee guida sono state negli ultimi anni sottoposte a revisioni (vedi ISO 389-5 del 2001).

L'indagine audiometrica multifrequenziale da noi praticata a Campora è stata effettuata su un campione di 331 individui.

Abbiamo riscontrato soglie uditive medie per ogni frequenza simili a quelle riportate dall'ISO 1998. L'esame test-retest per valutare la ripetibilità dell'esame e la variabilità intraindividuale è stato effettuato

confrontando le differenze di soglie in un gruppo di soggetti tra due sessioni d'esame: abbiamo verificato in circa il 96% di essi una differenza di soglia nel range di ± 10 dB per le frequenze tra gli 8 ed i 14 kHz; questo, in accordo con i dati della letteratura ³⁵ testimonia la correttezza metodologica dell'audiometria ad alte frequenze e la scarsa variabilità intraindividuale.

Le soglie uditive alle alte frequenze non differivano nel nostro campione in base al sesso, orecchio testato e sessione d'esame, mentre mostravano un aumento dei valori con l'aumentare dell'età dei soggetti.

Il dato importante che è emerso dal nostro studio è rappresentato dall'evidenza che alcuni soggetti da noi classificati come normoudenti in base all'audiometria convenzionale, hanno rivelato una perdita uditiva alle alte

frequenze (in media 30 dB). La diminuzione della capacità uditiva alle alte frequenze è dunque indice di iniziale danno cocleare. Valutando questi dati unitamente a quelli clinico-anamnestici abbiamo evidenziato come il 40% di questi soggetti fosse esposto a rumore lavorativo ed il 5% a farmaci ototossici.

Dall'analisi dei risultati da noi ottenuti su un ampio campione di soggetti si evidenzia dunque come la conoscenza del comportamento della soglia uditiva alle frequenze elevate, comprese tra 8000 e 20000 Hz può essere utile per valutare in maniera più precisa e completa le capacità funzionali dell'orecchio interno. In alcuni soggetti che all'audiometria convenzionale risultavano normoudenti infatti, con l'audiometria ad alte frequenze abbiamo evidenziato un deficit uditivo che interessava le

frequenze comprese tra 10 e 12 kHz ; in una percentuale di questi soggetti abbiamo effettuato una correlazione di questo dato con le abitudini di vita ed ambiente lavorativo, riscontrando una esposizione al rumore o a sostanze ototossiche: tutto ciò è compatibile con una sofferenza delle cellule e strutture che secondo la distribuzione tonotopica della chiocciola sono site al giro basale e che sono quelle compromesse per prime nel danno acustico di tipo neurosensoriale.

I nostri risultati circa la valutazione della soglia uditiva alle frequenze ultraudiometriche in una popolazione omogenea di soggetti rivestono dunque un notevole significato, evidenziando l'utilità dell'audiometria ad alte frequenze nella diagnosi precoce della patologia

dell'orecchio interno ad eziologia dismetabolica o da rumore.

Il confronto dei dati da noi ottenuti con l'audiometria ad alte frequenze con i dati clinici ed anamnestici, ci ha consentito di individuare precocemente individui affetti da iniziale compromissione della funzione cocleare e di chiarire l'influenza del danno da rumore e delle sostanze ototossiche (aminoglicosidi, chemioterapici etc.) in questi soggetti. L'indagine bio-molecolare ci darà la possibilità in un successivo step della ricerca di correlare questo dato ad una precisa suscettibilità genetica: l'analisi effettuata attraverso la metodica del linkage disequilibrium su tutti gli abitanti di Campora ci permetterà di valutare attraverso studi di correlazione se esista ad esempio una predisposizione genetica nei soggetti che, nel campione da

noi valutato, sono divenuti presbiacusici in età precoce (40-50 anni) in un ambiente in cui la socioacusia è estremamente ridotta, quali siano i geni che possono conferire al soggetto una suscettibilità maggiore che nel soggetto normale al danno acustico ed all'invecchiamento dell'organo dell'udito; potrà essere inoltre valutato mediante le tecniche genetiche se il nostro campione di soggetti normoudenti all'audiometria convenzionale ed ipoacusici a quella ad alte frequenze risultati esposti a sostanze ototossiche, possieda un preciso pattern genetico responsabile della sensibilità delle cellule acustiche al farmaco, come suggerito da recenti studi circa le anomalie del DNA mitocondriale ¹⁴.

Riguardo alle forme trasmesse in maniera ereditaria i risultati preliminari delle analisi genetiche di linkage che

abbiamo ottenuto attraverso l'individuazione di due famiglie in cui vi era una elevata incidenza del tratto ipoacusico, sembrano consentire una associazione con due loci genetici siti sul cromosoma 1 e 15, che andranno successivamente meglio caratterizzati.

CONCLUSIONI

La ricerca effettuata si inserisce nell'ambito del progetto multidisciplinare per lo studio delle popolazioni isolate del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano; lo scopo del lavoro è stato quello di valutare, attraverso precise indagini audiologiche, l'incidenza e le caratteristiche dell'ipoacusia nella popolazione di un isolato genetico del Cilento, Campora, di chiarirne mediante studio degli archivi comunali l'eventuale modalità di trasmissione eredo-familiare, di inserire i dati concernenti questa patologia nell'insieme dei dati clinici e genetici ottenuti per le altre patologie studiate nel progetto e costituire una sorta di mappa genetica per tutte le

condizioni morbose prese in esame e di potere effettuare analisi di correlazione tra il genotipo individuato, il fenotipo espresso e lo stile di vita.

Lo studio da noi effettuato ha consentito di evidenziare inoltre l'utilità dell'impiego dell'audiometria multifrequenziale, specie nella diagnosi precoce della patologia dell'orecchio interno ad etiologia dismetabolica ototossica o da rumore industriale, prima ancora che venga ad essere danneggiato il campo uditivo valutato con l'audiometria convenzionale; questo consentirà di poter intervenire con misure profilattiche che intervengano sui fattori ambientali e che impediscano l'estensione del danno anche alle frequenze audiometriche convenzionali.

I dati dell'analisi genetica, ancora preliminari sono serviti ad individuare due loci genetici in due distinte famiglie in cui il carattere ipoacusico era trasmesso in maniera ereditaria; le successive analisi chiariranno il ruolo degli eventuali geni coinvolti in questo tipo di sordità.

L'insieme di dati raccolti sulla capacità uditiva della popolazione di Campora, sullo stato di salute generale, le abitudini di vita, unitamente alla valutazione genetica mediante l'analisi di linkage consentirà di effettuare correlazioni genotipo-fenotipo che chiariscano l'influenza genetica nella suscettibilità ad esempio all'invecchiamento dell'organo dell'udito, al danno da rumore o da sostanze ototossiche, e di valutare inoltre quale sia il ruolo svolto dai fattori ambientali.

BIBLIOGRAFIA

1. Toth T, Kupka S, Haack B et al. GJB2 mutations in patients with Non-Syndromic hearing loss from northeastern Hungary. *Human Mutat.* Jun; 23(6):631-2, 2004
2. Migliosi V: Le ultime novità sulla genetica delle sordità. *Comunicare.* 1, 31-35, 2000
3. Kenna MA, Wu BL, Cotanche DA et al. Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*; 127: 1037-1042, 2001
4. Roest Crollius H, Jaillon O, Bernot A et al. Estimate of human gene number provided by genome-wide analysis using tetraodon nigroviridis DNA sequence. *Nat. Genet* 25: 235-238, 2000
5. Nance WE and the newborn hearing subcommittee of the public health genetics committee. (2000) Statement of the American College of Medical Genetics on universal newborn hearing screening. *Genetics in Medicine* 2:149-150 [also available at American College of Medical Genetics Home Page, <http://www.faseb.org/genetics/acmg/>].

6. Van Camp G, Smith RJH. Hereditary hearing loss home page. <http://www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>. Accessed July 1, 2002
7. Morton NE. - Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 630:16-31, 1991
8. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, et al. () - High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet* 8:19-23, 2000.
9. Martini A, Mazzoli M, Stephens D, Read A. Definitions, protocols and Guidelines in genetic Hearing impairment. Whurr Publishers, London 2001
10. Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. - Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum Mutat* 16:190-202. 2000
11. DeStefano AL, Gates GA, Heard-Costa N, Myers RH, Baldwin CT. Genomewide linkage analysis to presbycusis in the Framingham Heart Study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003 Mar;129(3):285-9.
12. Cacciatore F., Napoli C., Abete P., Marciano E., Ferrara N., Rengo F. Quality of Determinations and hearing function in an elderly population. Osservatorio geriatrico campano study group - *Gerontology* – vol.45(6), pp.323-328.

13. Erway LC, Shiau YW, Davis RR, Krieg EF. Genetics of age-related hearing loss in mice. III. Susceptibility of inbred and F1 hybrid strains to noise-induced hearing loss. *Hear Res.* 1996 Apr;93(1-2):181-7.
14. Gurtler N, Schmuziger N, Kim Y, Mhatre AN, Jungi M, Lalwani AK. Audiologic testing and molecular analysis of 12S rRNA in patients receiving aminoglycosides. *Laryngoscope.* 2005, Apr;115(4):640-4.
15. Estivill X, Govea N, Barcelo E et al. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am J Hum Genet.* 1998 Jan;62(1):27-35.
16. Tang HY, Hutcheson E, Neill S, Drummond-Borg M, Speer M, Alford RL. Genetic susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: how many are at risk. *Genet Med.* 2002 Sep-Oct;4(5):336-45.
17. Abramowich S.J. Auditory perception of ultrasound in patients with sensorineural and conductive hearing loss. *J Laryngol Otol;* 92:861-867, 1978
18. Lenhardt ML, Skellett R, Wang P et al. Human ultrasonic speech perception. *Science* 253; 82-85, 1991

19. American National Standards Institute (ANSI). American National Standard Specification for Audiometers (S3.6-1996). New York: ANSI; 1996
20. Nystuen A, Benke PJ, Merren J, Stone EM, Sheffield VC. A cerebellar ataxia locus identified by DNA pooling to search for linkage disequilibrium in an isolated population from the Cayman Islands. *Hum Mol Genet.* 1996 Apr;5(4):525-31
21. Carrasquillo MM, Zlotogora J, Barges S, Chakravarti A. Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. *Hum Mol Genet* 6:2163-2172. 1997
22. Scott DA, Kraft ML, Stone EM. Connexin mutations and hearing loss. *Nature* 391: 32, 1998
23. Angius A, Melis PM, Pirastru M et al. Archival, demographic and genetic studies define a Sardinian sub-isolate as a suitable model for mapping complex traits. *Hum Genet* 109:198-209. 2001
24. Heutink P, Oostra BA Gene finding in genetically isolated populations. *Hum Mol Genet.* 1;11(20):2507-15. Oct 2002

25. Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Chaltraw WE, Wendt KA, Nelson RA, Arnos KS, Falk RE. Mitochondrial gene mutation is a significant predisposing factor in aminoglycoside ototoxicity. *Am J Otolaryngol.*;18(3):173-8. May-Jun 1997
26. Leone C. - *La presbiacusia* – relazione ufficiale al LXXXIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Otorinolaringologia e Chirurgia Cervico-Facciale , Pacini Editore : 1996
27. Willot JF Effect of aging, hearing loss, and anatomical location on thresholds of inferior colliculus neurons in C57BL/6 and CBA mice. *J Neurophysiol* 56; 391-408. 1989
28. Schknecht HF, Gacek MR. Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 102; 1-16. 1993
29. Samaranayake H, Saunders JC, Greene MJ, Navaratnam DS. Ca²⁺ and k⁺ (BK) channels in chick hair cells are clustered and colocalized with apical-basal and tonotopic gradients. *J Physiol* 560(1): 13-20, 2004
30. Fausti SA, Frey RH, Rappaport BZ et al. high frequency audiometry with an earphone transducer. *Sem Hear* 6; 79:767-71, 1985

31. Matthews LJ, Lee FS, Mills JH et al. Extended high frequency thresholds in older adults. *J Speech Lang Hear Res.* 40:208-14, 1997
32. Buus S, Fiorentine M, Mason CR. Tuning curves at high frequencies and their relation to the absolute threshold curve. In Moore B.C.J., Patterson RD (Eds), *Auditory frequency Selectivity.* Plenum, New York pp.341-350, 1986
33. Berlin C.I. Personal commun. (1977)
34. American Speech Language Hearing Association (ASHA). Guidelines for the audiologic management of individuals receiving cochleotoxic drug therapy. *ASHA* 36(Suppl 12):11-19, 1994
35. Frank T. High-frequency (8 to 16kHz) reference thresholds and intrasubject threshold variability relative to ototoxicity criteria using a Sennheiser HAD 200 earphone. *Ear Hear* 22(2): 161-8, Apr 2001