Rodrigo Salazar da Silva

Análise de expressão de gene candidato à
surdez em modelos animais

Expression analysis of deafness candidate gene
in animal models

São Paulo

2017

Rodrigo Salazar da Silva

Análise de expressão de gene candidato à
surdez em modelos animais

Expression analysis of deafness candidate gene
in animal models

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientador(a): Profa. Dra. Regina Célia
Mingroni Netto
Coorientadora: Dra. Erika Kague

São Paulo

2017

Dados catalográficos

Salazar da Silva, Rodrigo

Análise de expressão de gene candidato à surdez em modelos animais.

108 páginas

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Surdez hereditária 2. Camundongo 3. *Zebrafish*
4. Análise de expressão 5. Edição gênica

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Regina Célia Mingroni Netto

Orientadora

"Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma, termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas."

Ayrton Senna

Agradecimentos

À Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto por me orientar desde a iniciação científica, demonstrando sua confiança e apoio em todos os momentos e me ajudando a crescer como cientista.

À Dra. Erika Kague por me aceitar como seu primeiro aluno de mestrado, por me apresentar aos fascinantes estudos com *zebrafish*, e por sempre me ajudar e me incentivar a dar o melhor de mim.

À Profa. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno, por permitir a utilização do Laboratório de *zebrafish* e pelo apoio constante ao longo da execução deste mestrado. E aos seus alunos por sempre me receberem de portas abertas no laboratório.

À Dra. Ana Carla Batissoco pelo auxílio nos ensaios de imunofluorescência, pelas sugestões na dissertação e, acima de tudo, pela amizade que perdura desde minha iniciação científica.

À Heloísa Maria de Siqueira-Bueno, pela sua ajuda inestimável no cuidado dos camundongos e *zebrafish* utilizados neste estudo.

À Dra. Jeanne Oiticica pelo auxílio na dissecação das cócleas de camundongos e por disponibilizar seu laboratório para a execução de parte dos experimentos. Este agradecimento também é estendido para as demais integrantes do laboratório LIM36, Dra. Karina Lezirovitz, Juliana, Gleiciele, Larissa e Cláudia, por sempre me acolherem no laboratório e me auxiliarem ao longo deste mestrado.

Ao Prof. Dr. Alberto Ribeiro por permitir acesso ao seu laboratório, e a todos seus alunos e técnicos, por sempre me receberem bem nas longas tardes de criostato e de microscopia, com momentos de pausa cheios de conversas engraçadas. Um agradecimento especial deve ser dado para o técnico Waldir Caldeira, por me ajudar inúmeras vezes no processo de obtenção de cortes histológicos, e na captura de imagens de microscopia confocal durante o processo de padronização dos ensaios de imunofluorescência.

À Profa. Mariz Vainzof e seus alunos pela receptividade em seu laboratório e por disponibilizarem as amostras de tecido muscular utilizadas neste trabalho. Um agradecimento especial à Camila, por toda a paciência dispendida para me ensinar e auxiliar com os experimentos de qRT-PCR.

À Profa. Dra. Chao Yun Irene Yan por permitir acesso ao seu laboratório, e a todos seus alunos e técnicos pela receptividade, pelo auxílio na captura de imagens de *zebrafish*, e por nos ajudar a confeccionar parte das microagulhas utilizadas nas injeções dos componentes do sistema CRISPR/Cas9 em *zebrafish*.

Ao técnico do Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP), Mario Cruz, por me auxiliar na captura final das lindas imagens de microscopia confocal das quais tanto me orgulho.

Aos funcionários do Laboratório de Genética Humana e do Centro de Pesquisas do Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL), Fátima, Mara, Maraísa, Paulo Rogério e Meire, pelos seus valiosos serviços prestados.

Aos alunos que fizeram/fazem parte do grupo de estudos de *zebrafish*, Luciano, Lucas, Camila Lovaglio, Tatiana, Camila Morales e Bárbara, pelas conversas bem-humoradas, discussões científicas e os cuidados dispendidos com os *zebrafish*.

Aos meus amigos de laboratório do 3º andar Renan, Juliana, Leandro, Dayane, Luiz Gustavo, Lilian, Adriano, Uirá, André, Allysson e Gustavo, que sempre me ajudaram no que fosse preciso, seja com discussões científicas ou sobre a vida, seja com os incontáveis momentos de descontração. Vocês tornaram este mestrado em uma jornada muito mais leve e divertida.

Aos meus amigos de graduação Stephanie, Skiter, Nathália, Cristiane e Anali, pelas várias discussões sobre experimentos, comida e a vida em geral. Nossos laços de amizade têm sido importantes em todos os aspectos da minha vida pessoal e acadêmica.

À minha incrível família, meu pai Raimundo, minha mãe Shirley e meu irmão Rodolfo, por todo o amor, carinho, paciência e apoio, demonstrados desde sempre e que foram fundamentais para que eu concluísse esta importante etapa da minha carreira acadêmica.

Aos camundongos e *zebrafish* sacrificados para a realização deste estudo.

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e ao Instituto de Biociências da USP pela infraestrutura.

Ao grupo do CEPID do Centro de Pesquisas do Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL), coordenado pela Profa. Dra. Mayana Zatz.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado.

Resumo

A perda auditiva hereditária é uma característica com grande heterogeneidade genética. Mais de uma centena de genes já foram relacionados com a audição e, com o advento do sequenciamento massivo em paralelo, novas variantes têm sido identificadas como candidatas a causar surdez hereditária. Porém, estudos funcionais para verificação do efeito das mutações candidatas são necessários. Modelos animais permitem estudos funcionais eficientes para confirmação do efeito de mutações em genes candidatos, sendo uma ferramenta poderosa para compreender melhor os efeitos genéticos, moleculares, fisiológicos e comportamentais destas alterações. Previamente, foi identificada em nosso laboratório uma mutação de sentido trocado em um gene que codifica um coativador nuclear como principal candidata a causar surdez hereditária em uma família de São Paulo. A função principal deste gene é regular positivamente a transcrição gênica mediada por receptores nucleares. Contudo, não há dados na literatura sobre a expressão e o papel deste gene no sistema auditivo. Desta forma, tivemos como objetivo principal investigar a expressão do gene candidato em sistemas mecanossensoriais de camundongo e *zebrafish*. Detectamos, por meio de RT-PCR, a expressão do RNAm na cóclea inteira e no órgão de Corti associado à estria vascular de camundongos com idades P4, P10 e P16. Posteriormente, experimentos de qRT-PCR mostraram maior expressão nos estágios P10 e P16, em relação ao estágio P4, com parcela significativa da expressão gênica concentrada no órgão de Corti associado à estria vascular. Com relação à proteína, foi detectada, por meio de ensaios de imunofluorescência, a sua expressão nos cortes histológicos de cóclea de camundongos P4, P10 e P14, em várias estruturas diferentes da cóclea: membrana basilar, membrana de Reissner, órgão de Corti, estria vascular, limbo espiral e gânglio espiral. Experimentos de hibridação *in situ* em *zebrafish* inteiro foram realizados e a expressão do RNAm foi observada na orelha interna de larvas com idade 3 e 5 dias pós-fertilização (dpf) e de juvenis com 5 e 7 semanas pós-fertilização (spf). Nossos experimentos forneceram dados inéditos que sugerem um papel conservado deste gene no desenvolvimento do sistema auditivo de camundongos e no desenvolvimento e fisiologia do sistema auditivo de *zebrafish*. Para investigarmos se a falta de expressão do gene afeta o sistema auditivo realizamos experimentos visando à edição gênica do gene candidato por meio do sistema CRISPR/Cas9 em *zebrafish*. Dada a dificuldade para a padronização da técnica, não obtivemos resultados conclusivos durante o período de estudo. Nosso trabalho mostrou pela primeira vez a expressão do RNAm e da proteína no sistema auditivo de modelos animais, o que é fundamental para reforçar o potencial papel da mutação na surdez hereditária identificada na família. Desta maneira, contribuímos para a delineação de futuros experimentos funcionais que elucidem o papel deste gene e da mutação correspondente no desenvolvimento e na fisiologia do sistema auditivo.

Abstract

Hereditary hearing loss is a characteristic with high genetic heterogeneity. More than one hundred genes have been related to hearing and, with the advent of massive parallel sequencing, new variants have been identified as candidates for causing hereditary deafness. However, functional studies to verify the effect of candidate mutations are necessary. Animal models provide efficient functional studies to confirm the effect of mutations and candidate genes, being a powerful tool to understanding the genetic, molecular, physiological and behavioural effects of these genetic variants. Previously, a missense mutation in a gene coding a nuclear receptor coactivator has been identified in our laboratory as the main candidate for causing hereditary hearing loss in a family from São Paulo. The main function of this gene is to positively regulate gene transcription mediated by nuclear receptors. However, there is no data in the literature about its expression or about its function in the hearing system. Thus, we aimed to investigate its expression in mechanosensory systems of mice and zebrafish. Through RT-CPR, we have detected expression of the mRNA in whole cochlea and in organ of Corti associated to stria vascularis of P4, P10 and P16 mice. In addition, qRT-PCR revealed higher expression in P10 and P16 stages, compared to P4 stage, and that a significant fraction of the expression is concentrated in the organ of Corti associated to stria vascularis. Regarding the protein, immunofluorescence assays revealed expression of the coactivator in histological sections of P4, P10 and P14 mice cochlea, with fluorescent signals in several structures: basilar membrane, Reissner's membrane, organ of Corti, stria vascularis, spiral limbus and spiral ganglion. Whole-mount *in situ* hybridization assays were conducted in zebrafish, revealing the mRNA expression in the inner ear of 3 and 5 days-post-fertilization (dpf) larvae and of 5 and 7 weeks-post-fertilization (wpf) juveniles. Our experiments provided unprecedented data suggesting a conserved role of this gene in the development of the auditory system of mice and in the development and physiology of the auditory system of zebrafish. In order to investigate if the lack of the gene expression affects the auditory system, we performed experiments aiming genetic edition through CRISPR/Cas9 system in zebrafish. Given the difficulty to standardize the technique, we could not obtain conclusive results during the study period. Our work has shown for the first time the expression of the candidate gene mRNA and protein in the auditory in animal models, which is fundamental to reinforce the potential role of the mutation in the hearing loss identified in the family. Thus, we have contributed to the delineation of future functional experiments that will unveil the role of the gene and its corresponding mutation in the development and physiology of the auditory system.

Introdução

1. Heterogeneidade genética da surdez hereditária em humanos

Problemas que afetam o desenvolvimento e/ou fisiologia do sistema auditivo podem acarretar na perda auditiva ou, como também é conhecida, surdez. A surdez é uma deficiência com múltiplas causas (Willems, 2000) e acomete cerca de 360 milhões de pessoas no mundo (<http://www.who.int/>). Segundo o Censo de 2010 conduzido pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), estima-se que aproximadamente 9,7 milhões de brasileiros (5,1% da população total) tenham algum grau de deficiência auditiva em algum momento da vida.

Conforme revisado por Smith *et al.*, 2014 e Ferreira *et al.* (2013), a perda auditiva pode ter causa ambiental (infecções virais e bacterianas, ototoxicidade induzida por aminoglicosídeos ou exposição prolongada a sons de alta intensidade) ou genética, ou ambas. Além disto, a surdez pode ser classificada com relação à: (i) manifestação clínica (sindrômica ou não-sindrômica); (ii) região da disfunção do sistema auditivo (condutiva, neurosensorial, ou mista); (iii) idade de manifestação (pré-lingual ou pós-lingual); (iv) lateralidade (unilateral ou bilateral); e (v) gravidade (leve, moderada, grave ou profunda).

Com relação ao critério de manifestação clínica, é dito que a perda auditiva é *sindrômica* quando está associada a outros sinais clínicos, e *não-sindrômica* quando ela é o único sinal clínico presente no paciente. No caso da região da disfunção, a surdez é classificada como *condutiva* quando é resultante de problemas de condução do som pela orelha externa e/ou pelos ossículos da orelha média, *neurosensorial* quando é resultante de problemas na via óssea audiométrica (lesões na cóclea, no nervo auditivo, nas vias auditivas e/ou no córtex cerebral), e *mista* quando é uma combinação de surdez condutiva e neurosensorial. Sobre a idade de manifestação, a perda auditiva pode acontecer antes ou durante o desenvolvimento da fala, sendo denominada *pré-lingual*, ou após este desenvolvimento, sendo denominada *pós-lingual*. Em relação à lateralidade, a surdez pode ser *unilateral* quando afeta apenas uma das orelhas, ou *bilateral*, se afetar ambas. Finalmente, dependendo da gravidade, isto é, da faixa de decibéis (dB) em que se encontra o limiar auditivo do paciente, a perda auditiva pode ser considerada *leve* quando o limiar está entre 21 e 40dB, *moderada* quando entre 41 e

70dB, grave quando entre 71 e 90dB, e profunda quando maior que 90dB, de acordo com o sistema de classificação modificado de Davis e Silverman (1970).

Apesar de existirem mais de 400 doenças ou síndromes que incluem a surdez como um de seus sinais clínicos, 70% dos casos de surdez hereditária são não-sindrômicos (Keats e Berlin, 1999). Dentre os casos de surdez não-sindrômica, o padrão de herança autossômico recessivo é o mais frequentemente encontrado (75-80% dos casos genéticos), seguido pelos casos de herança autossômica dominante (20%) e apenas 1 a 1,5% com herança ligada ao cromossomo X. As mutações mitocondriais contribuem em pelo menos 1% dos casos de surdez não-sindrômica (Smith *et al.*, 2014). As funções dos genes mutados nos casos de surdez hereditária são as mais diversas como, por exemplo, codificam proteínas importantes na manutenção da homeostasia iônica da cóclea, proteínas estruturais e motoras de células ciliadas e fatores de transcrição (Tabela 1).

Gene	Locus	Função do produto na audição
Herança autossômica recessiva		
<i>GJB2</i>	DFNB1/DFNA3A	Homeostase iônica
<i>GJB6</i>	DFNB1/DFNA3B	Homeostase iônica
<i>MYO15A</i>	DFNB3	Proteína motora dos estereocílios
<i>OTOF</i>	DFNB9	Exocitose nas vesículas sinápticas das células ciliadas internas
<i>CDH23</i>	DFNB12	Proteína de adesão dos estereocílios
<i>TRIOBP</i>	DFNB28	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>PJVK</i>	DFNB59	Sinalização de células ciliadas e neurônios
Herança autossômica dominante		
<i>POU4F3</i>	DFNA15	Fator de transcrição
<i>CRYM</i>	Não definido	Homeostase iônica
<i>TFCP2L3</i>	DFNA28	Fator de transcrição
<i>MYH9</i>	DFNA17	Proteína motora dos estereocílios
<i>CCDC50</i>	DFNA44	Formação do citoesqueleto dos estereocílios
<i>MIRN96</i>	DFNA50	Regulação da expressão gênica
<i>TJP2</i>	DFNA51	Manutenção de diferença de potencial elétrico
Herança ligada ao X		
<i>POU3F4</i>	DFNX2	Fator de transcrição
<i>PRPS1</i>	DFNX1	Metabolismo de purina e biossíntese de nucleotídeos
Herança mitocondrial		
<i>MT-RNR1</i>	12S RNAr	RNA ribossômico mitocondrial
<i>MT-TS1</i>	RNA ^t Ser(UCN)	RNA transportador mitocondrial

Tabela 1 - Exemplos de genes relacionados a surdez hereditária e a função de seus produtos no sistema auditivo. Tabela modificada de Hilgert *et al.* (2009).

O mapeamento de genes de audição em grandes famílias levou ao conhecimento de mais de uma centena de locos gênicos relacionados à surdez hereditária. Cerca de 105 produtos gênicos foram identificados desde 1990 (<http://hereditaryhearingloss.org/>), fornecendo subsídios extraordinários à compreensão da fisiologia da audição. Com o

advento da técnica de sequenciamento massivo em paralelo, novas variantes candidatas causar surdez hereditária são rapidamente identificadas. Na revisão de Vona *et al.* (2015), por exemplo, são mostrados cerca de 20 genes diferentes que foram relacionados com surdez hereditária por meio desta técnica.

A contribuição dos modelos animais no estudo de alterações gênicas causadoras de doenças tem sido admirável em revelar aspectos moleculares e fisiológicos do complexo desenvolvimento dos mamíferos e suas vias genéticas. Dentre os modelos animais mais utilizados no estudo de surdez hereditária, destacam-se o camundongo (*Mus musculus*) e o *zebrafish* (*Danio rerio*), conforme apresentaremos a seguir.

2. Fisiologia do sistema auditivo de vertebrados

A percepção de estímulos sonoros no subfilo Vertebrata é mediada pelo aparelho auditivo, por meio de um sistema de mecanotransdução na orelha interna. Apesar de este órgão apresentar algumas diferenças morfológicas dentre os diferentes grupos de vertebrados, os mecanismos e os componentes celulares necessários para o seu funcionamento apresentam-se conservados.

O epitélio sensorial da orelha interna de vertebrados apresenta três tipos celulares principais: as células ciliadas, que convertem sinais mecânicos em elétricos; os neurônios sensoriais, que estabelecem sinapses com as células ciliadas e transmitem o impulso elétrico até o cérebro; e as células de suporte, que possuem papel importante no desenvolvimento, na função e na homeostasia da orelha interna (Cotanche e Kaiser, 2010; Warchol *et al.*, 2011; Sapède, Dyballa e Pujades, 2012).

Conforme revisto por Nicolson (2005), na superfície apical das células ciliadas há um feixe de estereocílios arranjados em padrão de escada crescente e associados a uma membrana. Quando o som chega à orelha interna, a vibração mecânica faz os estereocílios serem defletidos em relação à membrana associada, levando à abertura de canais iônicos localizados na base dos estereocílios. Tal evento desencadeia um influxo de íons potássio (K^+) proveniente da endolinfa, líquido extracelular rico em K^+ , na qual as células ciliadas estão imersas. Este influxo de íons acaba por gerar uma despolarização que é transmitida das células ciliadas para os neurônios sensoriais associados a elas e, posteriormente, para o cérebro via nervo auditivo.

Para o sistema responder a um novo estímulo sonoro, é necessário que ocorra a reciclagem dos íons de potássio que entraram nas células ciliadas de volta para a endolinfa, reestabelecendo a homeostasia do sistema (Dror e Avraham, 2009). Em mamíferos, por exemplo, tal reciclagem se dá com o transporte dos íons K^+ , via canais de potássio, para as células de suporte e, através das junções comunicantes existentes entre estes tipos celulares, para a uma região chamada estria vascular, sendo então devolvidos para a endolinfa (Figura 1).

Figura 1 – Esquema representando a reciclagem de íons potássio na orelha interna de mamífero. (a) Seção longitudinal de um giro da orelha interna de camundongo, mostrando o caminho de reciclagem dos íons K^+ . (b) Esquema de uma única célula ciliada (em azul), vizinha a duas células de suporte (marrom). Figura modificada de Dror e Avraham (2009).

Além da orelha interna, este sistema de mecanotransdução e tipos celulares equivalentes também estão presentes na linha lateral de peixes e anfíbios (Nicolson, 2005), um órgão mecanossensorial responsável por detectar movimentos na água (Montgomery *et al.*, 2000).

3. O desenvolvimento embrionário da orelha interna de vertebrados

O desenvolvimento da orelha interna de vertebrados começa a partir de um espessamento ectodérmico, próximo ao rombencéfalo, conhecido como região pré-placóide (PPR, do inglês, *Preplacodal Region*). A PPR é determinada por meio das vias

de sinalização de BMPs (do inglês, *Bone Morphogenetic Protein*), de FGFs (do inglês, *Fibroblast Growth Factor*) e de Wnt (do inglês, *Wingless/Int*), formando em seguida dois placóides: o placóide ótico, o qual dá origem à orelha interna, e os placóides epibranquiais, um grupo de placóides neurogênicos (Litsiou *et al.*, 2005; Ohyama *et al.*, 2006; Freter *et al.*, 2008; Baxendale e Whitfield, 2014; Sai e Ladher, 2015).

O processo de indução do placóide ótico é dependente das vias de sinalização FGF e Wnt (Sai e Ladher, 2015). Uma vez formado o placóide ótico, este passa por um processo de invaginação (como observado em camundongo, conforme descrito por Morsli *et al.*, 1998) ou de cavitação (como observado em *zebrafish*, conforme descrito por Hadon e Lewis, 1996), formando o primórdio da orelha interna, denominado vesícula ótica ou otocisto.

Enquanto a vesícula ótica é formada, os eixos antero-posterior (AP) e dorsoventral (DV) da orelha interna também são determinados. Primeiramente é determinado o eixo AP e, no caso da orelha interna de camundongo e de galinha, Bok *et al.* (2011) demonstraram a importância da via de sinalização de ácido retinóico neste processo. Já em *zebrafish*, as principais vias de sinalização associadas à determinação do eixo AP são a SHH (do inglês, *Sonic Hedgehog*) e a FGF (Hammond *et al.*, 2003; Hammond e Whitfield, 2011). Com relação ao eixo DV, foi demonstrado o papel fundamental das vias de sinalização SHH (Bok *et al.*, 2005) e Wnt (Riccomagno *et al.*, 2005) na orelha interna de camundongo. No caso de *zebrafish*, foi demonstrada apenas a participação da via de sinalização SHH na determinação deste eixo na orelha interna (Hammond *et al.*, 2010).

Outro ponto importante do desenvolvimento da orelha interna está relacionado à diferenciação dos principais tipos celulares que a formam. As células multipotentes presentes na vesícula ótica se diferenciam em três linhagens celulares diferentes: a linhagem prosensorial, que dá origem às células ciliadas e de suporte; a linhagem proneural, que forma os neurônios auditivos e vestibulares; e a linhagem não-sensorial, responsável pelas células com funções estrutural, secretora e/ou de absorção (Wu e Kelley, 2012). Dentre os vários genes expressos durante a diferenciação prosensorial, diversos estudos apontam os componentes da via de sinalização Notch e os seus genes-alvo como tendo um papel fundamental na definição do domínio prosensorial da vesícula ótica (Kiernan *et al.*, 2005) e na regulação da diferenciação das células ciliadas e de suporte (Birmingham *et al.*, 1999; Lanford *et al.*, 2000; Doetzlhofer *et al.*, 2009).

4. Modelos animais para o estudo de surdez hereditária: morfologia dos sistemas mecanossensoriais da audição

4.1. Morfologia do sistema auditivo de camundongo (*Mus musculus*)

Classicamente, os estudos funcionais sobre genes relacionados à audição são conduzidos em camundongos, devido à alta semelhança estrutural e fisiológica do seu sistema auditivo com o de humanos, aliada à elevada similaridade genética (99% dos genes de camundongos têm ortólogos humanos, e 80% dos genes humanos têm ortólogo em camundongo) entre essas espécies (Waterston *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2008). Contudo, é importante ressaltar que existem algumas diferenças com relação ao sistema auditivo humano, como, por exemplo, a existência de duas fases de maturação pós-natal no sistema auditivo murino, conforme mostrado por Anniko (1985). O primeiro evento ocorre no final da primeira semana pós-natal e consiste na maturação morfológica da estria vascular e de outras estruturas da cóclea e no desenvolvimento da composição iônica da endolinfa. Já o segundo evento ocorre no final da segunda semana pós-natal e consiste em um leve aumento no número de neurônios eferentes às células ciliadas e no surgimento dos primeiros potenciais de ação nos nervos cocleares.

Em mamíferos, o aparelho auditivo pode ser dividido em três compartimentos principais: orelhas externa, média e interna (Figura 2a). A orelha externa é responsável por coletar as ondas sonoras e conduzi-las pelo canal auditivo até o tímpano, uma membrana que constitui a fronteira entre as orelhas externa e média. A orelha média, por sua vez, é constituída por três ossículos - martelo, bigorna e estribo - em uma cavidade preenchida por ar na altura do osso temporal, que possuem a função de conduzir a vibração das ondas sonoras, até a orelha interna. Finalmente, a orelha interna é a região que abriga o aparelho vestibular, conjunto de estruturas responsável pelo equilíbrio, e a cóclea, estrutura responsável pela audição por meio da conversão dos estímulos sonoros em impulsos elétricos, que serão interpretados pelo córtex cerebral temporal (Dror e Avraham, 2009).

Na cóclea existe um fino epitélio sensorial conhecido como órgão de Corti. Este epitélio é organizado em três fileiras de células ciliadas externas, uma única fileira de células ciliadas internas, além das células de suporte vizinhas (Figuras 2b e 2c).

Figura 2 – Representação da orelha de mamífero. (A) Divisão do aparelho auditivo em orelhas externa, média e interna. (B) Seção longitudinal da cóclea, mostrando os três compartimentos que a formam, preenchidos por fluidos. (C) Seção longitudinal do órgão de Corti e seus tipos celulares. Figura modificada de Dror e Avraham (2009).

4.2. Morfologia do sistema auditivo de *zebrafish* (*Danio rerio*)

Um modelo animal que vem se destacando em estudos funcionais é o *zebrafish*, ou popularmente conhecido como paulistinha. Algumas características garantem vantagens ao modelo, tais como fecundação externa, rápido desenvolvimento, transparência dos embriões e larvas, a disponibilidade de um grande número de linhagens transgênicas que permitem o acompanhamento *in vivo* do desenvolvimento de estruturas sensoriais e, ainda, a viabilidade de edição do genoma e produção de animais *knock-out* (Lieschke e Currie, 2007; Ablain *et al.*, 2015). A similaridade genética entre humanos e *zebrafish* é modesta, 69% dos genes de *zebrafish* têm ao menos um ortólogo em humanos e 71,4% dos genes humanos têm ao menos um ortólogo em *zebrafish* (Howe *et al.*, 2013). Contudo, 82% dos genes associados a morbidades em humanos pelo OMIM (do inglês, *Online Mendelian Inheritance in Man*) pode ser relacionado a pelo menos um gene

ortólogo em *zebrafish* (Howe *et al.*, 2013), tornando este animal um bom modelo para estudos de doenças genéticas.

O sistema auditivo do *zebrafish* é diferente quando comparado ao de mamíferos, visto que, por exemplo, não há uma cóclea. Apesar das diferenças, apresenta desenvolvimento e anatomia similares à orelha interna dos demais vertebrados (Whitfield, 2002), permitindo a realização de estudos relacionados à audição e à surdez. Diferentemente dos Amniota, o sistema auditivo de *zebrafish* é composto apenas pela orelha interna, a qual pode ser dividida em *pars superior* e *pars inferior*, e o aparato de Weber (Figura 3a). O *pars superior* abrange os 3 canais semirculares e o utrículo, sendo responsável pela função vestibular, enquanto que o *pars inferior* é composto pelo sáculo e pela lagena, sendo responsável primariamente pela função auditiva (Bang *et al.*, 2001; Bever e Fekete, 2002). Também é importante salientar que o utrículo, o sáculo e a lagena apresentam um epitélio sensorial denominado mácula (Figura 3b), associado a pequenas concreções biomineralizadas (chamadas otólitos) que contribuem para a audição e o equilíbrio (Baxendale e Whitfield, 2014).

Além disso, como integrante da superordem Ostariophysi, o *zebrafish* apresenta o aparelho de Weber, um conjunto de quatro ossículos que conectam a bexiga natatória ao sáculo, melhorando a sensibilidade auditiva do animal (Baxendale e Whitfield, 2014). Acredita-se que quando o som induz uma vibração na bexiga natatória, ela é transmitida para o epitélio sensorial da orelha interna por meio dos ossículos de Weber, amplificando o som (Nicolson, 2005).

Figura 3 - Representação da orelha de *zebrafish* adulto. (a) Esquema da orelha interna de *zebrafish* em visão lateral. (b) Esquema mais detalhado da orelha interna em visão lateral, sem a representação dos ossículos de Weber. ANT= Canal semicircular anterior, CC= *common crus*, INF= *Pars inferior* (vermelho), LAG= Lagena, LAT= Canal semicircular lateral, LM= Macula lagenar, PERI= Espaço perilinfático (azul), POST= Canal semicircular posterior, SAC= Sáculo, SB= Bexiga natatória, SM= Mácula sacular, SUP= *Pars superior* (verde), UM= Mácula utricular, UTR= Utrículo, WEB= Ossículos de Weber (marrom). Barra de escala= 1mm. Figura adaptada de Bang, Sewell e Malicki (2001).

Além da orelha interna, este animal apresenta outro órgão sensorial, denominado linha lateral. Este órgão faz parte de um segundo sistema de mecanotransdução e apresenta tipos celulares similares aos da orelha interna, com a vantagem de estarem expostos ao meio externo, o que facilita sua observação e manipulação.

A linha lateral é composta por um conjunto de unidades denominadas neuromastos, dispostos regularmente ao longo do corpo do animal (Nicolson, 2005; Figura 4a). Os neuromastos (Figura 4b e 4c), por sua vez, são constituídos por um grupo de células ciliadas inervadas por neurônios sensoriais e cercadas por células de suporte e por um anel periférico de células do manto (um tipo de célula de suporte). Por fim, uma cúpula gelatinosa envolve todo esse agrupamento celular (Nicolson, 2005; Romero-Carvaja *et al.*, 2015).

Vale ressaltar que a via de sinalização Notch também exerce as mesmas funções de determinação da extensão do domínio prosensorial e de regulação da diferenciação de células ciliadas e de suporte, tanto na orelha interna (Millimaki *et al.*, 2007) quanto no neuromastos da linha lateral de *zebrafish* (Itoh e Chitnis, 2001; Matsuda e Chitnis, 2012).

Figura 4 - Fotos e esquemas da linha lateral e dos neuromastos de *zebrafish*. (a) Visão lateral de larva de *zebrafish* 5dpf, com neuromastos marcados com corante vital DASPEI. (b) Esquema de seção longitudinal do neuromasto de *zebrafish*, mostrando os diferentes tipos celulares que o compõem. (c) Visão dorsal de neuromasto de larva de *zebrafish* transgênico, com expressão de marcadores de célula do manto (*sqet20*, em verde, no anel periférico), célula ciliada (*sqet4*, em verde, citoplasmático, no centro do neuromasto), de membrana celular (*cldnb:lynGFP*, em verde) e de núcleo (*cldnb:H2A-mCherry*, em vermelho). Figuras modificadas de <https://sites.google.com/a/sheffield.ac.uk/whitfield-lab/home>, Ghysen e Dambly-Chaudière (2004), e Romero-Carvaja *et al.* (2015).

5. O papel do camundongo e do *zebrafish* nos estudos sobre surdez hereditária

A expansão do conhecimento sobre surdez hereditária conta com a participação significativa dos estudos com camundongos com mutações em genes ortólogos aos encontrados em humanos, tanto os que foram encontrados naturalmente, como também os obtidos após indução com agentes mutagênicos diversos (Tabela 2). Um exemplo de estudo clássico de descoberta de novos genes relacionados à surdez hereditária é o trabalho de Avraham *et al.* (1995), no qual os autores investigaram a causa genética do fenótipo de surdez associado à linhagem mutante *Snell's waltzer* de camundongo. Após uma série de experimentos incluindo clonagem e mapeamento de restrição, foi identificado o gene candidato *Myo6*, o qual foi confirmado após análises de expressão deste gene por meio de *western blot* e imunofluorescência em cortes histológicos de

cóclea. Ao final do estudo, estes pesquisadores concluíram que mutações no gene *Myo6* tinham grande potencial de causar surdez hereditária em humanos. No ano de publicação deste artigo não havia nenhum relato de surdez hereditária em humanos causada por mutações no gene *Myo6*, mas relatos de surdez hereditária causada por mutações nesse gene surgiram nos anos seguintes (Melchionda *et al.*, 2001; Ahmed *et al.*, 2003; Sanggaard *et al.*, 2008), mostrando que a previsão dos autores estava correta.

Referência	Gene	Metodologia
Chen <i>et al.</i> , 2014	<i>Spns2</i>	Geração de <i>knock-out</i> condicional, RT-PCR, ensaios de imunohistoquímica e de imunofluorescência, avaliação de audição medida por teste PEATE, análise por microscopia eletrônica de varredura, medição de potencial endococlear.
Kazmierczak <i>et al.</i> , 2015	<i>Usp53</i>	qRT-PCR, ensaio de imunofluorescência, hibridação <i>in situ</i> , análise por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, avaliação de audição medida de potencial endococlear, avaliação de audição por teste PEATE.
Kommareddi <i>et al.</i> , 2015	<i>Slc44a2</i>	RT-PCR, ensaio de imunofluorescência, imunoprecipitação, <i>western blot</i> , avaliação de audição por teste PEATE.
Chen <i>et al.</i> , 2016a	<i>Dmxl2</i>	RT-PCR, ensaio de imunofluorescência.
Chen <i>et al.</i> , 2016b	<i>Tprn</i>	Geração de <i>knock-out</i> condicional, ensaio de imunofluorescência, varredura por microscopia eletrônica, avaliação de audição por teste ABR.
Diaz-Horta <i>et al.</i> , 2016	<i>Ror1</i>	RT-PCR, ensaio de imunofluorescência, geração de modelo de cóclea por preenchimento de tinta, avaliação de audição medida por teste PEATE e por teste EOA.
Ueyama <i>et al.</i> , 2016	<i>Diaph1</i>	qPCR, ensaio de imunofluorescência, imunoblotting, análise por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, avaliação de audição medida por teste PEATE e por teste EOA.

Tabela 2 - Lista de exemplos na literatura quem de estudos que empregaram somente camundongo como modelo animal para análises funcionais sobre surdez hereditária. EOA= Emissão otoacústica evocada. PEATE= Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico.

Devido a todas as vantagens citadas anteriormente sobre o *zebrafish*, este modelo animal tem sido cada vez mais utilizado, com enfoque no estudo do efeito de mutações responsáveis por causar surdez hereditária sobre o desenvolvimento da orelha interna (Tabela 3), como exemplificado no artigo de Han *et al.* (2011). Neste trabalho, os autores visaram elucidar o mecanismo subjacente à surdez associada ao locus DFNA28 e analisar os efeitos da mutação no gene correspondente, *GRHL2*, sobre o desenvolvimento da orelha interna. Foi confirmado não só que o *zebrafish knock-out* com o gene mutado (gene *grhl2b*) apresenta surdez e anomalias morfológicas na orelha interna, como também apresenta alterações na quantidade e no tamanho de junções celulares apicais na vesícula ótica. Ao final, os pesquisadores deste trabalho aventam a possibilidade da surdez associada ao locus DFNA28 ser causada por problemas na manutenção da homeostasia iônica da orelha interna, visto que problemas em junções celulares estão entre as causas mais comuns de surdez.

Referência	Gene	Metodologia empregada
Dutton <i>et al.</i> , 2009	<i>sox10</i>	Hibridação <i>in situ</i> em animal inteiro, ensaio de imunofluorescência em animal inteiro, detecção de apoptose por marcação TUNEL.
Gleason <i>et al.</i> , 2009	<i>tmie</i>	Microinjeção de RNAm, análise de potencial elétrico de células ciliadas, ensaio de imunofluorescência em animal inteiro, análise de neuromastos por microscopia eletrônica de varredura, qRT-PCR.
Li, Kloosterman e Fekete, 2010	<i>miR-183</i> <i>miR-96</i> <i>miR-182</i>	Microinjeção de miRNAs e de morfólino, hibridação <i>in situ</i> em animal inteiro, ensaio de imunofluorescência em animal inteiro.
Shen <i>et al.</i> , 2015	<i>msrb3</i>	Microinjeção de morfólino, hibridação <i>in situ</i> em animal inteiro, ensaio de imunofluorescência em animal inteiro, RT-PCR, varredura de neuromastos por microscopia eletrônica, detecção de apoptose por marcação TUNEL, avaliação de audição por teste de resposta ao susto.
Stook-Vaughan <i>et al.</i> , 2015	<i>otog</i> <i>tecta</i>	Microinjeção de morfólino, hibridação <i>in situ</i> em animal inteiro, ensaio de imunofluorescência em animal inteiro.
Kwon, 2016	<i>vdrb</i>	Microinjeção de morfólino, hibridação <i>in situ</i> em animal inteiro, contagem de células ciliadas em linhagem transgênica, avaliação de equilíbrio por teste de contra-rotação dos olhos e de inflamação da bexiga natatória, avaliação de coordenação motora por teste de resposta ao susto.
Ma <i>et al.</i> , 2017	<i>slc44a4</i>	Microinjeção de morfólino, hibridação <i>in situ</i> em animal inteiro, ensaio de imunofluorescência em animal inteiro, RT-PCR, avaliação de audição medida por teste de resposta ao susto.

Tabela 3 - Lista de exemplos na literatura de estudos que empregaram somente *zebrafish* como modelo animal para análises funcionais sobre surdez hereditária. TUNEL= do inglês, *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*.

Por fim, é interessante ressaltar que alguns estudos de surdez hereditária utilizaram ambos os modelos animais citados, de forma complementar (Tabela 4). Tal estratégia pode ser observada, por exemplo, no trabalho de Azaiez *et al.* (2015), em que os autores estudaram uma família europeia com surdez hereditária, revelando um novo gene candidato a surdez, *HOMER2*. A função do gene foi investigada tanto em camundongo quanto em *zebrafish*. Os experimentos com camundongos incluíram estudos de expressão com ensaios de imunofluorescência em cortes histológicos de cóclea e avaliações da audição em camundongos *knock-out* com relação ao gene candidato. Já no caso dos experimentos com larvas de *zebrafish*, foram feitas análises fenotípicas tanto da vesícula ótica quanto dos neuromastos dos peixes injetados com RNAm contendo a mutação descrita na família estudada. Com esta estratégia, foi possível confirmar que a surdez observada na família em questão de fato se deve à mutação no gene *HOMER2*. A tabela a seguir mostra outros exemplos de estudos funcionais que utilizam camundongos e *zebrafish* de forma complementar.

Referência	Gene	Animal utilizado	Metodologia empregada
Bork <i>et al.</i> , 2011	<i>Ildr1</i>	Camundongo	RT-PCR, hibridação <i>in situ</i> .
	<i>(ildr1)</i>	<i>Zebrafish</i>	Hibridação <i>in situ</i> em animal inteiro.
Heeringa <i>et al.</i> , 2011	<i>Coq6</i>	Camundongo	Hibridação <i>in situ</i> , ensaio de imunofluorescência.
	<i>(coq6)</i>	<i>Zebrafish</i>	Microinjeção de morfólino, ensaio de imunofluorescência em animal inteiro.
Von Ameln <i>et al.</i> , 2012	<i>Pnpt1</i>	Camundongo	RT-PCR, <i>immunoblot</i> , ensaio de imunofluorescência.
	<i>(pnpt1)</i>	<i>Zebrafish</i>	RT-PCR, hibridação <i>in situ</i> em animal inteiro.
Rost <i>et al.</i> , 2014	<i>Col4a6</i>	Camundongo	Ensaio de imunohistoquímica.
	<i>(col4a6)</i>	<i>Zebrafish</i>	Hibridação <i>in situ</i> em animal inteiro.
Li <i>et al.</i> , 2015	<i>Tmtm132e</i>	Camundongo	qRT-PCR, <i>western blot</i> , ensaio de imunofluorescência.
	<i>(tmtm132e)</i>	<i>Zebrafish</i>	Microinjeção de morfólino e de RNAm, avaliação de audição por teste de resposta ao susto e por análise de potencial microfônico da orelha interna, ensaio de imunofluorescência em animal inteiro, análise de neuromastos por microscopia eletrônica de varredura.

Tabela 4 - Lista de exemplos na literatura quem de estudos que empregaram camundongo e *zebrafish* como modelos animais para análises funcionais sobre surdez hereditária.

Conclusões

Nosso trabalho teve como objetivo geral estudar a expressão de um gene candidato a explicar surdez hereditária em uma família de estudada pelo Laboratório de Genética Humana. Para isto, foram estudados os sistemas mecanossensoriais (sistema auditivo e/ou linha lateral) de camundongo e *zebrafish*. Foram os principais achados deste estudo:

Os experimentos de RT-PCR mostraram expressão do RNAm do gene na cóclea inteira e no órgão de Corti associado à estria vascular de camundongos com idades P4, P10 e P16;

Os experimentos de qRT-PCR mostraram maior expressão do RNAm na cóclea inteira e no órgão de Corti associado à estria vascular de camundongos P10 e P16 quando comparado a P4. Também foi observado que uma parcela significativa da expressão do RNAm está concentrada no órgão de Corti associado à estria vascular;

Os ensaios de imunofluorescência mostraram expressão da proteína correspondente nos cortes histológicos de cóclea de camundongos P4, P10 e P14. O padrão de marcação observado é predominantemente citoplasmático e abrange estruturas diversas da cóclea, como membrana basilar, órgão de Corti, estria vascular, membrana de Reissner, limbo espiral e gânglio espiral;

Os experimentos de hibridação *in situ* em animal inteiro mostraram expressão do RNAm na orelha interna de *zebrafish* nos estágios 3dpf, 5 dpf, 5spf e 7spf. A expressão na linha lateral não foi observada em nenhum dos estágios estudados.

Este conjunto de resultados é inédito na literatura e sugere um papel importante do gene candidato tanto no desenvolvimento do sistema auditivo de camundongos, assim como no desenvolvimento e fisiologia do sistema auditivo de *zebrafish*.

Referências bibliográficas

- Ahmed, Z. M., Morell, R. J., Riazuddin, S., Gropman, A., Shaukat, S., Ahmad, M. M., ... & Khan, S. N. (2003). Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37. *The American Journal of Human Genetics*, 72(5), 1315-1322.
- Andermann, P., Ungos, J., & Raible, D. W. (2002). Neurogenin1 defines zebrafish cranial sensory ganglia precursors. *Developmental biology*, 251(1), 45-58.
- Andersson, E. R., Sandberg, R., & Lendahl, U. (2011). Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*, 138(17), 3593-3612.
- Andersson, E. R., & Lendahl, U. (2014). Therapeutic modulation of Notch signalling--are we there yet?. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(5), 357.
- Anniko, M. (1985). Histochemical, microchemical (microprobe) and organ culture approaches to the study of auditory development. *Acta Oto-Laryngologica*, 99(sup421), 10-18.
- Avraham, K. B., Hasson, T., Steel, K. P., Kingsley, D. M., Russell, L. B., Mooseker, M. S., ... & Jenkins, N. A. (1995). The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nature genetics*, 11(4), 369-375.
- Azaiez, H., Decker, A. R., Booth, K. T., Simpson, A. C., Shearer, A. E., Huygen, P. L., ... & Turner, A. (2015). HOMER2, a stereociliary scaffolding protein, is essential for normal hearing in humans and mice. *PLoS genetics*, 11(3), e1005137.
- Bang, P. I., Sewell, W. F., & Malicki, J. J. (2001). Morphology and cell type heterogeneities of the inner ear epithelia in adult and juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Comparative Neurology*, 438(2), 173-190.
- Baxendale, S., & Whitfield, T. T. (2014). *Zebrafish inner ear development and function* (pp. 63-106). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Bento, R. F. (2013). *Tratado de otologia*. São Paulo, SP: Atheneu.
- Bermingham, N. A., Hassan, B. A., Price, S. D., Vollrath, M. A., Ben-Arie, N., Eatock, R. A., ... & Zoghbi, H. Y. (1999). Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science*, 284(5421), 1837-1841.
- Bever, M. M., & Fekete, D. M. (2002). Atlas of the developing inner ear in zebrafish. *Developmental dynamics*, 223(4), 536-543.
- Bok, J., Bronner-Fraser, M., & Wu, D. K. (2005). Role of the hindbrain in dorsoventral but not anteroposterior axial specification of the inner ear. *Development*, 132(9), 2115-2124.
- Bok, J., Raft, S., Kong, K. A., Koo, S. K., Dräger, U. C., & Wu, D. K. (2011). Transient retinoic acid signaling confers anterior-posterior polarity to the inner ear. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), 161-166.
- Borck, G., Rehman, A. U., Lee, K., Pogoda, H. M., Kakar, N., Von Ameln, S., ... & Ansar, M. (2011). Loss-of-function mutations of ILDR1 cause autosomal-recessive hearing impairment DFNB42. *The American Journal of Human Genetics*, 88(2), 127-137.
- Brown, S. D., Hardisty-Hughes, R. E., & Mburu, P. (2008). Quiet as a mouse: dissecting the molecular and genetic basis of hearing. *Nature reviews. Genetics*, 9(4), 277.
- Chen, J., Ingham, N., Kelly, J., Jadeja, S., Goulding, D., Pass, J., ... & White, J. K. (2014). Spinster homolog 2 (spns2) deficiency causes early onset progressive hearing loss. *PLoS genetics*, 10(10), e1004688.
- Chen, D. Y., Liu, X. F., Lin, X. J., Zhang, D., Chai, Y. C., Yu, D. H., ... & Sun, L. H. (2016a). A dominant variant in DMXL2 is linked to nonsyndromic hearing loss. *Genetics in Medicine*, 19(5), 553-558.
- Chen, M., Wang, Q., Zhu, G. H., Hu, P., Zhou, Y., Wang, T., ... & Xie, D. H. (2016b). Progressive hearing loss and degeneration of hair cell stereocilia in taperin gene knockout mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 479(4), 703-707.

- Cotanche, D. A., & Kaiser, C. L. (2010). Hair cell fate decisions in cochlear development and regeneration. *Hearing research*, 266(1), 18-25.
- Dasgupta, S., Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2014). Nuclear receptor coactivators: master regulators of human health and disease. *Annual review of medicine*, 65, 279-292.
- Davis, H., & Silverman, S. R. (1970). Auditory test hearing aids. *Davis H, Silverman SR. Hearing and deafness. Holt: Rinehart and Winston*, 253-79.
- Deng, H., Huang, X., & Yuan, L. (2016). Molecular genetics of the COL2A1-related disorders. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 768, 1-13.
- Diaz-Horta, O., Abad, C., Sennaroglu, L., Foster, J., DeSmidt, A., Bademci, G., ... & Fitoz, S. (2016). ROR1 is essential for proper innervation of auditory hair cells and hearing in humans and mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(21), 5993-5998.
- Doetzlhofer, A., Basch, M. L., Ohyama, T., Gessler, M., Groves, A. K., & Segil, N. (2009). Hey2 regulation by FGF provides a Notch-independent mechanism for maintaining pillar cell fate in the organ of Corti. *Developmental cell*, 16(1), 58-69.
- Dror, A. A., & Avraham, K. B. (2009). Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annual review of genetics*, 43, 411-437.
- Dutton, K., Abbas, L., Spencer, J., Brannon, C., Mowbray, C., Nikaido, M., ... & Whitfield, T. T. (2009). A zebrafish model for Waardenburg syndrome type IV reveals diverse roles for Sox10 in the otic vesicle. *Disease models & mechanisms*, 2(1-2), 68-83.
- Freter, S., Muta, Y., Mak, S. S., Rinkwitz, S., & Ladher, R. K. (2008). Progressive restriction of otic fate: the role of FGF and Wnt in resolving inner ear potential. *Development*, 135(20), 3415-3424.
- Ghysen, A., & Dambly-Chaudiere, C. (2004). Development of the zebrafish lateral line. *Current opinion in neurobiology*, 14(1), 67-73.
- Gleason, M. R., Nagiel, A., Jamet, S., Vologodskaia, M., López-Schier, H., & Hudspeth, A. J. (2009). The transmembrane inner ear (Tmie) protein is essential for normal hearing and balance in the zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21347-21352.
- Guruharsha, K. G., Kankel, M. W., & Artavanis-Tsakonas, S. (2012). The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), 654-666.
- Haddon, C., & Lewis, J. (1996). Early ear development in the embryo of the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Comparative Neurology*, 365(1), 113-128.
- Haddon, C., Jiang, Y. J., Smithers, L., & Lewis, J. (1998). Delta-Notch signalling and the patterning of sensory cell differentiation in the zebrafish ear: evidence from the mind bomb mutant. *Development*, 125(23), 4637-4644.
- Hammond, K. L., Loynes, H. E., Folarin, A. A., Smith, J., & Whitfield, T. T. (2003). Hedgehog signalling is required for correct anteroposterior patterning of the zebrafish otic vesicle. *Development*, 130(7), 1403-1417.
- Hammond, K. L., van Eeden, F. J., & Whitfield, T. T. (2010). Repression of Hedgehog signalling is required for the acquisition of dorsolateral cell fates in the zebrafish otic vesicle. *Development*, 137(8), 1361-1371.
- Hammond, K. L., & Whitfield, T. T. (2011). Fgf and Hh signalling act on a symmetrical pre-pattern to specify anterior and posterior identity in the zebrafish otic placode and vesicle. *Development*, 138(18), 3977-3987.
- Han, Y., Mu, Y., Li, X., Xu, P., Tong, J., Liu, Z., ... & Meng, A. (2011). Grhl2 deficiency impairs otic development and hearing ability in a zebrafish model of the progressive dominant hearing loss DFNA28. *Human molecular genetics*, 20(16), 3213-3226.
- Heeringa, S. F., Chernin, G., Chaki, M., Zhou, W., Sloan, A. J., Ji, Z., ... & Killen, P. D. (2011). COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *The Journal of clinical investigation*, 121(5), 2013-2024.

- Hilgert, N., Smith, R. J., & Van Camp, G. (2009). Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics?. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(2), 189-196.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... & McLaren, S. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498.
- IBGE. Censo Populacional 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (<http://censo2010.ibge.gov.br/>).
- Itoh, M., & Chitnis, A. B. (2001). Expression of proneural and neurogenic genes in the zebrafish lateral line primordium correlates with selection of hair cell fate in neuromasts. *Mechanisms of development*, 102(1), 263-266.
- Kazmierczak, M., Harris, S. L., Kazmierczak, P., Shah, P., Starovoytov, V., Ohlemiller, K. K., & Schwander, M. (2015). Progressive hearing loss in mice carrying a mutation in Usp53. *Journal of Neuroscience*, 35(47), 15582-15598.
- Keats, B. J., & Berlin, C. I. (1999). Genomics and hearing impairment. *Genome research*, 9(1), 7-16.
- Kelley, M. W., Talreja, D. R., & Corwin, J. T. (1995). Replacement of hair cells after laser microbeam irradiation in cultured organs of corti from embryonic and neonatal mice. *Journal of Neuroscience*, 15(4), 3013-3026.
- Kiernan, A. E., Pelling, A. L., Leung, K. K., & Tang, A. S. (2005). Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature*, 434(7036), 1031.
- Kiernan, A. E., Xu, J., & Gridley, T. (2006). The Notch ligand JAG1 is required for sensory progenitor development in the mammalian inner ear. *PLoS genetics*, 2(1), e4.
- Kommareddi, P., Nair, T., Kakaraparthi, B. N., Galano, M. M., Miller, D., Laczkovich, I., ... & Kanicki, A. (2015). Hair Cell Loss, Spiral Ganglion Degeneration, and Progressive Sensorineural Hearing Loss in Mice with Targeted Deletion of Slc44a2/Ctl2. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 16(6), 695-712.
- Kwon, H. J. (2016). Vitamin D receptor deficiency impairs inner ear development in zebrafish. *Biochemical and biophysical research communications*, 478(2), 994-998.
- Lanford, P. J., Shailam, R., Norton, C. R., Ridley, T., & Kelley, M. W. (2000). Expression of Math1 and HES5 in the cochleae of wildtype and Jag2 mutant mice. *JARO-Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 1(2), 161-171.
- Lezirovitz, K., Braga, M. C. C., Thiele-Aguiar, R. S., Auricchio, M. T. B. M., Pearson, P. L., Otto, P. A., & Mingroni-Netto, R. C. (2009). A novel autosomal dominant deafness locus (DFNA58) maps to 2p12-p21. *Clinical genetics*, 75(5), 490-493.
- Lezirovitz, K., Batissoco, A. C., Lima, F. T., Auricchio, M. T., Nonose, R. W., dos Santos, S. R., ... & Mingroni-Netto, R. C. (2012). Aberrant transcript produced by a splice donor site deletion in the TECTA gene is associated with autosomal dominant deafness in a Brazilian family. *Gene*, 511(2), 280-284.
- Li, H., Kloosterman, W., & Fekete, D. M. (2010). MicroRNA-183 family members regulate sensorineural fates in the inner ear. *Journal of Neuroscience*, 30(9), 3254-3263.
- Li, J., Zhao, X., Xin, Q., Shan, S., Jiang, B., Jin, Y., ... & Xiao, J. (2015). Whole-Exome Sequencing Identifies a Variant in TMEM132E Causing Autosomal-Recessive Nonsyndromic Hearing Loss DFNB99. *Human mutation*, 36(1), 98-105.
- Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature reviews. Genetics*, 8(5), 353.
- Litsiou, A., Hanson, S., & Streit, A. (2005). A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head. *Development*, 132(18), 4051-4062.
- Ma, Z., Xia, W., Liu, F., Ma, J., Sun, S., Zhang, J., ... & Ma, D. (2017). SLC44A4 mutation causes autosomal dominant hereditary postlingual non-syndromic mid-frequency hearing loss. *Human molecular genetics*, 26(2), 383-394.

- Matsuda, M., & Chitnis, A. B. (2010). Atoh1a expression must be restricted by Notch signaling for effective morphogenesis of the posterior lateral line primordium in zebrafish. *Development*, 137(20), 3477-3487.
- Melchionda, S., Ahituv, N., Bisceglia, L., Sobe, T., Glaser, F., Rabionet, R., ... & Zelante, L. (2001). MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *The American Journal of Human Genetics*, 69(3), 635-640.
- Millimaki, B. B., Sweet, E. M., Dhason, M. S., & Riley, B. B. (2007). Zebrafish atoh1 genes: classic proneural activity in the inner ear and regulation by Fgf and Notch. *Development*, 134(2), 295-305.
- Montgomery, J., Carton, G., Voigt, R., Baker, C., & Diebel, C. (2000). Sensory processing of water currents by fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 355(1401), 1325-1327.
- Morsli, H., Choo, D., Ryan, A., Johnson, R., & Wu, D. K. (1998). Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. *Journal of Neuroscience*, 18(9), 3327-3335.
- Nicolson, T. (2005). The genetics of hearing and balance in zebrafish. *Annu. Rev. Genet.*, 39, 9-22.
- Ohyama, T., Mohamed, O. A., Taketo, M. M., Dufort, D., & Groves, A. K. (2006). Wnt signals mediate a fate decision between otic placode and epidermis. *Development*, 133(5), 865-875.
- Riccomagno, M. M., Martinu, L., Mulheisen, M., Wu, D. K., & Epstein, D. J. (2002). Specification of the mammalian cochlea is dependent on Sonic hedgehog. *Genes & Development*, 16(18), 2365-2378.
- Riccomagno, M. M., Takada, S., & Epstein, D. J. (2005). Wnt-dependent regulation of inner ear morphogenesis is balanced by the opposing and supporting roles of Shh. *Genes & development*, 19(13), 1612-1623.
- Romero-Carvajal, A., Acedo, J. N., Jiang, L., Kozlovskaja-Gumbrienė, A., Alexander, R., Li, H., & Piotrowski, T. (2015). Regeneration of sensory hair cells requires localized interactions between the Notch and Wnt pathways. *Developmental cell*, 34(3), 267-282.
- Rost, S., Bach, E., Neuner, C., Nanda, I., Dysek, S., Bittner, R. E., ... & Müller, C. R. (2014). Novel form of X-linked nonsyndromic hearing loss with cochlear malformation caused by a mutation in the type IV collagen gene COL4A6. *European Journal of Human Genetics*, 22(2), 208.
- Sai, X., & Ladher, R. K. (2015). Early steps in inner ear development: induction and morphogenesis of the otic placode. *Frontiers in pharmacology*, 6.
- Sanggaard, K. M., Kjaer, K. W., Eiberg, H., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Hoffman, K., ... & Tranebjærg, L. (2008). A novel nonsense mutation in MYO6 is associated with progressive nonsyndromic hearing loss in a Danish DFNA22 family. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 146(8), 1017-1025.
- Sapède, D., Dyballa, S., & Pujades, C. (2012). Cell lineage analysis reveals three different progenitor pools for neurosensory elements in the otic vesicle. *Journal of Neuroscience*, 32(46), 16424-16434.
- Shen, X., Liu, F., Wang, Y., Liu, F., Xia, W., Ma, J., Wang, H., Zhang, J., ... & Ma, D. (2015). Down-regulation of msrb3 and destruction of normal auditory system development through hair cell apoptosis in zebrafish. *International Journal of Developmental Biology*, 59(4-5-6), 195-203.
- Smith, R. J., Shearer, A. E., Hildebrand, M. S., & Van Camp, G. (2014). Deafness and hereditary hearing loss overview.
- Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., & Allis, C. D. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, 389(6647), 194.
- Stooke-Vaughan, G. A., Obholzer, N. D., Baxendale, S., Megason, S. G., & Whitfield, T. T. (2015). Otolith tethering in the zebrafish otic vesicle requires Otogelin and α -Tectorin. *Development*, 142(6), 1137-1145.
- Ueyama, T., Ninoyu, Y., Nishio, S. Y., Miyoshi, T., Torii, H., Nishimura, K., ... & Watanabe, N. (2016). Constitutive activation of DIA1 (DIAPH1) via C-terminal truncation causes human sensorineural hearing loss. *EMBO molecular medicine*, 8(11), 1310-1324.

Von Ameln, S., Wang, G., Boulouiz, R., Rutherford, M. A., Smith, G. M., Li, Y., ... & Borck, G. (2012). A mutation in PNPT1, encoding mitochondrial-RNA-import protein PNPase, causes hereditary hearing loss. *The American Journal of Human Genetics*, 91(5), 919-927.

Vona, B., Nanda, I., Hofrichter, M. A., Shehata-Dieler, W., & Haaf, T. (2015). Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future. *Molecular and cellular probes*, 29(5), 260-270.

Warchol, M. E. (2011). Sensory regeneration in the vertebrate inner ear: differences at the levels of cells and species. *Hearing research*, 273(1), 72-79.

Whitfield, T. T., Riley, B. B., Chiang, M. Y., & Phillips, B. (2002). Development of the zebrafish inner ear. *Developmental dynamics*, 223(4), 427-458.

Willems, P. J. (2000). Genetic causes of hearing loss. *New England Journal of Medicine*, 342(15), 1101-1109.

Wu, D. K., & Kelley, M. W. (2012). Molecular mechanisms of inner ear development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(8), a008409.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-2.0/>

<http://www.ensembl.org/index.html>

<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

<http://hereditaryhearingloss.org/>

<http://www.internationalgenome.org/>

<http://www.mousephenotype.org/>

<http://www.mutationtaster.org/>

<http://primer3.ut.ee/>

<http://research.nhgri.nih.gov>

<https://shield.hms.harvard.edu>

<https://sites.google.co.uk/a/sheffield.ac.uk/whitfield-lab/home>

<http://sift.jcvi.org/>

<https://swissmodel.expasy.org/>

<http://www.who.int/>

<http://zfin.org/>

<http://zifit.partners.org/ZiFiT/CSquare9Nuclease.aspx>