LARISSA REIS DO NASCIMENTO

Modelos animais como ferramenta para análise do perfil de expressão de genes
associados à surdez

Versão Corrigida

(Resolução CoPGr 6018/11 de 01 de novembro de 2011. A versão original está
disponível na Biblioteca da FMUSP)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Otorrinolaringologia

Orientadora: Dra. Karina Lezirovitz Mandelbaum

Coorientadora: Dra. Ana Carla Batissoco

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Nascimento, Larissa Reis do

Modelos animais como ferramenta para análise do
perfil de expressão de genes associados à surdez /
Larissa Reis do Nascimento. -- São Paulo, 2021.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Otorrinolaringologia.

Orientadora: Karina Lezirovitz Mandelbaum.

Coorientador: Ana Carla Batissoco.

Descritores: 1.Perda auditiva hereditária
2.Peixe-zebra 3.Análise de expressão 4.Hibridização
in situ 5.Camundongo 6.Expressão gênica

USP/FM/DBD-141/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: NASCIMENTO, Larissa Reis do

Título: Modelos animais como ferramenta para análise do perfil de expressão de genes associados à surdez.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico

A minha família, em especial Helenita, José Nilton, Augusto e Silvia, com amor e carinho por toda atenção, auxílio, compreensão e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Karina Lezirovitz Mandelbaum, Pesquisadora Científica do Laboratório de Investigação Médica (LIM-32) e minha orientadora, pelo apoio, ensinamentos, pelas discussões científicas, ideias, correções, orientação e por me proporcionar crescimento intelectual e científico.

À Dra. Ana Carla Batissoco, Pós-Doutoranda do Departamento de Otorrinolaringologia da FMUSP e minha co-orientadora, pelo apoio, ensinamentos, pelas discussões científicas, ideias, correções, orientação e por me proporcionar crescimento intelectual e científico.

À Faculdade de Medicina da USP, Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP e Profa. Dra. Jeanne Oiticica Ramalho Ferraz, Médica Assistente do Departamento de Otorrinolaringologia e Chefe do Laboratório de Investigação Médica (LIM 32), por cederem o espaço físico para realização dos experimentos, bem como a oportunidade de obter grande conhecimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Profa. Dra. Maria Rita Passos e Bueno, por permitir a utilização do Laboratório de *Zebrafish* e aos seus alunos que sempre se prontificaram em ajudar no que fosse preciso.

À Profa. Dra. Maria Vbranovski, por permitir a utilização do Vbranovski Lab, onde pude realizar boa parte das minhas enriquecedoras discussões científicas ao lado de seus alunos, bem como, pela permissão em utilizar o estereomicroscópio para a captura das imagens de hibridização *in situ* desse estudo.

Aos meus pais Helenita e José Nilton, sogra Silvia e meu esposo Augusto, por todo companheirismo, paciência, incentivo moral e financeiro, assim como, por terem me apoiado durante a realização desse estudo, suportando inclusive, os longos períodos de distância.

À Camila Correia Avelino por todos os conselhos, risadas, amizade e acima de tudo, por estar ao meu lado em uma das fases mais desafiadoras da minha vida, me dando apoio e sustentação.

Aos pós-graduandos Gleiciele Alice Vieira Silva, Juliana Sampaio Silva e Rodrigo Salazar Silva por todos os conselhos, amizade e pelo apoio incondicional de suma importância tanto na execução de algumas etapas desse estudo, quanto nas inúmeras discussões científicas proveniente destes.

Aos meus amigos, Carolina Mendonça, Poliane Cristina, Joseanne Saldanha, Lorrainy Freitas, Dângella Venâncio, Ana Farias, Camilla Faria, Luciano Oride, Mário Kang e os membros do Grupo Forever por todas as vezes em que suas palavras me fizeram refletir sobre diversos aspectos, enriquecendo e amadurecendo não apenas o meu eu pessoal, como minha percepção como cientista.

Normatização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. – São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação - DBD/FMUSP, 2011.

Referências bibliográficas estão de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT.

RESUMO

Nascimento LR. *Modelos animais como ferramenta para análise do perfil de expressão de genes associados à surdez* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A perda auditiva é o déficit sensorial mais comum em humanos, afetando cerca de 466 milhões em todo o mundo. O grande número de genes envolvidos na perda auditiva reflete a complexidade dos mecanismos moleculares subjacentes. Portanto, a identificação e caracterização desses genes em modelos animais aperfeiçoam o conhecimento da fisiologia auditiva. Entre os loci cuja validação funcional dos genes candidatos à perda auditiva está em andamento há o locus DFNA58 (2p12-21) mapeado por nossa equipe em uma grande família brasileira com 12 indivíduos afetados por perda auditiva neurosensorial autossômica dominante pós-lingual e progressiva. Uma duplicação genômica de ~ 200 Kb, incluindo três genes codificadores de proteínas (*PLEK*, *CNRIP1* e exon 1 do *PPP3R1*) foi recentemente mapeada na região cromossômica candidata (2p14) segregando com a perda auditiva. Este estudo teve como objetivo determinar se esses genes candidatos codificadores de proteínas desempenham um papel na audição por meio da caracterização de sua expressão ortóloga na orelha interna do *zebrafish* (*Cnrip1a*, *Cnrip1b*, *Ppp3r1a*, *Ppp3r1b* e *Plek*). A hibridização *in situ* mostrou expressão dos genes *Cnrip1a*, *Cnrip1b* e *Ppp3r1a* no cérebro em 5 dpf e 30 dpf e expressão do gene *Plek* a 5 dpf. A expressão de *Ppp3r1a*, *Cnrip1b* e *Plek* foi observada na vesícula ótica a 5 dpf, e a expressão de *Ppp3r1a* e *Cnrip1a* foi detectada na orelha interna a 30 dpf. Os dados de RT-qPCR confirmaram uma expressão mediana dos genes ortólogos na orelha interna, exceto para *Cnrip1b* com baixa expressão, e *Cnrip1a* apresentou expressão mais significativa no utrículo+lâmina do que os outros genes e tecidos. Além disso, *Cnrip1a* se destacou na reanálise dos dados do transcriptoma por meio de sua expressão diferencial significativamente maior nas células ciliadas da orelha interna do *zebrafish* do que nas células vizinhas. No entanto, os dados do transcriptoma de camundongos mostraram que a expressão de *Cnrip1* era diferencialmente maior nos neurônios do gânglio espiral do que em outras células cocleares. Resumindo, uma ordem de relevância foi atribuída em relação à participação desses genes na audição do *zebrafish*: *Cnrip1a*, *Ppp3r1a*, *Ppp3r1b*, *Plek* e *Cnrip1b*. Notavelmente, *Cnrip1a* parecia mais relacionado ao neuroepitélio sensorial. Portanto, deve ter uma função essencial nessas estruturas. A imunofluorescência confirmou a expressão do *Cnrip1* e *Ppp3r1* na inervação sensorial periférica, vesícula ótica, olhos e neuromastos do *zebrafish*. Em conclusão, nossos resultados destacam o *Cnrip1* como o melhor candidato a ter papel relevante na fisiologia auditiva e

sua importância na audição parece ter permanecido conservada, embora deva ter mudado ao longo da evolução em relação aos tipos de células.

Descritores: Perda auditiva hereditária; Peixe-zebra; Análise de expressão; Hibridização *in situ*; Camundongo; Expressão gênica.

ABSTRACT

Nascimento LR. *Animal models as a tool for analyzing the expression profile of genes associated with deafness* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Hearing loss is the most common sensory deficit in humans, affecting about 466 million worldwide. The vast number of genes involved in hearing loss reflects the complexity of the underlying molecular mechanisms. Therefore, the identification and characterization of these genes in animal models enhance auditory physiology knowledge. Among the loci whose candidate genes are under functional validation is the DFNA58 (2p12-21) locus mapped by our team in a large Brazilian family with 12 individuals affected by autosomal dominant post-lingual progressive sensorineural hearing loss. A ~ 200 Kb genomic duplication, including three protein-coding genes (*PLEK*, *CNRIP1*, and *PPP3R1*'s exon1), was recently mapped within the candidate chromosomal region (2p14) and segregates with hearing loss. This study aimed to determine whether these candidate genes play a role in hearing by characterizing of their orthologous' expression in the zebrafish inner ear (*Cnrip1a*, *Cnrip1b*, *Ppp3r1a*, *Ppp3r1b*, and *Plek*). In situ hybridization showed *Cnrip1b*, *Cnrip1a*, and *Ppp3r1a* expression in the brain at 5 dpf and 30 dpf; and *Plek* gene expression at 5 dpf. *Ppp3r1a*, *Cnrip1b*, and *Plek* expression were observed in the otic vesicle at 5 dpf, and *Ppp3r1a* and *Cnrip1a* expression were detected in the inner ear at 30 dpf. The RT-qPCR data confirmed a median expression of the orthologous genes in the inner ear, except for *Cnrip1b* with low expression, and *Cnrip1a* showed more significant expression in the lagena + utricle than the other genes and tissues. In addition, *Cnrip1a* stood out in the reanalysis of the public transcriptome data through its differential expression, significantly higher in the zebrafish inner ear hair cells than their neighbor cells. However, the mice transcriptome data showed that *Cnrip1* expression was differentially higher in spiral ganglion neurons than other cochlear cells. Summarizing, the following relevance hierarchy was assigned regarding the participation of these genes in the zebrafish hearing: *Cnrip1a*, *Ppp3r1a*, *Ppp3r1b*, *Plek*, and *Cnrip1b*. Remarkably *Cnrip1a* seemed more closely related to sensory neuroepithelium. Therefore, it must have an essential function in these structures. Immunofluorescence confirmed *Cnrip1* and *Ppp3r1* expression in the zebrafish peripheral sensory innervation, otic vesicle, eyes, and neuromasts. In conclusion, our results highlight *Cnrip1* as the best candidate for a relevant role in auditory physiology, and its importance in hearing seems to have remained conserved, even though it must have changed throughout evolution concerning cell types.

Descriptors: Hereditary hearing loss; Zebrafish; Expression analysis; In situ hybridization; Mice; Gene expression.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Array-CGH – do inglês, *Comparative Genome Hybridization*

BCIP – 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato

BSA – do inglês, *Bovine Serum Albumin*

BN – Bexiga Natatória

cDNA – do inglês, *complementary DNA*

CCs – Células ciliadas

CCEs – Células ciliadas externas

CCIs – Células ciliadas internas

CCs – Células de suporte

CER – Cérebro

CNVs – do inglês, *Copy Number Variation*

COR – Coração

Ct – do inglês, *Cycle Threshold*

DFN – do inglês, *DeaFNess*

DNA – do inglês, *Deoxyribonucleotide Acid*

DNase – Deoxirribonuclease

dNTP – do inglês, *Deoxyribonucleotide Triphosphates*

DPF – Dias Pós-Fertilização

DIG – Digoxigenina

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LL – Linha Lateral

LLA – Linha Lateral Anterior

LLP – Linha Lateral Posterior

LG+UT – Lagna+utrículo

NBT – do inglês, *4-nitrozaul de tetrazólio*

NCBI – do inglês, *National Center for Biotechnology Information*

NFH – Cadeia pesada do neurofilamento

OI – Orelha interna

OMIM – do inglês, *Online Mendelian Inheritance in Man*

PA – Perda Auditiva

PBS – do inglês, *Phosphate Tampãoed Saline*

PCR – do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

RT-PCR – do inglês, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

RT-qPCR – do inglês, *Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*, também conhecido como *Reverse Transcription Real-Time Polymerase Chain Reaction*

RNA – do inglês, *Ribonucleotide Acid*

RNA_m – RNA mensageiro

SAG – Gânglio estado- acústico

SGN – Neurônios do gânglio espiral

SPF – Semanas Pós-Fertilização

SSC – do inglês, *Sodium Saline Citrate*

VO – Vesícula ótica

WHO – do inglês, *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 Perda auditiva hereditária	4
3.2 Utilização de modelos animais para elucidação do papel de novos genes associados a PA hereditária: Morfologia e fisiologia dos mecanismos mecanossensoriais da audição.....	6
3.2.1 Camundongo (<i>Mus musculus</i>)	7
3.2.2 Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	10
3.3.3 Contribuição dos modelos animais Camundongo e Zebrafish para elucidação do papel de novos genes associados a PA hereditária	16
3.3 O locus DFNA58 e os seus genes candidatos à PA.....	21
3.4 Genes em estudo.....	25
3.4.1 Gene <i>CNRIP1</i>	25
3.4.2 Gene <i>PPP3RI</i>	27
3.4.3 Gene <i>PLEK</i>	28
3.5 Transcriptomas da OI e reuso dos dados depositados em repositórios públicos.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	31
4.1.1 Eutanásia e obtenção dos tecidos.....	32
4.1.1.2 Eutanásia.....	32
4.1.1.3 Obtenção dos tecidos por intermédio de dissecação para construção das sondas utilizadas na hibridização in situ e para análises de qPCR.....	33
4.1.2 Extração de RNA do Zebrafish e síntese de cDNA	35
4.1.2.1 Extração de RNA.....	35

4.1.2.2 Síntese de cDNA	36
4.1.3 Hibridização <i>in situ</i> (Protocolo THISSE; THISSE, 2008)	36
4.1.3.1 Obtenção do DNA molde para a sonda	37
4.1.3.2 PCR dos trechos de cDNA para obtenção das sondas de RNA	38
4.1.3.3 Transcrição <i>in vitro</i> e purificação de sonda de RNAm	39
4.1.3.4 Preparação dos espécimes	40
4.1.3.5 Permeabilização e Pré-hibridação	40
4.1.3.6 Hibridação	41
4.1.3.7 Bloqueio, anti-DIG e revelação cromogênica	41
4.1.3.8 Adaptações no protocolo de hibridização <i>in situ</i> - (Protocolo do Laboratório Varshney)	42
4.1.4 Imunofluorescência Indireta	44
4.1.4.1 Preparo do tecido	44
4.1.4.2 Imunofluorescência Indireta	44
4.1.5 PCR em tempo real quantitativo (RT-qPCR)	45
4.2 Critérios para análise dos dados de transcriptoma do <i>zebrafish</i> e camundongo	48
5. RESULTADOS	49
5.1 Hibridização <i>in situ</i>	49
5.1.1 Gene <i>Cnrip1b</i> (Protocolo do Laboratório Varshney)	50
5.1.1.1 Espécimes no estágio larval (5 dpf)	50
5.1.1.2 Espécimes no estágio Juvenil (30 dpf)	50
5.1.2 Gene <i>Cnrip1a</i> (Protocolo do Laboratório Varshney)	56
5.1.2.1 Espécimes no estágio larval (5 dpf)	56
5.1.2.2 Espécimes no estágio Juvenil (30 dpf)	56
5.1.3 Gene <i>Ppp3r1a</i> (Protocolo do Laboratório Varshney)	59
5.1.3.1 Espécimes no estágio larval (5 dpf)	59
5.1.3.2 Espécimes no estágio Juvenil (30 dpf)	59

5.1.4 Gene <i>Plek</i> (Protocolo do Laboratório Varshney)	59
5.1.4.1 Espécimes no estágio larval (5 dpf).....	59
5.1.4.2 Espécimes no estágio Juvenil (30 dpf)	59
5.1.5 Visão geral do padrão de expressão dos genes: <i>Cnrip1a</i> , <i>Cnrip1b</i> , <i>Plek</i> e <i>Ppp3r1a</i> nos estágios de desenvolvimento 5 e 30 dpf.....	64
5.2 Imunofluorescência	64
5.2.1 <i>Cnrip1a/Cnrip1b</i>	64
5.2.2 <i>Ppp3r1a/Ppp3r1b</i>	73
5.3 Estudo dos níveis de RNAm dos genes candidatos ao DFNA58, comparação com outros genes com expressão já caracterizada	73
5.3.1 RT-qPCR	73
5.3.1.1 Confirmação da especificidade dos <i>primers</i> dos genes	74
5.3.1.2 Eficiência dos <i>primers</i>	78
5.3.1.3 Genes de referência	78
5.3.1.4 Comparação entre os níveis de expressão dos genes de estudo em relação ao valor de Cts	79
5.3.1.5 Comparação entre os níveis de expressão do RNAm entre os genes de estudo em diferentes tecidos	81
5.3.2 Transcriptoma – Reanálise dos dados previamente descritos na literatura	87
5.3.2.1 <i>Zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>)	87
5.3.2.2 Camundongo (<i>Mus musculus</i>)	94
6. DISCUSSÃO	99
6.1 Possível papel de destaque dos genes <i>Cnrip1a</i> (<i>Zebrafish</i>) e <i>Cnrip1</i> (Camundongo) na PA	104
6.2 Possível papel de destaque dos genes <i>Ppp3r1a</i> (<i>Zebrafish</i>) e <i>Ppp3r1</i> (Camundongo) na PA	105
6.3 Possível papel de destaque do gene <i>Plek</i> (<i>Zebrafish</i> e Camundongo) na PA.....	Erro!
Indicador não definido.	
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	108

8. CONCLUSÃO.....	109
9. REFERÊNCIAS	111

1. INTRODUÇÃO

A perda auditiva (PA) é o déficit sensorial mais comum em humanos e que resulta na restrição das habilidades de se comunicar verbalmente, interferindo no convívio social dos portadores, uma vez que intervém diretamente no desenvolvimento da linguagem, comunicação interpessoal, fala e aprendizagem, podendo afetar o desenvolvimento escolar e/ou profissional e em adultos pode estar associada ao declínio cognitivo e depressão (MULROW *et al.*, 1990; CACCIATORE *et al.*, 1999).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), cerca de 466 milhões de pessoas no mundo (432 milhões de adultos e 34 milhões de crianças) têm PA e as estimativas preveem um aumento significativo para mais de 2,5 bilhões de pessoas afetadas até 2050 (WHO, 2021). Segundo o último censo realizado pelo IBGE em 2010, foi identificado que 5,1% da população brasileira sofria de PA de algum tipo ou grau, o que corresponde a aproximadamente 9,7 milhões de portadores de PA a em uma população, à época de 190 milhões de habitantes. Ao que se refere a idade, aproximadamente 1 milhão desses seriam crianças e jovens de até 19 anos.

No Brasil, a prevalência de PA em pessoas com idade inferior a 60 anos vem sendo evidenciada em diversos estudos com coorte de determinadas regiões do país. Entretanto, ainda não foram relatados dados que contemplem toda a população brasileira e que demonstrem estatisticamente essa prevalência. Contudo, cabe citar um estudo realizado na cidade de São Paulo que apontou uma prevalência de 11.2% de PA em indivíduos com mais de 60 anos (PAIVA *et al.*, 2011). Todavia, podemos ter como exemplo a prevalência encontrada na população dos Estados Unidos, em que aproximadamente 15% dos adultos com 18 anos ou mais, relatam ter algum tipo de PA (HOFFMAN *et al.*, 2016).

Uma em cada mil crianças nasce surda ou apresentará PA de grau severo ou profundo durante o período pré-lingual (antes da aquisição da fala) em países desenvolvidos. No Brasil, essa frequência pode atingir três ou quatro a cada mil nascimentos, devido a maior influência de fatores ambientais, como por exemplo: rubéola materna, citomegalovírus, meningite e exposição a drogas ototóxicas. No entanto, esse quadro tende a diminuir com a melhoria no sistema de saúde em relação aos cuidados com a saúde materna e infantil, o que aumenta progressivamente a proporção de casos de origem genética. A frequência de PA de etiologia genética chega a 60% em países desenvolvidos, enquanto em países em desenvolvimento, como

o Brasil, esse número pode ser inferior, em virtude da maior contribuição de fatores ambientais (PETIT; LEVILLIERS; HARDELI, 2001).

Porém, com a melhoria das condições de saúde nas últimas décadas, temos observado uma frequência de aproximadamente 40% de etiologia genética dentre os casos de PA pré-lingual e estimamos frequência semelhante nos casos de PA pós-lingual (após a aquisição da fala), oriundos de diversas partes do Brasil, averiguados em nosso Ambulatório de Surdez Genética (HC-FMUSP) [BATISSOCO *et al.* 2021 manuscrito em preparação].

A PA não-sindrômica é extremamente heterogênea tanto em relação à manifestação clínica (idade que se inicia, progressão e características audiológicas) quanto à sua etiologia. Atualmente, aproximadamente 120 genes e inúmeros fatores ambientais já foram associados a ela (SMITH *et al.*, 2012; VAN CAMP; SMITH, 2021).

Já foram mapeados 66 *loci* associados à PA não-sindrômica de herança autossômica dominante, porém apenas 47 deles tiveram seus genes identificados, atestando que a identificação e validação funcional dos genes responsáveis por ocasionar a PA não é trivial. Dentre os *loci* cuja a validação funcional dos genes responsáveis por ocasionar a PA ainda está em andamento, há o locus DFNA58, mapeado por LEZIROVITZ *et al.* (2009), na região cromossômica 2p12-21, por meio de estudos de ligação em uma grande família brasileira com 12 indivíduos afetados por PA não-sindrômica. Recentemente, nos indivíduos afetados desta família, foi identificada uma duplicação de cerca de 200 Kb da dentro da região cromossômica candidata mapeada (2p14), que inclui dois genes inteiros codificadores de proteína (genes *PLEK* e *CNRIP1*), parte do gene *PPP3R1* e de um novo gene não caracterizado (exons 1 e 2) e quatro genes preditos de RNA longo não codificante (lncRNA) não caracterizados: *AC017083.1*, *LOC107985892*, *LOC102724389* e *LOC101927723/AC015969.1-201* (LEZIROVITZ *et al.*, 2020). Por meio de análise quantitativa do RNAm (RT-qPCR) foi observada uma superexpressão do gene *CNRIP1*, bem como, de dois dos lncRNAs (*LOC107985892* e *LOC102724389*) e também a presença de transcritos de fusão heterogêneos quanto a sequência, mas que continham regiões codificadoras dos genes *CNRIP1* e *PPP3R1*, além de uma região intergênica entre *PLEK* e *CNRIP1*. Tanto os ensaios de hibridização *in situ* (*Cnrip1*, *Ppp3r1* e *Plek*) quanto de imunofluorescência mostraram que esses genes ou as proteínas codificadas por eles estão expressos nos neurônios do gânglio espiral, embora *Cnrip1* com maior intensidade e tanto em camundongos neonatos quanto adultos, com destaque para os neurônios do tipo II. Marcação menos expressiva foi observada na idade adulta para os três genes no órgão de Corti e outros grupos celulares.

Além de conhecer mais sobre a biologia humana, as pesquisas em genética de PA têm o objetivo final de construir os alicerces para o desenvolvimento de terapias que restaurem a audição, independente da etiologia da PA. Determinar perfis de expressão de genes candidatos à ocasionar perda de audição são fundamentais neste caminho até a terapia gênica propriamente dita, como excepcionalmente ilustrado pelo estudo de TAIBER *et al.* (2021) no qual, os pesquisadores demonstraram por meio de terapia gênica o resgate da audição a níveis próximos aos normais, em camundongos portando PA progressiva decorrente do *knockout* do gene *Syne4*. Para contribuir na elucidação do papel dos genes *Cnrip1*, *Plek* e *Ppp3r1* na audição, o nosso estudo, teve como objetivo verificar a expressão dos mesmos nas estruturas auditivas no modelo animal *zebrafish* (*Danio rerio*) e reanalisar os dados já disponíveis na literatura quanto ao transcriptoma visando obter dados preliminares para ensaios mais robustos futuramente.

Cabe dizer que um dos maiores obstáculos nos estudos genéticos e moleculares na PA é a dificuldade de acesso à cóclea e às demais estruturas da orelha interna (OI) humana e que o *zebrafish*, no decorrer dos anos, tem se tornado um importante modelo não mamífero para o estudo da PA humana de origem genética graças ao fato de seu genoma estar todo sequenciado e apresentar grande homologia dos genes associados a audição em mamíferos, do fácil acesso e acompanhamento do desenvolvimento embrionário em virtude de sua transparência durante o estágio larval e a fácil visualização *in vivo* dos dois órgãos relacionados a audição e equilíbrio: a OI e a linha lateral (LL). Por isso, sua utilização em estudos de expressão gênica é fundamental para validar funcionalmente os genes candidatos a causar PA bem como para auxiliar na identificação da complexa rede de genes envolvidos na fisiologia auditiva, o que pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de terapias eficientes para o reestabelecimento da audição.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Dado que os genes *CNRIP1*, *PPP3R1* e *PLEK* são candidatos a explicar a PA na família DFNA58 é necessário verificar se eles possuem padrão de expressão nos órgãos mecanossensoriais e se são conservados durante a evolução quanto ao papel relacionado à audição em diferentes modelos animais. Por isso, este estudo teve como objetivo geral, investigar a expressão desses genes na OI e em outras estruturas associadas a audição no *zebrafish* de diferentes idades.

Com esses resultados, será possível a médio prazo, delinear estratégias experimentais que possam contribuir na caracterização da patofisiologia associada a PA do DFNA58.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Investigar o padrão de expressão do RNAm dos genes *Cnrip1a*, *Cnrip1b*, *Plek* e *Ppp3r1a* na vesícula ótica (VO) de espécimes de *zebrafish* com 5 dias pós-fertilização (dpf) e na OI e LL dos espécimes com 30 dpf por meio de hibridização *in situ* em animal inteiro.
- b) Investigar a expressão das proteínas codificadas pelos genes *Cnrip1*, *Plek* e *Ppp3r1* na VO e LL de larvas 4 – 7 dpf por meio de imunofluorescência indireta.
- c) Investigar o padrão de expressão de RNAm dos genes *Cnrip1a*, *Cnrip1b*, *Plek*, *Ppp3r1a* e *Ppp3r1b* do *zebrafish* em diferentes órgãos de espécimes adultos: OI (inteira), OI (utrículo +lagena), cérebro, coração e bexiga natatória, por meio de PCR em tempo real.
- d) Investigar o padrão de expressão dos genes *Cnrip1*, *Plek* e *Ppp3r1* por meio da análise dos dados brutos de transcriptomas de modelos animais, como *zebrafish* e camundongo, depositados no NCBI GEO (*Gene Expression Omnibus*) ou disponibilizados em materiais suplementares de artigos científicos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Perda auditiva hereditária

A PA pode ser classificada segundo a sua manifestação clínica (sindrômica ou não-sindrômica), etiologia (genética, ambiental ou multifatorial), idade de manifestação (pré-lingual ou pós-lingual), lateralidade (uni ou bilateral), origem do defeito (sensorineural, condutiva ou mista), evolução (progressiva ou estacionária), frequências atingidas (graves, médias ou agudas) e a gravidade que é classificada conforme o valor da perda em decibéis, em leve (de 26 a 40 dB), moderada (de 41 a 65 dB), severa (de 65 a 95 dB) e profunda (acima de 95 dB) (DAVIS; SILVERMAN, 1970; WHO, 2021).

Estima-se que, em países desenvolvidos, dentre os inúmeros casos relatados de PA, cerca de 60% são de etiologia hereditária, 30% decorrente de fator ambiental e 10% de etiologia idiopática (BITNER-GLINDZICZ, 2002; VAN LAER *et al.*, 2003; PIATTO *et al.*, 2005). Os casos de etiologia hereditária podem acarretar em quadros clínicos sindrômicos, quando a PA é acompanhada de outras manifestações clínicas e não-sindrômicos, onde aparece de forma isolada, responsáveis por 30% e 70% dos casos, respectivamente (BITNER-GLINDZICZ, 2002).

Em PA não-sindrômica, os *loci* se referem a uma região cromossômica candidata a conter um ou mais genes associados à PA, sendo nomeados de DFN (do inglês *DeaFNess*) seguido de uma letra de acordo com o padrão de herança, sendo DFNA associado à PA autossômica dominante e DFNB, autossômica recessiva. Existem também os *loci* que estão localizados no cromossomo X, designados por DFNX (anteriormente DFN) e um único *locus* mapeado, até o momento, no cromossomo Y designado por DFNY e são numerados de acordo com sua ordem de descoberta (VAN CAMP; SMITH, 2021). Na tabela 1, estão descritos todos os mecanismos de herança já identificados em PA não-sindrômica, associados aos seus quadros clínicos mais frequentemente observados, bem como o número de *loci* conhecidos e os genes que já foram identificados para cada um deles. Dentre os casos de PA não sindrômica, o padrão de herança autossômico recessivo corresponde a 75-80% destes, seguido pelo padrão de herança autossômico dominante (10-20%) e 1,5% dos casos relacionados a herança ligada ao cromossomo X (VAN LAER *et al.*, 1999; ZANCHETTA *et al.*, 2000; GODINHO *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2014).

Tabela 1: Resumo dos mecanismos de herança da PA não-sindrômica, o quadro clínico, *loci* e genes associados.

Herança	Frequência nos casos hereditários	Tipo do defeito	Idade de Manifestação	Evolução	Nº de <i>loci</i> mapeados	Nº de genes identificados
DFNB Recessiva	~75%	sensorineural	pré-lingual	estacionária	96	76
DFNA Dominante	~20%	sensorineural	pós-lingual	progressiva	66	47
DFNX	~1%	sensorineural ou misto	pré e pós-lingual	Estacionária/progressiva	6	5
Materna/ Mitocondrial	~1%	sensorineural	Variável	progressiva	----- -	2
DFNY	?	sensorineural	pós-lingual	progressiva	?	?

Até o momento 170 *loci*, com cerca de 123 deles com genes identificados, já foram descritos envolvidos nos casos de PA não-sindrômica (VAN CAMP; SMITH, 2021). Estimativas apontam que este número possa atingir 300 genes, isto é, 1% do genoma humano conteria genes de perda auditiva, o que é em parte corroborado pelo número de *loci* já mapeados, mas que os genes correspondentes ainda não foram identificados (NANCE *et al.*, 2003; VAN CAMP; SMITH, 2021).

A extensa quantidade de genes envolvidos nos casos de PA (que codificam proteínas que, atuam na manutenção da homeostasia iônica da cóclea, estruturais, motoras, fatores de transcrição, dentre outros) (HILGERT; SMITH; CAMP *et al.*, 2009), reflete a complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos na audição, portanto, a identificação e caracterização de genes responsáveis pela PA é uma ferramenta importante que promove diversos benefícios, como permitir um diagnóstico mais apurado em relação ao defeito genético que predispõe a PA no indivíduo, um aconselhamento genético mais preciso para as famílias, além de conhecimento sobre os mecanismos moleculares e fisiopatológicos, entendimento de novas vias biológicas, descoberta de novos alvos terapêuticos em potencial e a possibilidade de desenvolvimento de tratamentos com base no mecanismo biológico.

Os modelos animais tais como o *zebrafish* e o camundongo (*Mus musculus*) viabilizam uma maior compreensão e obtenção de informações, tanto do funcionamento individual desses genes, quanto de sua interação com demais genes que podem estar associados a outras funções de suma importância em outras vias metabólicas.

3.2 Utilização de modelos animais para elucidação do papel de novos genes associados a PA hereditária: Morfologia e fisiologia dos mecanismos mecanossensoriais da audição

Mediada pela orelha, o órgão auditivo, a percepção dos estímulos sonoros no subfilo Vertebrata ocorre por meio do mecanismo de mecanotransdução presente na OI. A OI se desenvolve por meio de um processo altamente dinâmico, no qual, neurônios, epitélios sensoriais e não sensoriais se originam de um espessamento do placóide ótico ectodérmico próximo ao rombencéfalo, conhecido como região pré-placóide (PPR, do inglês, *Preplacodal Region*). A partir da região pré-placóide se forma o placóide ótico que 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 HADDON; LEWIS, 1996), formando o primórdio da OI, denominado de VO ou otocisto, que, posteriormente, irá dar origem os órgãos sensitivos do equilíbrio e da audição plenamente desenvolvidos (GOU *et*

al., 2018). Por isso, apesar de apresentarem diferenças estruturais dentre os vertebrados, a OI possui mecanismos, componentes celulares e moleculares conservados dentre os mais variados grupos de vertebrados (LIEM *et al.*, 2012; SAI; LADHER, 2015).

3.2.1 Camundongo (*Mus musculus*)

Uma das espécies mais utilizadas para testar hipóteses levantadas em estudos funcionais sobre genes relacionados à audição são sem dúvidas os camundongos, cuja semelhança estrutural e fisiológica do seu sistema auditivo em relação ao humano, associada à elevada similaridade genética (99% dos genes de camundongos têm ortólogos humanos e 80% dos genes humanos têm ortólogo em camundongo), auxiliam na elucidação do papel destes genes na via auditiva (WATERSTON *et al.*, 2002; BROWN; HARDISTY-HUGHES; MBURU, 2008).

O órgão auditivo dos mamíferos pode ser dividido em três principais regiões anatômicas quanto a sua morfologia e função: orelhas externa, média e interna (Figura 1A). A orelha externa, composta pelo pavilhão auditivo e pelo canal auditivo externo, tem como função captar as ondas sonoras e conduzi-las pelo canal auditivo até o tímpano, uma membrana que constitui a fronteira entre as orelhas externa e média. Na orelha média se encontram os três ossículos (martelo, bigorna e estribo), que possuem a função de conduzir a vibração das ondas sonoras até a OI. Esses ossículos se encontram em uma cavidade preenchida por ar, que assim como a OI, se encontram dentro da porção petrosa do osso temporal.

Por sua vez, a OI também abriga o sistema vestibular, conjunto de estruturas (utrículo, sáculo e canais semicirculares) preenchidas por perilinfa (K^+ 3,5 mM, Na^+ 140 mM, Ca^{2+} 1 mM) responsáveis pelo equilíbrio e a cóclea, um canal ósseo membranoso em forma de caracol, dividido em três dutos preenchidos por fluidos: as escalas vestibular e timpânica preenchidas pela perilinfa e a escala média ou duto coclear preenchida por endolinfa (K^+ cerca de 150 mM, sódio 1 mM e cálcio 0,02 mM). O duto coclear abriga um fino epitélio sensorial, o órgão de Corti (Figura 1B), responsável pela mecanotransdução dos estímulos sonoros em impulsos elétricos. Localizado sobre a membrana basilar, o órgão de Corti apresenta três fileiras de células ciliadas externas (CCEs) e uma fileira única de células ciliadas internas (CCIs) cobertas por uma membrana acelular chamada de tectorial, e também há as células de suporte (CSs) que ficam ao redor das células ciliadas (CCs) (Figura 1B e 1C). Enquanto as CCIs são os receptores sensoriais, as CCEs, graças às suas propriedades eletrobiomecânicas, exercem papel de destaque na amplificação do estímulo e na capacidade de discriminação de frequências. Já as CSs, atuam tanto na formação de uma barreira secundária impedindo a difusão da perilinfa para

a superfície apical das CCs, quanto na manutenção da homeostase iônica auxiliando na reciclagem de íons K^+ visando preparar o sistema para responder a um novo estímulo sonoro (PETIT *et al.*, 2001; SAMPAIO; OLIVEIRA, 2006; WANGEMANN, 2006; DROR; AVRAHAM, 2009).

Localizado abaixo do órgão de Corti e próximo as CCs, o gânglio espiral apresenta neurônios bipolares ou pseudounipolares, com seus axônios periféricos terminando nas CCs e axônios centrais se projetando ao núcleo coclear no interior do tronco cerebral, e são de dois tipos: tipo I que inervam as CCIs e representam 90% dos neurônios e tipo II, que inervam as CCEs (ZHANG; COATE, 2017). Há também duas classes de inervação eferente na cóclea, ambas proporcionando *feedback* inibitório e excitatório e que se originam no complexo olivar superior e são chamadas de via olivococlear (GROFF; LIBERMAN, 2003). Também são divididas em duas classes: os neurônios eferentes laterais que formam sinapses axodendríticas com os neurônios aferentes do tipo I logo abaixo das CCIs (identificados como LOC na Figura 1C) e os neurônios eferentes olivococleares mediais, que formam sinapses axosomáticas com as CCEs (identificados como MOC na figura 1C). Este sistema eferente coclear desempenha importantes funções auditivas, incluindo proteção a ruído danoso e discriminação do som em ambientes ruidosos (SIMMONS, 2002; ZHANG; COATE, 2017).

As CCs apresentam na sua superfície apical feixes de estereocílios arranjados em padrão de escala crescente. Em uma visão simplificada da condução do estímulo sonoro até a OI, a compressão da janela oval, em virtude da vibração do ossículo estribo que se encontra apoiado sobre ela, provoca o deslocamento da perilinfa, o que gera o movimento da membrana basilar e, por consequência, da membrana tectorial. Essa movimentação leva a deflexão dos estereocílios das CCs e gera uma tensão nas comunicações entre as pontas dos estereocílios, levando à abertura dos canais iônicos de mecanotransdução localizados nessa região (PETIT *et al.*, 2001; BODMER, 2008). Por sua vez, a abertura destes canais leva ao influxo de íons potássio presentes na endolinfa, na qual as CCs estão imersas. Este influxo de K^+ gera a despolarização das CCIs e a abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}) sensíveis à variação de voltagem, o que faz com que aumente a concentração de Ca^{2+} intracelular. Esse processo induz a fusão de vesículas sinápticas localizadas na membrana plasmática das CCIs e consequente liberação dos neurotransmissores excitatórios de glutamato para a fenda sináptica. Por sua vez, o glutamato induz a abertura de canais de cátions AMPA (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*), localizados nos neurônios aferentes (tipo I do gânglio espiral do VIII par de nervos cranianos ou vestíbulo-coclear), ocasionando potenciais pós-sinápticos excitatórios, que serão transmitidos para o sistema nervoso central (SNC) e interpretados pelo

córtex cerebral temporal após serem decodificados em regiões do tronco cerebral (núcleo coclear e complexo olivar superior), do mesencéfalo (colículo superior) e do tálamo (corpo geniculado medial), (MOSER *et al.*, 2006).

Figura 1: Representação da orelha de mamífero: **A)** Divisão do órgão auditivo em orelhas externa, média e interna. **B)** Secção longitudinal da cóclea, mostrando os três compartimentos ou escalas que a formam preenchidos por fluídos. **C)** Magnificação da Secção longitudinal mostrando em detalhes órgão de Corti formado pelas CCs, CSs, a estria vascular e os neurônios do gânglio espiral (do inglês, *spiral ganglion neuron* - SGN) que inervam as CCs. **Figuras criadas por:** Karina Lezirovitz, baseada nas seguintes fontes: figuras de STÉPHAN BLATRIX obtidas na página “Promenade ‘round the cochlea Home Page” (PUJOL *et al.*, 2002); DROR; AVARAHAM, (2009); LANG, (2005); LIU *et al.*, 2007 e LIBERMAN; LIBERMAN, (2019).

3.2.2 Zebrafish (*Danio rerio*)

O *zebrafish*, conhecido popularmente como paulistinha, é evolutivamente mais próximo dos seres humanos e camundongos do que as drosófilas, que são utilizadas como organismo modelo em genética há mais de um século (FLINN *et al.*, 2008). Em estudos genéticos de diversos seguimentos, o *zebrafish* se tornou um modelo de vertebrado extremamente utilizado para elucidar os mecanismos por trás do desenvolvimento, função e composição celular de diferentes órgãos, assim como, em estudos da fisiologia integrativa de doenças complexas (LIESCHKE, 2007). Além de compartilhar arquiteturas similares de órgãos e tecidos, o genoma do *zebrafish* cujo sequenciamento completo foi concluído no início de 2013, mostra que 70% de seus 26 mil genes são semelhantes aos genes humanos, sendo essa similaridade menor com relação à drosófila e maior em relação aos camundongos e ratos, que serviram de base para grande parte do que se conhece de fisiologia humana atualmente. Vale ressaltar que, como é pertencente a subclasse de peixes teleósteos, o *zebrafish* assim como os demais peixes que compõem este grupo, passaram por um processo de duplicação genômica durante a evolução propiciando a existência de cópias extras de seus genes, no qual, em teoria, uma das cópias continua a desempenhar a função original enquanto a outra está livre para acumular mutações e possivelmente desenvolver novas funções. Cerca de 82% dos genes associados a morbidade em humanos, listados pelo OMIM (do inglês, *Online Mendelian Inheritance in Man*), estão relacionados a pelo menos um gene ortólogo em *zebrafish*, o que faz esta espécie ser um modelo adequado para estudos que relatam questões biológicas relacionadas ao desenvolvimento humano e doenças associadas (HOWE; CLARK; TORROJA, 2013).

Há inúmeras vantagens de utilização desse modelo, como: pequeno porte; fácil manutenção; baixo investimento financeiro se comparado com camundongos e ratos; alta taxa reprodutiva (200-300 ovos a cada 3 a 4 dias); fecundação externa; rápido desenvolvimento; transparência dos embriões e larvas e a disponibilidade de um grande número de linhagens transgênicas e *Wild-type* (linhagens selvagens), que apresentam variação genética reduzida se comparadas com as linhagens selvagens encontradas na natureza, o que permitem o acompanhamento *in vivo* do desenvolvimento de estruturas morfológicas e sensoriais, bem como a manipulação genética para obter superexpressão transitória, silenciamento gênico, edição do genoma ou a produção de modelos *knockout* e *knockdown* (KRONE *et al.*, 2003; LIESCHKE; CURRIE, 2007; WHITELEY *et al.*, 2011; ABLAIN *et al.*, 2015).

No *zebrafish*, o sistema auditivo é diferente dos mamíferos visto que não apresenta orelhas externa/média e cóclea. Porém, apresenta desenvolvimento e anatomia similares à OI

dos demais vertebrados, sendo que os órgãos sensoriais são compostos pelos mesmos tipos celulares presentes na OI e no vestíbulo dos vertebrados: células mecanossensoriais ou CCs que são inervadas por neurônios e as células não sensoriais ou de suporte (CSs). Esses tipos celulares são semelhantes às suas contrapartes de mamíferos tanto na morfologia como na função e residem nos neuromastos do sistema da LL e ao redor dos otólitos presentes na OI. As CCs presentes na OI do *zebrafish* tem a função de detectar sons e perceber a gravidade e movimento. Já as CCs dos neuromastos, detectam o fluxo de água sobre a superfície do corpo e da cabeça (NICOLSON, 2005).

A OI desse espécime se desenvolve por meio da cavitação do placóide ótico dos embriões 16 horas pós-fertilização (hpf) dando origem a VO, a partir da qual, durante seu desenvolvimento, mais tarde, dará origem a OI madura. Enquanto a VO é formada, os eixos antero-posterior (AP) e dorsoventral (DV) também são determinados, em seguida, a vesícula sofre uma morfogênese complexa e em 24 hpf já é possível observar a presença das primeiras CCs em pólos opostos da porção ventral do lúmen. Os neuroblastos, células embrionárias precursoras de neurônios (Figura 2A), se multiplicam antes de se diferenciarem em neurônios maduros, onde posteriormente darão origem ao gânglio estato- acústico (SAG) este que inerva tanto as cristas anterior e lateral como a mácula utricular e também a crista posterior e a mácula sacular (Figura 2B). Vale ressaltar que esse processo de multiplicação e diferenciação se estende até 42 hpf (SAPEDE; PUJADES, 2010; VEMARAJU *et al.*, 2012).

Figura 2: Representação do desenvolvimento da OI em espécimes de *zebrafish* durante o estágio embrionário. **A)** Morfologia da vesícula ótica (26 hpf) em vista lateral após a execução da técnica de hibridização *in situ* de duas cores demonstrando os neuroblastos evidenciados pelo marcador neuroD (azul/cinza escuro) durante o desenvolvimento do gânglio estato- acústico e as duas porções de epitélio sensorial marcadas com Tecta (vermelho). **B)** Morfologia da vesícula ótica (56 hpf) em vista lateral por meio da captura de imagem confocal da linhagem *Tg(pou4f3:gfp)* com GFP marcando as CCs das duas máculas e a crista anterior e posterior em desenvolvimento. **AP**, projeção epitelial anterior; **PC**, crista posterior; **AC**, crista anterior; **UO**, otólito utricular; **UM**, mácula utricular; **SM**, mácula sacular. Adaptado de BAXENDALE; WHITFIELD, (2016), original de MAIER; WHITFIELD, (2014).

Aos 3 dpf, período em que os espécimes já são considerados larvas jovens, os canais semicirculares são separados do utrículo e as cristas sensoriais (regiões contendo epitélio sensorial) se formam. Entre os primeiros 5 dpf e a idade adulta (fase larval para os espécimes de 5 dpf e juvenil para os acima de 28 dpf), a VO sofre diversas modificações estruturais, tanto de tamanho quanto de composição epitelial. Em 5 dpf a VO é composta por cinco regiões epiteliais sensoriais: sendo três porções sensoriais (*sensory patches*) presentes nos canais semicirculares, que medeiam as funções vestibulares e as outras duas, uma presente no utrículo e outra no sáculo, ambas denominadas de máculas, que irão mediar a função vestibular e auditiva, respectivamente (Figura 3A-B), (BANG; SEWELL; MALICKI, 2001; BEVER; FEKETE, 2002; WHITFIELD, 2002).

Aos 15 dpf, a morfologia do sáculo fica mais evidente e aumenta o número de CCs, a lagena começa a se formar, assim como um pequeno duto endolinfático entre o sáculo e a *crus comun.* Com 20 dpf, a morfologia da OI já se assemelha à de um indivíduo adulto. Nesse estágio de desenvolvimento, também tem início a formação do aparelho de *Weber* (um conjunto de quatro ossículos equivalentes aos ossículos da orelha média: martelo, bigorna e estribo). A OI plenamente desenvolvida é composta por uma diversidade morfológica e numérica de CCs que possuem sensibilidade direcional e propriedades eletrofisiológicas diferentes em relação às encontradas na VO (BANG; SEWELL; MALICKI, 2001; WHITFIELD; BAXENDALE, 2016).

No espécime adulto, a OI plenamente desenvolvida consiste em três canais semicirculares dispostos ortogonalmente (anterior, posterior e horizontal/lateral) e três órgãos otolíticos: utrículo, sáculo e lagena, cada um desses contendo uma mácula ou porção sensorial. Essa denominação está relacionada ao fato de que essas três estruturas estão conectadas aos otólitos, núcleos proteicos e biomineralizados por carbonato de cálcio, que contribuem significativamente para a percepção dos sons e do equilíbrio. Os canais semicirculares e o utrículo, juntamente com duto endolinfático, formam a região denominada de *pars superior*, responsáveis pela função vestibular necessária para o equilíbrio, a aceleração e o sensor de gravidade. O sáculo e a lagena formam a região denominada de *pars inferior* e têm a função primária de ouvir. A *pars superior* e *pars inferior* estão conectadas aos ossículos de Weber, vértebras modificadas que acoplam a bexiga natatória a OI permitindo a detecção da pressão sonora e uma maior sensibilidade auditiva. Cada canal semicircular termina em uma *ampulla*, que consiste no alargamento do canal e na presença de uma crista sensorial perpendicular ao seu eixo. Já as extremidades não ampulares dos canais semicirculares anterior e posterior fundem-se medialmente formando uma estrutura em comum no formato de uma cruz (*crus*

comum). A mácula neglecta, formada por um par de pequenas porções sensoriais que não apresentam otólitos, é encontrada na base medial da cruz no interior da *pars superior* (Figura 3C-E), (NICOLSON, 2005).

Como vimos, o órgão auditivo do *zebrafish* é mais semelhante no que se refere a anatomia de outros vertebrados, mas é diferente quando comparado ao de mamíferos, porém são considerados homólogos, pois apresentam desenvolvimento, composição celular e funcionamento similares. Cabe dizer que essa espécie é considerada um especialista em audição em virtude de suas características anatômicas que permitem a condução dos estímulos sonoros através do corpo. A bexiga natatória, por exemplo, conectada ao sáculo pelos ossículos de Weber, tem a capacidade de melhorar a sensibilidade auditiva do animal. Isso ocorre, pois, a vibração sonora que chega até a água induz processos alternados de compressão e rarefação na parede da bexiga natatória (semelhante ao que ocorre na membrana timpânica) o que contribui para a estimulação indireta do som que chega até a orelha e/ou outros órgãos sensoriais do animal (BAXENDALE; WHITFIELD, 2016).

Assim como ocorre no sistema auditivo dos mamíferos, os compartimentos perilinfático e endolinfático no *zebrafish* são mantidos separados para preservar a composição iônica única de cada fluido. Desse modo, enquanto todo o labirinto é contínuo e repleto de endolinfa (fluido extracelular enriquecido em íons K⁺), o sáculo apresenta o canal transverso, um conduto que une a orelha esquerda à direita e cuja extremidade posterior está fechada na região conhecida como *sinus impar*, o principal espaço perilinfático da OI. Isso permite que a endolinfa banhe a superfície apical das CCs e CSs, enquanto que a região basolateral dessas células é banhada pela perilinfa, que apresenta composição iônica semelhante a outros fluidos corpóreos. A diferença de composição iônica entre o interior das células e esses dois espaços cheios de fluidos que as flanqueiam é crítica para direcionar o fluxo de íons através das CCs, o que permite a transdução de sinal necessária para que ocorra a audição ou a sensação vestibular (ABBAS; WHITFIELD, 2010).

As maculas são porções espessadas do epitélio que contêm CCs inervadas por neurônios sensoriais e CSs, dispostas de maneira intercalada de modo que as CCs sejam isoladas umas das outras pelas CSs circundantes. Em virtude de sua mineralização - que proporciona uma maior densidade - e ao fato de estarem suspensos na membrana otolítica, os otólitos apresentam uma inércia em relação às demais estruturas e/ou órgãos dos peixes, assim quando uma onda sonora passa pelo corpo, conseqüentemente, o epitélio macular vibra em relação ao otólito e os feixes de estereocílios sensoriais presentes no ápice das CCs são defletidos. Este estímulo mecânico desencadeia um influxo de íons K⁺ nas CCs o que provoca a liberação de

neurotransmissores na sua região basolateral, resultando na transmissão desse sinal para os centros auditivos do cérebro através do VIII nervo (ABBAS; WHITFIELD, 2010).

Figura 3: Representação esquemática do órgão sensorial da audição do *zebrafish* em estágio larval 5 dpf e adulto, bem como de outras estruturas importantes para o funcionamento adequado da OI. **A)** Esquema da região da cabeça com os olhos em preto de uma larva em vista dorsal delimitando a morfologia geral da VO, neste plano de foco é possível visualizar os canais anterior (CA) e posterior (CP) representados pelos contornos em preto. A linha laranja pontilhada indica a parede medial do otocisto em desenvolvimento. Marcado em cinza estão os otólitos. **B)** Representação esquemática da VO da fase larval, onde as linhas pontilhadas indicam as estruturas epiteliais ao redor das quais os canais semicirculares são formados. **C)** Representação esquemática da OI de *zebrafish* adulto. Um terceiro órgão macular, a Lagena (LAG) se forma posteriormente na fase juvenil. **D)** Esquema de uma seção transversal do neuroepitélio da orelha interna (mácula anterior). As CCs ovais (verdes) estão presentes nos dois terços superiores do epitélio. Mais abaixo, se encontram as CSs (laranjas) situadas entre as CCs. A parte apical do epitélio é banhada por solução rica em potássio, a endolinfa. As células na porção mais exterior (mais claras) são presumivelmente, células pigmentares que regulam o potencial da endolinfa. **E)** Esquema da visão lateral de um *zebrafish* adulto mostrando a localização dos órgãos: **CER:** cérebro, **WEB:** ossículos de Weber; **OI:** orelha interna; **BN:** bexiga natatória; **COR:** coração; **MA:** macula anterior; **LAG:** lagena; **UT:** utrículo; **SAC:** sáculo; **SAG:** gânglio estatoacústico; **CM:** crista medial; **CP:** crista posterior; **MP:** macula posterior; **ANT:** canal semicircular anterior, **POST:** canal semicircular posterior; **CC:** canal semicircular central; **LAT:** canal semicircular lateral; **SUP:** *pars superior*; **INF:** *pars inferior*. **Figura criada por:** Karina Lezirovitz com base nas seguintes publicações: NICOLSON, (2005); MAIER et al. (2014); BANGI, SEWELL; MALICKI, (2001).

Além da OI, os peixes e os anfíbios apresentam outro órgão sensorial, denominado de linha lateral (LL). Este órgão faz parte de um segundo sistema de mecanotransdução que desempenha papel semelhante à detecção sensorial auditiva que ocorre na OI, como por exemplo, captar os estímulos vibratórios de baixa frequência próximos do espécime, como a movimentação da água, e convertê-los em estímulos elétricos. A LL também é importante em diversos processos comportamentais, dentre esses a detecção de presas, para evitar predadores, nado e ritual de corte (HOAGLAND, 1933; SUCKLING; SUCKLING, 1950; COFFIN *et al.*, 2004; NICOLSON, 2005).

A LL é constituída por longos canais que se estendem desde a cabeça até a cauda dos peixes e contém pequenos agrupamentos de células mecanorreceptoras que formam os neuromastos. Os neuromastos são muito semelhantes em estrutura e função às máculas sensoriais da OI e desse modo, também apresentam CCs inervadas por neurônios sensoriais e as CSs, além de um anel periférico de células do manto (um tipo de célula de suporte) e uma cúpula gelatinosa que envolve todo esse agrupamento celular (Figura 4A), (COFFIN *et al.*, 2004; NICOLSON, 2005; LIEM, 2012; ROMERO-CARVAJA *et al.*, 2015).

Os neuromastos presentes na região da cabeça formam a linha lateral anterior (LLA) e são inervados pelo gânglio cranial localizado entre o olho e a OI, já os neuromastos presentes ao longo do corpo e barbatana caudal, são inervados pelo gânglio localizado próximo a OI e compõem a linha lateral posterior (LLP), (Figura 4B), (LIEM, 2012; ROMERO-CARVAJA *et al.*, 2015). Durante o processo de desenvolvimento da LL, os neuromastos da LLA são derivados da placa pré-ótica e das células da crista neural, já os neuromastos da LLP são originados do primórdio derivado de um placóide posterior ao placóide ótico, migrando para a extensão caudal do espécime enquanto ocorre a disposição dos neuromastos (Figura 4C). Cabe dizer que o número de neuromastos aumenta conforme o espécime se desenvolve gradualmente estabilizando em um número fixo na idade adulta (GHYSEN; DAMBLY-CHAUDIÈRE, 2004).

Figura 4: Representação esquemática da linha lateral e de seus neuromastos. **A)** Esquema longitudinal de um neuromasto mostrando os diferentes tipos celulares que o compõem. **B)** Representação esquemática de um espécime larval demonstrando a localização da linha lateral anterior e posterior, bem como, a disposição dos neuromastos em rosa. Em verde escuro, destacam-se os gânglios que recebem as inervações provenientes dos neuromastos de cada uma das linhas laterais. **C)** Esquema da orientação (pontilhado em vermelho) de como ocorre a deposição dos neuromastos (em verde claro) na linha lateral posterior. Figura A-B, adaptadas de KINDT; SHEETS, (2018); Figura C, adaptada de GHYSEN; DAMBLY-CHAUDIÈRE, (2004).

3.3.3 Contribuição dos modelos animais Camundongo e *Zebrafish* para elucidação do papel de novos genes associados a PA hereditária

Os organismos ou modelos animais podem ser utilizados na identificação de novos genes associados às doenças bem como para a realização de ensaios funcionais em estudos de genes previamente identificados e que podem contribuir para elucidar suas fisiopatologias (WHITFIELD, 2002; BAXENDALE; WHITFIELD, 2016), papel este amplamente desempenhado nos estudos de genética da PA, onde muitos mecanismos moleculares subjacentes à audição foram estabelecidos por meio de estudos em organismos modelo de vertebrados. Dentre as espécies que compõem esse subfilo, se encontram os camundongos e o *zebrafish* (Tabela 2), no qual, mesmo havendo diferenças anatômicas da OI entre essas espécies, muitas das moléculas-chave necessárias para o desenvolvimento e função das células auditivas são altamente conservadas e ambas fornecem abordagens complementares para o desenvolvimento de terapias que visem restaurar a audição (WHITFIELD *et. al.*, 2005; ALBUQUERQUE, 2006; LIESCHKE, 2007).

Tabela 2: Vantagens e desvantagens da utilização do camundongo e *zebrafish* como modelos para estudos sobre audição e perda auditiva. Tabela adaptada de WHITFIELD *et al.* (2005).

Técnica	Camundongo	Zebrafish
Triagem de mutagênese direta	Triagens em grande e pequena escala têm identificado muitas variantes patogênicas recessivas e dominantes afetando a OI.	Custo mais baixo e exigem menos espaço. Várias triagens de grande e pequena escala identificaram mutantes (principalmente recessivos) com defeitos na OI e linha lateral.
Tecnologias de genética reversa	Direcionamento do nocaute mediado por recombinação de homólogos; é viável devido a disponibilidade de linhagens de células-tronco embrionárias.	O <i>knockdown</i> ocasionado por morfolino é um teste rápido visando investigar a função de determinado gene no embrião, no entanto, se mostra mais eficaz nos primeiros dias de desenvolvimento do espécime. O método de TILLING (visando lesões locais induzidas em genomas) vem sendo realizado em vários laboratórios para identificar variantes patogênicas em genes de interesse. E o CRISPR/Cas9, visando a edição gênica, por exemplo introduzindo uma mutação específica para verificar seu efeito na transcrição e função de um gene alvo, por exemplo, é frequentemente empregada para a investigações funcionais de novos genes associados a diversas patologias.
Análise dos embriões	Pouca acessibilidade uma vez que o embrião se desenvolve no útero.	Boa acessibilidade: fertilização externa onde todos estágios são acessíveis; embrião é transparente.
Anatomia da OI	Alta similaridade com a OI humana.	Não há orelha externa ou média e não possui cóclea.
Medições da função auditiva/vestibular e funcionamento das células auditivas (ciliadas, neurônios)	Reflexo de <i>Preyer</i> (comportamental) em adultos, comportamento circular para função auditiva; ensaios eletrofisiológicos para avaliar a função das células da cóclea.	Resposta comportamental de sobressalto acústico / vibracional e comportamento circular para função auditiva; absorção de corante FM1-43 e potenciais microfônicos
Organização genômica	Genoma totalmente sequenciado.	Genoma sequenciado no qual muitos ortólogos de genes presentes nos mamíferos estão em pares duplicados, às vezes, mostrando subfuncionalização.

Ambos os organismos favorecem a investigação de possíveis defeitos nas vias auditivas e/ou de equilíbrio que possam representar um indicativo de mau funcionamento nesses sistemas. Quando os ensaios comportamentais selecionados são robustos e reprodutíveis, podem ser utilizados na triagem de defeitos sensoriais. De acordo com os estudos disponíveis na literatura, os camundongos recuam em resposta a um ruído alto, comportamento denominado como reflexo de *Preyer*. Já embriões de *zebrafish* respondem ao som e a vibração (como um toque), sendo possível realizar a análise da resposta de sobressalto que lhe é característica (uma contração rápida da musculatura do corpo que permite ao peixe nadar para longe do perigo). Além disso, os dois organismos também compartilham características de comportamento circular caso o sistema vestibular apresente algum tipo de dano quanto ao seu funcionamento.

Muitos mutantes de ambos os modelos animais, no entanto, também foram identificados com base em defeitos morfológicos da OI contribuindo em grande parcela dos estudos moleculares (genes ortólogos, mesmas proteínas com funções iguais no órgão auditivo em diferentes espécies), funcionais (reflexo de *Preyer*, etc.) e morfológicos (JERO; COLING;

LALWANI, 2001; WHITFIELD *et. al.*, 2005; AFRIKANOVA; SERRUYS; BUENAFE, 2013; RESENDE; SOCCOL, 2016).

Levando em consideração que ambos os modelos animais já foram amplamente investigados por meio das triagens mutagênicas, onde a mutagênese é caracterizada por uma alteração no DNA sendo ela química, de inserção ou irradiação induzida, direcionada ou aleatória, em um local específico no genoma do organismo, a fim de investigar as consequências da mutação na morfologia ou função do órgão de interesse (GRUNDT; ROTTBAUER, 2006). Faz parte da triagem genética direta, onde após a obtenção dos mutantes com fenótipo alterado, o gene mutado é encontrado por meio de clonagem posicional ou metodologias de captura de genes. Por outro lado, a genética reversa visa caracterizar a função gênica (fenótipo) por meio da modificação genética de genes conhecidos, as chamadas técnicas de *knockin* e *knockout*.

No caso dos camundongos, a disponibilidade de linhagens de células-tronco embrionárias permite a geração de nocautes direcionados, onde defeitos específicos na sequência do DNA do gene podem ser reproduzidos com precisão e reprodutibilidade (WHITFIELD *et. al.*, 2005). Já para o *zebrafish*, tem destaque as tecnologias anti-senso, como, por exemplo, os oligonucleotídeos de morfolino (MO: do inglês, *morpholino antisense oligonucleotides*). Os oligonucleotídeos são desenhados, com aproximadamente 25 pares de bases, para parear (sequência complementar) com uma região específica do RNA-alvo e assim bloquear a ação desse gene, isto é permitem inibir temporariamente a tradução, processamento ou estabilidade do RNAm endógeno do gene alvo, complementar ao oligonucleotídeo de morfolino e consequentemente, avaliar as consequências dessa intervenção durante o processo de desenvolvimento do animal (IZANT; WEINTRAUB, 1984; SUMMERTON; WELLER, 1997). Em virtude de muitas vezes ser difícil discriminar de forma confiável entre efeitos específicos e não específicos do morfolino, de não existirem diretrizes geralmente aceitas para controlar seus efeitos colaterais e à luz das metodologias recentes para gerar linhas mutantes, a utilização de morfolinolinos nos estudos mais recentes caiu drasticamente.

Vale ressaltar que com o *zebrafish*, os espécimes larvais com cerca de 5-7 dpf ou mais jovens, são os mais frequentemente utilizados para experimentos que buscam verificar a função de novos genes-alvos na audição e no equilíbrio, uma vez que contam com a rapidez de obtenção dos mutantes (5 dias em geral), facilidade de utilização para obtenção de imagens *in vivo*, além de modelos *knockdown* e de tecnologias de edição do gênica, anti-senso, como a morfolino, dentre outras (WHITFIELD, 2002; YAO *et al.*, 2016).

Assim como a técnica de MO, a CRISPR/Cas9 (do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), é uma das abordagens de edição gênica muito

utilizada no modelo *zebrafish*. Esse sistema foi projetado a partir da observação dos mecanismos moleculares presentes no sistema imunológico bacteriano. Ele permite a edição do genoma de interesse através da clivagem do DNA por uma endonuclease (Cas9), guiada por meio de uma sequência de RNA (RNAguia) que pareia com as bases de uma sequência-alvo. A estrutura endógena no DNA bacteriano se constitui de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas, separadas por espaçadores adjacentes a elas. Esses espaçadores são sequências não codificadoras oriundas do contato com genomas invasores de bacteriófagos ou plasmídeos, que quando transcritos, formam o RNA guia. Esse RNA guia atua no direcionamento da enzima nuclease Cas9 ao alvo invasor a ser degradado. Desvendando esse mecanismo de defesa inato, foi possível utilizar *in vitro* tanto a proteína Cas9 quanto criar RNAs guia em outras células direcionados as sequências alvos. O direcionamento (Cas9 + RNA Guia) a locais específicos do genoma ocasiona quebras na dupla fita. Uma vez realizada essa clivagem, a própria maquinaria molecular endógena do espécime responsável pelo reparo de erros em seu genoma, atua no reparo do dano a sequência de DNA aceitando a modificação. Portanto, a aplicação desta técnica auxilia tanto na reparação de mutações (restaurando a função gênica) quanto na introdução de novas mutações (nocaute ou *knockin* gênico) (RICHTER; RANDAU; PLAGENS, 2013; SANDER; JOUNG, 2014).

A alta homologia com genes humanos que atuam nas vias de sinalização envolvidas na formação e manutenção do sistema auditivo do *zebrafish* permitem investigar os mecanismos moleculares e genéticos de diferenciação, regeneração, morte e proteção das CCs. Assim, várias metodologias, que vão desde transplantes de células a edições no genoma, têm sido mais facilmente executadas nos embriões de *zebrafish* em relação aos modelos murinos (WHITFIELD, 2002; HE; BAO; LI, 2017; XIA *et al.*, 2019). Além disso, a LL no *zebrafish* com seus neuromastos dispostos por todo o corpo do espécime permite sua visualização e manipulação *in vivo* de maneira mais fácil se comparado com a OI (TON; PARNG, 2005; COFFIN *et al.*, 2010). Por fim, tem destaque o fato de que, diferentemente dos mamíferos, os peixes têm a capacidade de regenerar as CCs ao longo da vida como parte do processo fisiológico de crescimento e manutenção tecidual, devido a proliferação e transdiferenciação das CSs. Assim a comparação dos genes importantes a audição em peixes e mamíferos pode levar a descoberta de moléculas chave neste processo de regeneração e com isso, desvendar novos alvos para uma intervenção terapêutica que pretenda restaurar a audição (HARRIS *et al.*, 2003; MA; RUBEL; RAIBLE, 2008).

O objetivo mais almejado pela maioria dos pesquisadores é poder provar sem sombra de dúvida que um gene causa PA e ao mesmo tempo, testar e comprovar a eficácia da terapia

gênica, celular ou farmacológica baseadas neste conhecimento da ciência básica. Um exemplo recente e de extrema relevância científica e médica se refere aos novos estudos quanto a PA associada ao gene *SYNE4*. Variantes no gene *SYNE4* foram descritas segregando em famílias com PA para sons agudos, de caráter progressivo e herança autossômica recessiva (HORN *et al.*, 2013; MASTERSON *et al.*, 2018). Este gene codifica a nesprina-4, um membro do complexo ligante ao núcleo-esqueleto e citoesqueleto (*LINC*), cuja localização subcelular ocorre na membrana externa do núcleo, interagindo com proteínas da membrana interna e também do citoplasma (CARTWRIGHT; KARAKESISOGLOU, 2014). Em 2013, HORN *et al.* descreveram que camundongos *knockout* para o gene *SYNE4* exibiam PA progressiva e que, apesar de as CCs se desenvolverem normalmente, os núcleos das CCEs perdiam gradualmente sua posição basal o que levava a degeneração destas células. É importante ressaltar que embora o gene *SYNE4* seja expresso no sistema vestibular, os camundongos *knockout* não exibem comportamentos de distúrbios de equilíbrio.

Avanços promissores têm sido obtidos em estudos de terapia gênica para restauração da audição por meio da utilização de capsídeos sintéticos de vírus adeno-associados (AVV), em virtude da sua alta taxa de transdução nas CCEs e CCIs e baixas taxas de integração ou resposta imune (NAKAI; OHKURA; IMOTO, 2001; GYORGY *et al.*, 2019; IVANCHENKO *et al.*, 2020). Nesse cenário tem destaque o artigo de TAIBER *et al.* (2021), continuação do estudo conduzido por HORN *et al.* (2013), que descreve uma metodologia de sucesso para o restabelecimento da audição (fenótipo normal) de camundongos *knockout* para o gene *SYNE4*, com o AVV para transduzir a cópia selvagem do gene na OI desses animais. Nesse estudo, o primeiro passo foi conhecer a dinâmica de perda das CCEs nestes camundongos a fim de determinar a janela terapêutica, lembrando que os camundongos começam a ouvir ao redor de P14 (catorze dias após o nascimento). Foi verificado que embora o RNAm do *SYNE4* seja detectado em P0, há maior expressão em P12 e, utilizando os dados do portal gEAR, os autores concluíram que a expressão do *SYNE4* é restrita às CCs, com expressão maior em CCEs do que CCIs. Merece destaque que o portal gEAR foi construído a partir do reuso e reanálise de dados de transcriptoma disponibilizados pelos autores dos trabalhos científicos, uma das estratégias empregadas no presente estudo. Na sequência, utilizando-se do corante FM1-43 para verificar se os canais sensoriais de transdução estavam funcionando e de análises morfológicas das CCs, os autores verificaram que até P8 as CCs do mutante não diferiam das dos selvagens, ou seja, elas se desenvolvem, amadurecem e adquirem suas funções normais antes do dano ocorrer. Posteriormente, foi confirmado que as partículas AVV eram eficientes para entrar e se integrar as células alvo (CCEs e CCIs) e que a sua inoculação por de meio de injeção era segura e não

promovia nenhum prejuízo a audição ou equilíbrio, o que foi avaliado em até 12 semanas após a injeção. Por fim, os autores ocasionaram a transdução da cópia selvagem do gene *SYNE4* contida no vetor AAV9-PHP.B, por meio de injeção no canal semicircular posterior, em camundongos neonatos (P0) *knockout* para este gene. Foi verificado que o AAV *Syne4* foi capaz de impedir a localização nuclear anormal nas CCEs e de resgatar a audição para níveis próximos ao do selvagem. Em alguns dos animais tratados, a melhora auditiva se manteve por doze semanas, em outros houve deterioração, mas ainda assim com limiares auditivos superiores aos dos *knockout* não tratados. Apesar de ter expressão também no sistema auditivo central, eles observaram por meio de testes comportamentais de medo induzido por estímulo sonoro, que o resgate do fenótipo na cóclea foi suficiente para resgatar o comportamento ao estímulo auditivo.

Este estudo serve como modelo para entendermos que há várias etapas a serem percorridas até que a tão almejada terapia para o restabelecimento da audição baseada nos conhecimentos genético-moleculares seja possível e destaca a importância da caracterização da expressão gênica em diferentes tecidos, idades e animais modelo, por meio de diferentes experimentos bem como análises de dados já publicados ou disponíveis em repositórios públicos, objeto desta dissertação.

3.3 O *locus* DFNA58 e os seus genes candidatos à PA

Nos estudos realizados em indivíduos portadores de PA não-sindrômica sensorineural pós-lingual e progressiva de herança autossômica dominante, em uma grande família brasileira, LEZIROVITZ *et al.* (2009), mapearam um novo *locus* associado a PA, o DFNA58. Após o mapeamento deste *locus*, a região cromossômica candidata mapeada foi refinada, de 30 cM para 3 cM (entre os D2S2368 e D2S443, GRCh38/hg38: chr2: 66.986.473-70.661.255; GRCh37/hg19: chr2: 67.213.605-70.788.387), por meio da análise dos haplótipos de marcadores moleculares do tipo microsatélites, que foram recombinantes em amostras de três pacientes. Em seguida, por meio de Sequenciamento Completo de Exoma de um paciente afetado, foi possível detectar uma duplicação de cerca de 200 Kb dentro da região cromossômica candidata mapeada (2p14-p13.3), que inclui dois genes inteiros (*PLEK* e *CNRIP1*) e parcialmente o gene *PPP3R1*, além de parte de um novo gene (exon 1) ainda não caracterizado que codifica uma nova proteína (*AC017083.3*) e quatro genes preditos, não caracterizados, de RNA longo não codificante (RNA_{lnc}): *AC017083.1*, *LOC107985892*, *LOC102724389* e *LOC101927723/AC015969.1-201* (Figura 5), (LEZIROVITZ *et al.*, 2020).

Figura 5: Esboço da duplicação mostrando a localização das sondas MLPA, bem como a extensão da duplicação de acordo com os diferentes métodos em combinação com todos os resultados obtidos [NC_000002.12: g. (68 247 572_68 248 077) _ (68 449 525_68 452 166) dup]. As setas indicam a orientação da transcrição. Os exons de cada gene que produzem o RNAm mais longo estão representados de acordo o genoma de referência GRCh38 Ambos os pontos de quebra (regiões BK) localizam-se dentro de elementos repetitivos. Genes circulos tiveram a superexpressão observada no sangue de portadores de duplicação. Modificada de LEZIROVITZ *et al.* (2020).

A co-segregação da duplicação com a PA foi confirmada por meio de MLPA (do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), em 20 indivíduos afetados com idades de início variando entre a infância e 33 anos (média de 18,6 anos) e 24 não afetados da família. Por meio de RT-qPCR (Figura 6A-C), foi verificado que a expressão do gene *CNRIP1* está muito mais elevada no sangue de 14 indivíduos afetados portadores da duplicação (média de todos os portadores = ~ 27,7 X; LOD score = 6,3), em comparação aos 14 indivíduos não portadores da duplicação, sendo oito indivíduos não afetados da família e seis indivíduos controle não relacionados. Também foi observada uma maior expressão não tão robusta, porém significativa do gene *PLEK* nos afetados portadores da duplicação em relação aos não portadores, mas nem todos os indivíduos afetados apresentaram a superexpressão. O mesmo foi observado em relação ao exon 1 dos diferentes transcritos do gene *PPP3R1*, porém essa diferença de expressão não é significativa ao considerarmos sua expressão global de todos os transcritos, *primers* exons 2 e 3. Quanto aos genes de RNAInc, em dois deles (*LOC107985892* e *LOC102724389*), foi observada uma superexpressão significativa, 4,51 X e 16,93 X, respectivamente, nos portadores da duplicação em relação aos não portadores. Também foi observada a superexpressão significativa do *AC017083.1* na média dos níveis de RNAm dos portadores, mas em níveis mais baixos (1,42 X) quando comparado aos outros dois genes de RNAInc descritos acima e não foi observada superexpressão significativa do RNAInc *LOC101927723* tanto nos portadores, quanto não portadores (LEZIROVITZ *et al.*, 2020). Além disso, também foi observada a presença de transcritos de fusão heterogêneos quanto a sequência, formados pela junção entre as regiões codificadoras dos genes *CNRIP1* e *PPP3R1*,

interpessadas por uma região intergênica entre *PLEK* e *CNRIP1*, o que nos apontou para o provável local de inserção da duplicação como sendo a 3' *downstream* da cópia normal selvagem do gene *PPP3R1* (Figura 6D).

Figura 6: (A – C) Gráficos com os resultados de RT-qPCR mostrando níveis de RNAm no sangue dos portadores de duplicação (média de pelo menos 10 indivíduos, indicados em preto) e não portadores (média de pelo menos oito sujeitos, indicados em branco) dos genes envolvidos nessa duplicação ou próximos à sua provável posição de inserção: **A)** Genes envolvidos na duplicação: *PPP3R1* (exon 1 de todos os três transcritos), *CNRIP1* (todos os transcritos), *PLEK* (transcrito codificador de proteína e transcrito de íntron retido) e *PPP3R1* (expressão geral de todos os transcritos). **B)** Genes *PNO1* e *WDR92*, ambos vizinhos da possível posição de inserção de duplicação no genoma. **C)** Genes RNAInc não caracterizados contidos dentro do segmento de duplicação: *LOC101927723*, *AC017083.1*, *LOC102724389* e *LOC107985892*. Os gráficos que mostram os transcritos dos genes que estão ligeiramente superexpressos (1,2-1,8 X) foram indicados por um quadro com borda de linha única: *PLEK* (transcrito codificador de proteína), *PPP3R1* (exon 1 de todos os três transcritos) e *AC017083.1* (RNAInc). Gráficos que mostram os transcritos dos genes que estão altamente superexpressos (4-27 X) foram indicados por quadro com uma borda de linha dupla: *CNRIP1*, *LOC102724389* e *LOC107985892*. **D)** Possíveis posições de inserção do segmento duplicado (?). O segmento duplicado bem como o seu provável tamanho está indicado por um quadro com uma borda de linha dupla. A depender da posição de inserção da duplicação, o novo gene *AC017083.3* pode ou não estar interrompido. Abaixo do quadro, temos exemplos dos transcritos de fusão de baixa abundância *CNRIP1-PPP3R1* onde encontrados nos portadores de duplicação. Modificada de LEZIROVITZ *et al.* (2020).

Ensaio de hibridização *in situ* na cóclea de camundongos nas idades de P7, P21 e P35, demonstraram que em P7, tanto o gene *Cnrip1* quanto o gene *Ppp3r1* estão expressos nos neurônios do gânglio espiral, embora *Cnrip1* com maior intensidade. *Cnrip1* também se mostrou expresso nas células da borda timpânica e *Ppp3r1* nas CSs do tipo pilares e para o gene *Plek* não foi observada marcação em nenhum tipo celular. Já nas idades de P21 e P35, foi observada marcação nos neurônios do gânglio espiral e no órgão de Corti para os três genes assim como, marcações do gene *Ppp3r1* nos fibrócitos do ligamento espiral e do *Plek* nos fibrócitos do limbo espiral. Dados semelhantes também foram obtidos por imunofluorescência no início da idade adulta (P21-P35) onde a expressão da proteína Cnrip1 estava evidente nos corpos celulares dos neurônios do gânglio espiral, nos seus neuritos que se estendiam ao órgão de Corti assim como os neuritos se estendem ao tronco cerebral e também foi observada nas células suporte do órgão de Corti. A expressão da proteína Cnrip1 se mostrou mais forte em um subgrupo de células localizadas nas bordas do gânglio espiral, cuja marcação dupla com anticorpo anti-periferina confirmou o fenótipo de neurônios do tipo II, neurônios aferentes que inervam as CCEs. O anticorpo anti-Plek revelou alta expressão nos fibrócitos que revestem a face perilinfática do limbo espiral ósseo, nas células da estria vascular e no órgão de Corti onde apresentaram expressão difusa. Os corpos celulares do gânglio espiral também apresentaram expressão marcante. Em relação ao anticorpo anti-Ppp3r1, o melhor disponível comercialmente foi predito de detectar dois produtos gênicos murinos, Ppp3r1 e Ppp3r2, o que impediu sua investigação. Esses dados sugerem que em virtude da expressão na cóclea murina dos três genes codificadores de proteínas envolvidos na duplicação (*CNRIP1*, *PPP3R1* e *PLEK*), todos eles são candidatos potenciais a explicar a PA nessa família.

A superexpressão observada do gene *CNRIP1* e dois RNAInc, como também a presença dos transcritos de fusão no sangue de portadores de duplicação podem contribuir para ocasionar a PA pós-lingual nesses pacientes, porém não podemos afirmar que essas alterações de expressão também estão presentes na cóclea dos pacientes e nem que outras alterações gênicas restritas a cóclea ocasionadas pela duplicação não estejam ocorrendo (LEZIROVITZ *et al.*, 2020). Por isso a importância de se caracterizar de todas as formas disponíveis o perfil de expressão destes genes na OI assim como buscar formas de se analisar células dos pacientes com fenótipos mais próximos às células cocleares, dado que uma biópsia da cóclea não é uma opção disponível.

Apesar dos achados recentes de LEZIROVITZ *et al.* (2020), a fisiologia desses genes na audição ainda é pouco conhecida, portanto, avaliar o padrão de expressão desses genes é crucial afim de traçar a melhor estratégia para a elucidação do seu papel na PA por intermédio

de técnicas de biologia molecular mais avançadas, que na sua maioria, também costumam utilizar o *zebrafish* como modelo animal para tal elucidação.

3.4 Genes em estudo

3.4.1 Gene *CNRIP1*

Com 35.881 pares de bases e 3 exons (ensembl.org), o gene *CNRIP1* humano codifica duas isoformas de proteínas, CRIP1a (164aa) e CRIP1b (128aa), que são idênticas do aminoácido 1 ao 110, diferindo a partir dessa posição. A CRIP1a é conservada em vertebrados (FIN *et al.*, 2017), enquanto a CRIP1b é restrita a certos primatas (ELPHICK, 2012). Ambas as isoformas humanas interagem com a cauda C-terminal do receptor de canabinóides 1 (também conhecido como receptor CB1 ou CBR1) que pertence à família dos receptores acoplados à proteína G, com função primária de realizar a transdução de estímulos extracelulares em sinais intracelulares. Esse receptor e seus ligantes desempenham papel importante na plasticidade sináptica, analgesia, apetite e neuroproteção. Nos neurônios, atuam como um modulador pré-sináptico da liberação de neurotransmissores e na mediação da depressão de longo prazo das respostas sinápticas (KREITZER; REGEHR, 2001; WILSON; KUNOS; NICOLL, 2001; SJÖSTRÖM; TURRIJANO; NELSON, 2003; GUGGENHUBER *et al.*, 2016). O CRIP1a é conhecido por interagir *in vivo* também com o receptor de glutamato *mGlu8R* (ou GRM8, OMIM * 601116), (NIEHAUS *et al.*, 2007; MASCIA *et al.*, 2017).

A CRIP1a suprime a inibição tônica de canais de cálcio dependentes de voltagem mediada pelo receptor CB1, já CRIP1b não apresenta esse efeito e pouco se sabe sobre seu papel (NIEHAUS *et al.*, 2007). Também tem sido postulado (NIEHAUS *et al.* 2007) que CRIP1a contribui para a localização subcelular dos receptores CB1, dado que já foi identificado um domínio de ligação PDZ (classe I) na sua região C-terminal, o que indica que ela pode interagir com proteínas que contêm esses domínios (DOYLE *et al.*, 1996).

Estes dados corroboram com a hipótese de que o gene *CNRIP1* atua na modulação da sinalização endocanabinóide através do receptor CB1. Sua expressão já foi evidenciada no cérebro de camundongos neonatos (KEIMPEMA *et al.*, 2010) e adultos (NIEHAUS *et al.*, 2007) e já foi demonstrada expressão no cérebro e na retina de *Xenopus laevis* (ZHENG *et al.*, 2015). Estudos com o cultivo primário de neurônios do gânglio cervical superior de ratos demonstraram que a proteína CRIP1a humana exógena se co-localiza com a CNR1 nas proximidades da membrana plasmática (NIEHAUS *et al.*, 2007). No entanto, apesar dessa co-localização não ocorrer na retina de camundongo, foi observado que a CRIP1a está em estreita

proximidade com a proteína endógena CNR1 nos terminais pré-sinápticos dos cones fotoreceptores (HU *et al.*, 2010). Também já foi descrito que o seu ligante, CB1, é expresso no gânglio coclear de galinhas (STINCIC *et al.*, 2011).

A hipermetilação do promotor do gene *CNRIP1* já foi associada como biomarcador de alguns tipos de cânceres, como o colo retal (LIND *et al.*, 2011; OSTER *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2019). Foi proposto que a demetilação do promotor do gene *CNRIP1* ou a sua superexpressão pode reduzir a capacidade de migração e proliferação de células cancerígenas do cólon o que sugere que o gene pode atuar como um supressor de tumor. Até o momento alguns genes relacionados a PA já foram associados com câncer ou com vias de apoptose (*GAB1*-DFNB26 e *METTL13*-DFNM1, *HGF*-DFNB39, *MSRB3*-DFNB74, *MET*-DFNB97, *GSDME*-DFNA5, *EYA4*-DFNA10, *TJP2*-DFNA51, *SMAC/DIABLO*-DFNA64, *MCM2*-DFNA70). A superexpressão da isoforma CRIP1a e sua regulação negativa em alguns tipos de cânceres se enquadram no modelo proposto descrito para o gene *DFNA5* de que a perda da função leva ao câncer e ao ganho de função leva à PA progressiva pós-lingual (WANG *et al.*, 2018).

No *zebrafish*, um peixe teleósteo, existem dois ortólogos ao gene humano *CNRIP1* oriundos de uma duplicação genômica, o *Cnrip1a* localizado no cromossomo 1, possui 1.420 pares de bases e *Cnrip1b* localizado no cromossomo 13, possui 1.015 pares de bases e 3 éxons, no qual, não há distinção quanto a codificação das duas isoformas da proteína CRIP1 humana, sendo que as proteínas codificadas por ambos os ortólogos são mais semelhantes a proteína humana CRIP1a. O gene *Cnrip1b* codifica uma proteína de 162 aminoácidos que tem 60% de identidade com os 164 aminoácidos constituintes da isoforma CRIP1a codificada pelo gene humano, ao passo que, o gene *Cnrip1a* codifica uma proteína de 162 aminoácidos que tem de 61% de identidade com os 164 aminoácidos constituintes da isoforma humana CRIP1a (FIN *et al.*, 2017; NCBI). Os dois genes parálogos (*Cnrip1a* e *Cnrip1b*) entre si apresentam 72% de similaridade na região codificadora, resultando em 93% de similaridade no que se refere aos aminoácidos das proteínas correspondentes, com diferenças principalmente nos 28 aminoácidos da região N terminal.

Quanto a análise da sintenia, termo que descreve a co-localização física de *loci* genéticos no mesmo cromossomo, dentro de um indivíduo ou espécie, é possível confirmar a homologia de ambos os genes do *zebrafish* com o *CNRIP1* humano. Nos cromossomos humano e murino existem os genes *PPP3R1*, *PNO1*, *WDR92*, *CD1* e *ETAA1* indo em direção ao telômero do braço curto e os genes *PLEK*, *FBXO48* e *APLF* indo em direção ao centrômero. O *Cnrip1a* tem *Ppp3r1b* e *Etaal* a *downstream* e dois ortólogos de *Fbxo48* e *Aplf* a *upstream*. Já o gene

Cnrip1b apresenta os genes *Ppp3r1a*, *Pno1*, *Wdr92 downstream* e *Plek upstream*, portanto, em uma posição mais semelhante ao que se observou para a duplicação que co-segrega com PA na família DFNA58, pois o fato de quase todos os genes flanqueados serem conservados ao longo de 400 Myr de evolução sugere uma regulação conservada (FIN *et al.*, 2017). No entanto, não é possível afirmar a priori qual das cópias oriunda da duplicação permanecerá na função original e qual ficou “livre” para seguir outra função.

3.4.2 Gene *PPP3R1*

A calcineurina é um heterodímero com duas subunidades, uma subunidade catalítica de 61 kD, calcineurina A, e outra reguladora de 19 kDa, calcineurina B. A Calcineurina B (também conhecida como Cnb1) é codificada pelo gene *PPP3R1*. Em humanos, o gene *PPP3R1* possui 3,023 pares de bases e 6 exons (ensembl.org) e a proteína 170 aminoácidos. No *zebrafish* o homólogo *Ppp3r1a*, está localizado no cromossomo 13, possui 1,203 pares de bases e 6 exons, a proteína tem 175 aa (Ensembl e Blast). Já o *Ppp3r1b*, está localizado no cromossomo 1, possui 2,795 pares de bases e 6 exons (ensembl.org) e a sua proteína 170 aminoácidos. Ambas as proteínas de *zebrafish* apresentam cerca de 99% similaridade entre e com a proteína humana.

A calcineurina B é uma proteína fosfatase serina/treonina dependente de cálcio, que é estimulada pela calmodulina, a qual lhe confere sensibilidade ao cálcio. As calcineurinas são proteínas citoplasmáticas presentes em diversas células, incluindo linfócitos e células dendríticas. Elas são encontradas nas células de todos os eucariotos, desde a levedura até os mamíferos, sendo especialmente abundante no cérebro, onde acredita-se constituir 1% da proteína total (WANG; CULOTTA; KLEE, 1996; YE *et al.*, 2013; OMIM- 601302). Possuindo um papel crítico para diversas vias, incluindo angiogênese, homeostase do cálcio, sinalização de hipertrofia (HOGAN; CHEN; NARDONE, 2003; MOLKENTIN, 2004), regulação da atividade sináptica e excitabilidade neuronal (REESE; TAGLIALATELA, 2011), ativação celular nas respostas do sistema imunológico (KINCAID, 1995; CANTRELL, 1996; LOH *et al.*, 1996; RAO; LUO; HOGAN, 1997), como fator de transcrição de interleucinas inflamatórias (SIMPSON; NOBLE, 2005; CASTRO, 2006), além de atuar na neurotransmissão entérica envolvendo células glia do intestino delgado (FUJITA *et al.*, 2018), no transporte de íons Na/K (TUMLIN, 1997) e em vias que induzem a parada do ciclo celular, senescência, apoptose, reparo do DNA ou alterações no metabolismo (ASAI *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2010). Também foi relacionado com doença neurodegenerativa, hipertrofia cardíaca (MANSUY *et al.*, 1998; MOLKENTIN *et al.*, 1998; WINDER *et al.*, 1998; RUSNAK; MERTZ, 2000; GRAEF *et al.*, 2001; ZENG *et al.*, 2001; CRABTREE; OLSON, 2002), regulação da formação óssea

através de um efeito na diferenciação de osteoblastos e na eficácia da terapia com *tacrolimus* para nefropatia membranosa idiopática (ZHU *et al.*, 2018). Estudos recentes apontam que o *PPP3R1* possui uma participação na doença de Alzheimer (*e.g.* PETERSON *et al.*, 2014; MANNERS; ROY; KALITA, 2018; VACHER *et al.*, 2019); na regulação da pressão arterial em resposta a fármacos diuréticos tiazídicos (SINGH *et al.*, 2019), no crescimento muscular, proteólise e sistema imunológico de bovinos (DOS SANTOS SILVA *et al.* (2019). Se mostrou diferencialmente expressa com diminuição significativa da expressão na doença de silicose pulmonar, que constitui um importante problema de saúde entre os trabalhadores expostos à sílica cristalina e na qual uma susceptibilidade genética já foi evidenciada (CHOUDHARI *et al.*, 2021).

Diversas evidências *in vitro* e *in vivo* mostraram que o excesso de cálcio pode causar a morte celular por uma série de vias que incluem a calcineurina (JAYARAMAN; MARKS, 2000; ORRENIUS *et al.*, 2003), o que também já foi demonstrado na cóclea. De fato, a superestimulação acústica mostrou envolver imunorreatividade da calcineurina na placa cuticular das CCs, e essas células marcadas com calcineurina foram positivas para o corante iodeto de propídio, relacionado a morte celular (MINAMI *et al.*, 2004). Um estudo sobre assinaturas de genes de adenocarcinoma de pulmão associadas à sobrevivência encontrou *PPP3R1* como um dos 10 genes associados à assinatura de sobrevivência, exibindo uma associação inversa entre os níveis de RNAm e o risco de morte; ou seja, quanto maior a expressão, menor é o risco de morte (GALVAN *et al.*, 2013). Também foi detectado por análise de RNA-Seq, uma fusão entre os genes *PPP3R1* e *CNRIP1* que foi observada tanto em tecido não envolvido quanto em tecido de adenocarcinoma pulmonar.

3.4.3 Gene *PLEK*

Em humanos o gene *PLEK* possui 32,281 pares de bases e 9 exons e uma proteína de 350 aa (ensembl.org). No *zebrafish* o homólogo *Plek* está localizado no cromossomo 13, possui 1,902 pares de bases e 9 exons (NCBI) e uma proteína com 352 aminoácidos. O gene *PLEK* codifica a proteína Plecstrina de 47 kDa, principal substrato da proteína quinase C em plaquetas sanguíneas na ativação plaquetária (SANO *et al.*, 1983; TYERS *et al.*, 1988) e que apresenta cerca de 67% de similaridade com a proteína de *zebrafish* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>10).

Também merecem menção os estudos realizados por CMARIK *et al.* (2000), que relataram a sua superexpressão em células primárias ou transformadas levando a alteração na pseudopodia do tipo lamelipódios mediada pela organização do citoesqueleto de actina. Os

lamelipódios se assemelham aos estereocílios das CCs e seu produto interage com a radixina que já foi associada à PA em humanos e camundongos (KITAJIRI *et al.*, 2004).

Também já foi relacionada a diversos distúrbios inflamatórios sistêmicos, tais como: periodontite, doenças cardiovasculares, artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal, como por exemplo, a colite ulcerativa (LUNDMARK *et al.*, 2015). Recentemente, foi identificado como biomarcador de asma grave por meio de análise de rede de co-expressão (ZHANG *et al.*, 2021). Alterações relevantes na expressão do *Plek* foram relatadas em experimentos com administração/abstinência de cocaína em ratos (GAWLIŃSKA *et al.*, 2020), também em células imunes infiltrantes de tumores que têm sido candidatas a imunoterapia (WORKEL *et al.*, 2020) e a susceptibilidade a tromboembolismo venoso (LINDSTRÖM *et al.*, 2019).

O papel da plecstrina é apontado em diversas vias de interação celular, como por exemplo, os estudos realizados por ABRAMS *et al.* (1995), no qual os autores relataram que a plecstrina pode inibir a hidrólise de fosfoinositídeo (família de enzimas envolvidas em funções celulares tais como crescimento celular, proliferação, diferenciação, mobilidade, sobrevivência e tráfego intracelular) induzida por agonistas ativadores de receptores acoplados a proteína G e receptores de fator de crescimento (WINSTEL *et al.*, 1996; GARCÍA-SÁINZ; VÁZQUEZ-PRADO; DEL CARMEN MEDINA, 2000). Essas evidências levantaram a hipótese de que a plecstrina provavelmente participa da fosforilação e dessensibilização heteróloga dos receptores beta-adrenérgicos em múltiplos níveis.

3.5 Transcriptomas da OI e reuso dos dados depositados em repositórios públicos

A invenção do *microarray* tornou possível determinar a abundância de todos os transcritos em escala genômica, também chamado de transcriptoma. O RNA-seq utiliza a tecnologia de sequenciamento de nova geração para determinar a abundância e a identidade de transcritos e outros RNAs de células ou tecidos. Já o *microarray*, uma técnica baseada em hibridização, se consiste na aplicação da amostra biológica de interesse em camadas finas de vidro nos quais seus sítios (*spots* microscopicamente definidos) contém oligonucleotídeos chamados de sonda dispostos em arranjos específicos. Cada sítio contém uma sequência conhecida complementar ao de RNAm de algum gene. Dessa forma, é possível estudar vários ou mesmo todos os genes expressos num determinado tecido ao mesmo tempo, comparar essa expressão entre diferentes tecidos, idades ou condições experimentais, e assim, gerar uma grande quantidade de dados. Essa quantidade de dados, por vezes, não é analisada sob todos os

possíveis aspectos num único manuscrito e são gerados dados que se encontram fora do objeto de estudo da equipe de pesquisadores que a produziu.

Nos últimos anos, a revolução do *big data*, imprescindível à ciência aberta (*open science*), fez crescer muito o depósito em repositórios públicos dos conjuntos de dados de expressão gênica (*Gene expression datasets*), oriundos de experimentos do tipo RNA-seq e microarrays (WANG *et al.*, 2018; SIELEMANN; HAFNER; PUCKER, 2020). Os bancos de dados mais conhecidos e utilizados são NCBI's, *Gene Expression Omnibus* (GEO), (BARRETT *et al.*, 2013), *Sequence Read Archive* (SRA), (KODAMA *et al.*, 2012) e também *ArrayExpress* (RUSTICI *et al.*, 2013).

Muitos periódicos e agências de fomento à pesquisa têm tornado mandatório o depósito dos dados brutos ou que fiquem disponíveis por meio de material suplementar, a fim de que possam ser re-analisados e os resultados iniciais validados, bem como para possibilitar o reuso para novas análises. Inclusive os cientistas têm investido esforços para que os dados sejam depositados de maneira mais padronizada e uniformizada de forma que meta-análises e análises conjuntas de dados de diferentes laboratórios, e obtidas a partir de diferentes *pipelines* e plataformas, seja factível. A acessibilidade destes repositórios também cresceu, tornando esses depósitos mais atrativos. A integração e reanálise dessas diversas coleções temáticas de conjuntos de dados de expressão gênica apresenta potencial para revelar novos *insights* sobre mecanismos biológicos em estudo, encorajando a ciência reprodutível e trazendo benefícios para os seus autores, pois valoriza seus investimentos e esforços. Dessa forma, tem se dado crescente importância a busca por genes diferencialmente expressos (DEGs, do inglês *differentially expressed genes*) em determinada doença ou ao se comparar tipos celulares de um mesmo órgão ou tecido, visto que podem revelar novos genes candidatos, assim como as vias biológicas das quais eles compõem, que podem estar relacionados à fisiopatologia da doença, com potencial para revelar biomarcadores e alvos terapêuticos (SIELEMANN *et al.*, 2020). O reuso e integração de dados de diferentes fontes promete contribuir significativamente ao conhecimento científico trazendo novas perspectivas, facilitando a elaboração e interpretação de hipóteses, reconhecimento de padrões e validação de dados (CURTY *et al.*, 2017).

Até mesmo a prospecção de dados livre de hipótese pode trazer a motivação e as bases para novas pesquisas experimentais (WADE, 2014). Uma outra forma mais rebuscada de reuso é a meta-análise onde padrões podem ser encontrados, que não eram visíveis dos conjuntos de dados individualmente. Nesse cenário, destacam-se os conjuntos de dados de expressão gênica em que o estudo inicial visava identificar padrões gerais e um olhar mais específico pode trazer novos *insights* para o tecido ou a doença em estudo (WANG *et al.*, 2020). Outro importante

aspecto que o reuso traz é a economia de dinheiro, tempo e trabalho, constituindo uma importante ferramenta para superar dificuldades financeiras e técnicas (WADE, 2014; SIELEMANN *et al.*, 2020). Em última análise, em muitos casos, assim como parte dos objetivos deste projeto, os dados experimentais necessários para obter novos conhecimentos científicos já podem estar disponíveis e apenas "aguardam" para serem investigados para responder a questões científicas em aberto.

MCDERMOTT; BAUCOM; HUDSPETH, (2007) publicaram o primeiro transcriptoma das CCs de *zebrafish* adulto, utilizando *microarrays* com 15000 sondas para transcritos, antes de que todo o genoma de referência desse espécime fosse completado. Já a análise de transcriptoma usando RNA-seq permite analisar quantitativamente os cerca de 31000 genes de *zebrafish* e ainda conhecer novas variantes de *splicing*. Há vários estudos que realizaram transcriptomas de larvas de *zebrafish*, que identificaram alguns genes específicos de CCs (*e.g* ERICKSON; NICOLSON, 2015). Cabe destaque o trabalho de BARTA *et al.* (2018) que realizaram transcriptoma de CCs de *zebrafish* adulto e compararam os genes expressos com os de células vizinhas. Estudos de transcriptomas da cóclea de camundongos também já foram publicados (LIU *et al.*, 2014; ELKON *et al.*, 2015; CAI *et al.*, 2015; BURNS *et al.*, 2015), assim como do epitélio sensorial da cóclea (LI *et al.*, 2018), outros tipos celulares da cóclea (LI *et al.*, 2020) ou comparando os diferentes tipos de neurônios do gânglio espiral (SUN *et al.*, 2018).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Zebrafish* (*Danio rerio*)

Foram utilizados espécimes de *Zebrafish* (*Danio rerio*) da linhagem AB em diferentes estágios de desenvolvimento como demonstrado na figura 7.

Os animais foram mantidos e reproduzidos em colaboração com o Laboratório da Profa. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno que conta com uma *facility* de *zebrafish* do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da USP. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação, com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) em sessão de 02/08/2017. Protocolo de pesquisa 089/17, intitulado: MODELOS ANIMAIS COMO FERRAMENTA PARA ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À SURDEZ.

A *facility* apresenta nível sanitário convencional e é mantida em temperatura (26 °C) e foto período (14 h: 10 h, Claro: Escuro) controlados. Os espécimes são mantidos em tanques de 1,1 L, 3,5 L ou 8 L, com a proporção de 5 peixes por litro de água para evitar o estresse nos espécimes. Estes tanques são conectados a uma estante *Zebtec™ Zebrafish Housing System (Tecniplast)* para manutenção das condições micro-ambientais a níveis apropriados. Além disso, são supridos com água com correção de temperatura, pH e condutividade pelo próprio sistema automatizado da estante, para os níveis desejados e purificada e esterilizada por osmose reversa, radiação UV, filtro biológico e filtro em forma de tambor.

Os embriões utilizados para os experimentos foram inicialmente mantidos em incubadora a 28 °C dentro de placas de Petri contendo meio E3 (solução com sais essenciais para o desenvolvimento dos embriões: H₂O; CaCl₂; NaCl; KCL; MgSO₄) até que atingissem o estágio de 5 dpf e após esse período, fossem transferidos para um tanque dentro da estante.

4.1.1 Eutanásia e obtenção dos tecidos

4.1.1.2 Eutanásia

Os peixes foram anestesiados com Tricaína (*Sigma Aldrich*, St. Louis, Missouri, EUA) 3 mg/ml diluída em água (absorção cutânea) por 5-10 min. Em seguida, foram alocados em tanques de reprodução com água, imersos em um isopor contendo gelo. O contato com o gelo faz com que a água seja lentamente resfriada e, após cerca de 15 min, os espécimes foram a óbito devido à redução de temperatura corpórea.

Os espécimes direcionados as técnicas de hibridização *in situ* e imunofluorescência foram imediatamente conservados em PFA 4 % (*Electron Microscopy Sciences*, Hatfield, PA, EUA) e armazenados até o uso a - 20 °C.

Figura 7: Esquema das técnicas no qual o modelo animal foi utilizado bem como a idade de cada espécime.

4.1.1.3 Obtenção dos tecidos por intermédio de dissecação para construção das sondas utilizadas na hibridização in situ e para análises de qPCR

As disseções das estruturas e tecidos de interesse ocorreram mediante o sacrifício de espécimes de *zebrafish* nas idades de 4 meses e entre 2 e 3 anos, portanto adultos (Figura 8A). Tivemos como base para a realização do procedimento, o protocolo estabelecido por EINARSSON *et al.* (2012). Após a eutanásia e posterior imobilização do espécime em placa de *petri* com auxílio de alfinetes, foi realizada uma incisão na cápsula craniana com o auxílio de uma tesoura *Metzenbaum* de aproximadamente 0,5 cm de distância do eixo caudal (ao nível das guelras) à frente dos orifícios nasais, foi retirado o teto do crânio para a exposição do cérebro e de um segmento curto da medula espinhal a serem removidos (Figura 8B). A medula espinhal foi cortada e o cérebro removido com o auxílio de uma micropinça (Dumont #5 e #54, Koch Electron Microscopy).

Para a remoção da OI (Figura 8C) e suas estruturas individuais (utrículo+lagena) (Figura 8D), após a remoção do cérebro, os labirintos da OI foram expostos e removidos da porção ventral da cápsula do crânio onde se alojavam. Foram utilizadas micropinças (Dumont #5 e #54, Koch Electron Microscopy) para separar as bordas laterais do osso e consequentemente, as OI direita e esquerda por meio da inserção das pontas da pinça ao centro e forçando as metades a se separarem pela força investida. Em seguida, tomando como referência a morfologia dos otólitos associados aos epitélios sensoriais da lagena e do utrículo, os epitélios foram removidos juntamente com seus otólitos e a extração do RNA foi realizada na sequência

Para a remoção dos demais órgãos de interesse, foi realizada uma incisão no abdômen (Figura 8E) e foram retirados o coração (Figura 8F) e a bexiga natatória (Figura 8G) com base

na morfologia e posição anatômica dessas estruturas. O material excedente foi colocado em saco de material infectante devidamente identificado e encaminhado para descarte e posterior incineração ao setor competente da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) ou do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP). Todo o processo de dissecação desses tecidos foi realizado pela mestrande Gleiciele Alice Vieira Silva do Departamento de Otorrinolaringologia da FMUSP, nossa colaboradora nesta pesquisa.

Figura 8: Espécimes e tecidos utilizados para a extração de RNA para os ensaios de PCR em tempo real. **A)** espécime fêmea antes da realização da dissecação. **B)** Espécime após a abertura do crânio expondo as regiões cerebrais (**P:** prosencéfalo; **M:** mesencéfalo e **R:** rombencéfalo) delineado em azul claro pontilhado. **C)** OI evidenciando em: **Círculo pontilhado vermelho:** utrículo; **Círculo pontilhado cinza:** sáculo; **Círculo pontilhado amarelo:** lagena. **D)** Otólitos da OI: **Círculo pontilhado vermelho:** utrículo e **círculo pontilhado amarelo:** lagena. **E)** Espécime com incisão demarcada pelo retângulo pontilhado branco, na região abdominal para a remoção do **F)** coração e **G)** da bexiga natatória. Imagens retiradas por: Nascimento LR.

4.1.2 Extração de RNA do *Zebrafish* e síntese de cDNA

4.1.2.1 Extração de RNA

Após a eutanásia, os espécimes e/ou tecidos (Tabela 3) foram transferidos para um microtubo de 2 mL contendo 800 µl de QIAzol (*Qiagen*, Hilden, Alemanha) e o tecido foi homogeneizado com *rotator-stator* (T10 *Basic Ultra Turrax*, Ika, Staufen, Alemanha). A extração de RNA foi realizada com o *miRNasy Serum/Plasma Kit (50)* (*Qiagen*, Hilden, Alemanha). Após a homogeneização foi adicionado 200 µl de clorofórmio (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Indaiatuba, SP, Brasil) e a amostra foi agitada vigorosamente por 15 seg e em seguida, incubada por 3 min à temperatura ambiente (TA). Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 12.000 xg por 15 min a 4 °C. Após a centrifugação, a fase superior (aquosa e transparente de aproximadamente 600 µl) foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e foi adicionado 600 µl de etanol 100%, o volume foi homogeneizado e transferido para a coluna de extração acoplada ao tubo coletor (fornecidos pelo fabricante) seguida de centrifugação a 8.000 xg por 15 seg e descarte do tampão que ficou no tubo coletor. Em seguida a amostra presente na coluna foi lavada com 700 µl de tampão *RWT*, centrifugada a 8.000 xg por 15 seg e o tampão presente no tubo coletor foi descartado. A amostra presente na coluna foi incubada com um mix contendo 10 µl de DNase e 70 µl do tampão *RDD* (*Qiagen*, Hilden, Alemanha) por 15 min a TA e foi adicionado 500 µl de tampão *RPE* seguida de uma centrifugação a 8.000 xg por 15 seg e descarte do tampão presente no tubo coletor. Em seguida, foi adicionado 500 µl de etanol 80% seguido de uma centrifugação a 8.000 xg por 2 min no qual ao término, o tampão que ficou no tubo coletor foi descartado, a coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e com a tampa da coluna aberta, foi realizada uma nova centrifugação a 8.000 xg por 5 min com a finalidade de secar a membrana da coluna. Ao término da centrifugação o RNA foi eluído em 14 µl de H₂O DEPC (*Qiagen*, Hilden, Alemanha) por meio de centrifugação a 8.000 xg por 1 min e em seguida foi realizada a quantificação no *NanoDrop Technologies ND-2000c* (*Thermo Fisher Scientific*, Inc, Waltham, MA, EUA) para verificação a concentração e pureza do RNA extraído.

Tabela 3: Relação dos tecidos utilizados para as extrações de RNA assim como a quantidade de cada um deles demonstrada entre parênteses.

Amostras para extração de RNA		
Técnica	Idade do espécime	Tecido e quantidade utilizada por extração
Hibridização <i>in situ</i>	5 dpf	Pool com 80 larvas
	1 ano	Espécime inteiro (1)
	4 meses	OI (2)
PCR em tempo real	2-3 anos	OI (1)
		Pool de Utrículo (7) + Lagenas (5); Coração (2); Bexiga natatória (2)

4.1.2.2 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 1µg de RNA com *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, Life Technologies, CA, EUA). Para cada amostra foi adicionado 1 µl *oligoDT*, 1 µl *Random Hexamer* e 1 µl *dNTPmix*, seguido de incubação a 65 °C por 5 min e em seguida, as amostras foram colocadas por 1 min no gelo. Passado o 1 min, foi adicionado 2 µl do *RT buffer* 10 X, 2 µl DTT, 4 µl do *MgCl₂*, 1 µl *RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor* e 1 µl *SuperScript III Reverse Transcriptase* as amostras, seguida de incubação a 25 °C por 10 min, 50 °C por 50 min e 85 °C por 5 min. Depois foi adicionado 1 µl de *RNase H* e as amostras foram incubadas a 37 °C por 20 min. Todas as incubações foram realizadas no *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc, MA, EUA).

4.1.3 Hibridização *in situ* (Protocolo THISSE; THISSE, 2008)

Para os ensaios de hibridização *in situ*, foi estabelecido um número mínimo de 15 larvas e 1 espécime adulto para serem utilizados em cada experimento realizado para cada um dos genes estudados: *Cnrip1a*, *Cnrip1b*, *Plek* e *Ppp3r1a*, para possibilitar a reprodutibilidade dos experimentos. Os experimentos foram realizados em larvas com 5 dpf e com espécimes juvenis com 30 dpf. Para cada idade, gene e sonda alvo, os experimentos foram realizados em duplicatas com a finalidade de validar o padrão de expressão observado para cada sonda, tanto senso quanto anti-senso e de cada gene avaliado. Durante o decorrer do projeto fomos incluindo os outros genes conforme avançávamos nos resultados dos experimentos conduzidos em paralelo sobre o DFNA58 no laboratório e conforme íamos obtendo as informações na literatura. Por isso, não houve tempo hábil para fazer a hibridização *in situ* do *Ppp3r1b*, mas deve ser realizada no futuro. Para confirmar se o padrão de expressão observado nas duplicatas se mantinha

estável, cada experimento foi repetido nos possibilitando confirmar a estabilidade desses perfis obtidos.

4.1.3.1 Obtenção do DNA molde para a sonda

Para a construção das sondas de RNAm, foram desenhados *primers* por meio do pacote computacional Primer3 (<https://primer3.ut.ee>) contendo a sequência do promotor T7 *upstream* às suas sequências (Tabela 4). Para as sondas anti-senso, de cada gene, a sequência do promotor T7 foi adicionada no início do *primer reverse*, já para as sondas senso, a sequência foi adicionada ao início do *primer forward*. As sequências desenhadas foram submetidas à ferramenta de alinhamento BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para assegurar a especificidade destes segmentos ao gene-alvo.

Tabela 4: Relação dos *primers* utilizados para realizar a amplificação do cDNA que foi usado como molde para a transcrição das sondas senso e anti-senso de RNA nos experimentos de hibridização *in situ* e o tamanho em pb dos fragmentos de cDNA esperados, bem como onde cada *primer* anela. As letras minúsculas em negrito nos *primers forward* e *reverse* correspondem à sequência do promotor T7. Todos os *primers* anelam nas regiões não traduzidas (UTR), 5' e 3'.

GENES	SONDAS	NOMES DOS PRIMERS	SEQUÊNCIAS (5'-3')	ONDE ANELA?	TAMANHO DOS FRAGMENTOS
<i>Cnrip1a</i>	anti-senso	CNRIP1A_Zfprobe - F	AAACAGCTTCCTGGGAGCATC	Exon 1	679 pb
		CNRIP1A_Zfprobe - R	taattacgactcactatagggga ATACCCTGACGGATCGCTTG	Exon 3	
	senso (controle)	CNRIP1A_ZfprobeS - F	taattacgactcactatagggga AAACAGCTTCCTGGGAGCATC	Exon 1	679 pb
		CNRIP1A_ZfprobeS - R	ATACCCTGACGGATCGCTTG	Exon 3	
<i>Cnrip1b</i>	anti-senso	CNRIP1B_Zfprobe - F3	AGGAACCGCACACATGACTT	Exon 1	635 pb
		CNRIP1B_Zfprobe - R3	taattacgactcactatagggga CTCTGATTCACAGGAACATCTCTTT	Exon 3	
	senso (controle)	CNRIP1-RT-ZFprobeS- F	taattacgactcactatagggga AGGAACCGCACACATGACTT	Exon 1	637 pb
		CNRIP1-RT-ZFprobeS- R2	TCTGATTCACAGGAACATCTCTTT	Exon 3	
<i>Plek</i>	anti-senso	PLEK_Zfprobe- F4	GCTGAAGCCTTCGAGTCCT	Exon 1	1.152 pb
		PLEK_Zfprobe- R3	taattacgactcactatagggga GACAATCTAAAGCATGTCTGTAATGA	Exon 9	
	senso (controle)	PLEK-RT-ZFprobeS- F	taattacgactcactatagggga GCTGAAGCCTTCGAGTCCT	Exon 1	831 pb
		PLEK-RT-ZFprobeS- R	TTCTCCGATGACCCTGTTTC	Exon 6	
<i>Ppp3r1a</i>	anti-senso	PPP3R1_Zfprobenew- F	CAAGACCGAGAGCAGGATTC	Exon 1	809 pb
		PPP3R1_Zfprobenew- R	taattacgactcactatagggga GCTGAGATGCTCGTTTCACTG	Exon 6	
	senso (controle)	PPP3R1-RT-ZFprobeS- F	taattacgactcactatagggga CAAGACCGAGAGCAGGATTC	Exon 1	809 pb
		PPP3R1-RT-ZFprobeS- R	GCTGAGATGCTCGTTCACTG	Exon 6	

4.1.3.2 PCR dos trechos de cDNA para obtenção das sondas de RNA

A amplificação de todos os segmentos de cDNA selecionados foi realizada por meio de PCR convencional com os *primers* descritos na Tabela 4. Foram utilizadas as seguintes sequências de ciclos no *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*, Inc, MA, EUA): desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, 10 ciclos de desnaturação por 45 seg a 95 °C, hibridação por 45 seg a 67 °C (diminuindo 1 °C/ciclo), extensão por 1 min a 72 °C, seguida de 24 ciclos de 95 °C por 45 seg, hibridação por 45 seg a 57 °C e extensão a 72 °C por 1 min; por fim extensão final a 72°C por 5 min. As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo de *Tampão Platinum 1 X*, 1,5 mM de MgCl₂, 0,24 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada um dos *primers forward* e *reverse*, 1,25 U de Taq DNA polimerase *Platinum* (cat. 10966030, *Invitrogen, Thermo Fischer Scientific*) e 1-3 µL de cDNA diluído dependendo das concentrações em ng/µL obtidas após a síntese de cDNA. Terminadas as reações, foi verificado se a amplificação foi eficiente e específica por meio eletroforese em gel de agarose 2 %.

Posteriormente, os fragmentos amplificados foram purificados com o *DNA Clean & ConcentratorTM – 5 kit* (Zymo Research, Irvine, CA, EUA). Para isso, 100 µL dos produtos da PCR foram transferidos para microtubos de 1,5 mL juntamente com 500 µL do tampão *DNA Binding* e as amostras foram agitadas vigorosamente por 5 seg, em seguida foram centrifugadas a 8.000 xg por 3 seg e transferidas para colunas de purificação e tubos coletores (fornecidos pelo fabricante). As amostras centrifugadas a 10.000 xg por 30 seg e o tampão foram descartados. Em seguida, foram adicionados 200 µL do tampão *DNA Wash* nas colunas e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 xg por 30 seg e o tampão presente no tubo coletor foi descartado. As amostras foram lavadas novamente com 200 µL do tampão *DNA Wash* e centrifugadas a 10.000 xg por 30 seg e os fluídos que passaram pelas colunas foram descartados. As colunas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e os produtos das PCRs purificadas foram eluídos com 11 µL do tampão *DNA Elution* seguido de quantificação no *NanoDrop Technologies ND-2000c* (Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA, EUA) para verificação da eficiência das purificações.

4.1.3.3 Transcrição *in vitro* e purificação de sonda de RNAm

Após a obtenção dos fragmentos-molde de cDNAs amplificados e purificados, foram realizadas as transcrições *in vitro* para obtenção das sondas de RNAm. Sendo as sondas anti-senso destinadas para análises da expressão gênica e a senso utilizadas como controle negativo, uma vez que, na célula o RNAm é senso, portanto sondas anti-senso devem ser utilizadas para detectá-lo e dessa maneira, durante a etapa de transcrição devem-se obter sondas anti-senso que irão parear com o RNA em estudo e sondas senso, que servirão como controle negativo, pois não irão em teoria parear com nenhum RNAm. As reações foram realizadas com volume total de 20 µL: 4 µL *Tampão T7 1 X* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 2 µL DTT (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 2 µL de *DIG RNA Labeling Mix 10 X* (Roche Diagnostics, Indianapolis, EUA), 40 U de *RNAse OUT Inhibitor* (Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA, EUA), 40 U de *T7 RNA polimerase* (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) e os valores em µL dos produtos das PCRs variaram entre 2 µL – 10 µL dependendo das concentrações em ng/µL obtidas após as purificações, com a finalidade de sintetizar 1µg de sonda necessário para a execução do experimento.

Posteriormente, todo volume obtido de cada reação foi incubado a 37 °C por 4 horas no *Veriti 96 Well Thermal Cycler* e ao final foi verificada a eficiência das transcrições das sondas de RNAm por meio eletroforese em gel de agarose 2 %. Em seguida, foram realizadas purificações das sondas de RNAm por meio das colunas de purificação *SigmaSpinTM Post-*

Reaction Clean-Up Columns (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). As colunas de purificação e os tubos coletores acoplados a elas (fornecidos pelo fabricante) foram centrifugadas a 750 xg por 2 min sem adição das amostras para retirar o excesso de resina presente em seu interior e os tubos coletores foram descartados. As colunas foram colocadas em novos tubos coletores e as amostras foram adicionadas em seu interior seguido de centrifugação de 750 xg por 4 min. As colunas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e os produtos das sondas purificadas foram eluídos com 20 µL de água. A cada amostra foi adicionado 1 µL de EDTA 5 mM pH 8.0 (C₁₀H₁₆N₂O₈) e 9 µL de *RNAlater* (Qiagen, Hilden, Alemanha), para evitar sua degradação. Após a purificação, as amostras foram quantificadas no *NanoDrop Technologies* ND-2000 e uma alíquota de cada amostra foi submetida a eletroforese em gel de agarose 2% para verificar a qualidade da purificação.

4.1.3.4 Preparação dos espécimes

As larvas (5 dpf) e peixes juvenis (30 dpf) foram fixados com paraformaldeído (PFA) 4% (*Electron Microscopy Sciences*, Hatfield, PA, EUA) e incubados *overnight* a 4 °C. As amostras foram lavadas 3 X de 5 min cada com PBST (PBS 1 X [H₂O; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,7 mM; NaCL 136 mM; KCL 2,7 mM] + Tween 0,1%) e posteriormente, armazenadas em Metanol 100 % (*Merck*, Darmstadt, GER).

Os espécimes larvais e juvenis, foram lavados 3 X de 5 min cada com PBST e em seguida, foi realizada a despigmentação natural do corpo. Para isso, os espécimes foram incubados durante 30-40 min em uma solução contendo 3 % de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) e 0,5 % de KOH (ambos da *Sigma Aldrich*, St. Louis, Missouri, EUA). Posteriormente, foram lavados 3 X de 5 min cada com PBST. Após despigmentação, os espécimes foram lavados com PBS por 5 min, desidratados em metanol 100 % e armazenados a -20 °C até o uso.

Para realizar os experimentos de hibridização *in situ*, as amostras foram reidratadas com metanol diluído em PBS nas seguintes concentrações: 75 %, 50 % e 25 % por 5 min cada. Em seguida, foram lavadas 3 X com PBST por 5 min.

4.1.3.5 Permeabilização e Pré-hibridação

A permeabilização foi realizada por meio de incubação com Proteinase K 10 mg/mL (*Roche Diagnostics*, Indianapolis, EUA) a TA, por 30 min. Para o *zebrafish* juvenil inteiro a concentração foi de 50 mg/mL e a incubação foi de 1 h. Em seguida, para inibir a ação da

proteínase K, os espécimes foram incubados com PFA 4 % por 20 min a TA e lavados 4 X com PBST por 5 min cada.

Foram realizadas incubações de 2-5 horas em banho seco a 70 °C com a solução de hibridação (Ácido Cítrico 1M pH 6, Formamida 50 %, Heparina 5µg/mL, SSC 5 X [tampão citrato de sódio: NaCl; C₆H₅Na₃O₇.2H₂O], tRNA 500 µg/mL, [Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA] e Tween 20 0,1 %, diluídos em Água DEPEC ou Milli-Q).

4.1.3.6 Hibridação

A solução de hibridação foi descartada e substituída por uma nova contendo 1 µL da sonda de RNAm de cada gene (anti-senso e senso) marcadas com DIG-Dioxigenina (*Roche Diagnostics*, Indianapolis, EUA), um tubo por gene por sonda, e as amostras foram incubadas 70 °C *overnight*.

Para evitar a marcação inespecífica das sondas que não se hibridizam, foram realizadas três lavagens, sob agitação, a 70 °C com 200 µL de solução HM (do inglês, *hybridization mix*: Ácido Cítrico 1M pH 6, Formamida 50 %, SSC 5 X e Tween 20 a 0.1% e Água DEPEC ou Milli-Q diluída em SSC 2 X) nas seguintes concentrações de HM: 75%, 50 %, 25 %, por 10 min cada lavagem. Uma lavagem com SSC 2 X por 10 min cada a 70 °C e duas lavagens com SSC 0,2 X por 30 min cada a 70 °C. Em seguidas foram realizadas três lavagens a TA com SSC 0,2 X diluído em PBST, por 10 min cada.

4.1.3.7 Bloqueio, anti-DIG e revelação cromogênica

As amostras foram incubadas durante 3-4 h à TA com tampão de bloqueio constituído de soro de ovelha 2 % e de soro bovino (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*) 2 mg/mL ambos da *Sigma Aldrich* (St. Louis, Missouri, EUA). Ao término o tampão foi descartado e as amostras foram incubadas com anticorpo anti-DIG diluído 1:5000 em tampão de bloqueio (*Roche Diagnostics*, Indianapolis, EUA) *overnight* a 4 °C sob agitação.

No dia seguinte a solução foi descartada e foram realizadas cinco lavagens com a solução de TBS (tampão salino tris: MgCl₂ 50 mM; NaCl 100 mM; Tris HCL 100 mM; Tween 20 0,1 % diluído em água Milli-Q) diluída em PBST por 5 min cada sob agitação em TA. Em seguida, a solução foi substituída por uma nova contendo: cloreto de tetrazólio- nitro azul (NBT) a 225 µg/mL e fosfato 5- bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP) a 175 µg/mL (ambos os reagentes da *Sigma-Aldrich*, St. Louis, Missouri, EUA). Ao atingir a intensidade da coloração desejada, as reações foram interrompidas e as amostras foram transferidas para microtubos de

1,5 mL e submetidas a três lavagens com solução de parada (PBS pH 5.5, EDTA 1 mM, Tween 20 0.1 %) durante 15 min cada, à TA e sob agitação suave.

Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 min à TA nas seguintes concentrações de glicerol (*Sigma Aldrich*, St. Louis, Missouri, EUA) diluído em PBS: 25 %, 50 % e 75 %. Os espécimes foram alocados em lâminas e visualizados em estereomicroscópio S8APO (*Leica Microsystems*, Alemanha), e as imagens foram capturadas com a câmera DF C450C (*Leica Microsystems*, Alemanha) com o software Las V4.1 (*Leica Microsystems*, Alemanha).

4.1.3.8 Adaptações no protocolo de hibridização *in situ* - (Protocolo do Laboratório Varshney)

Devido à alta marcação observada e com objetivo de confirmar a especificidade das sondas utilizadas, foi feita uma colaboração com a pesquisadora Shruthi Vijaykumar (Laboratório Varshney, Departamento de Microbiologia e Biologia Celular, Instituto Indiano de Ciências) especialista em estudos de expressão de genes da OI em *zebrafish*, que nos orientou a realizar pequenos ajustes no protocolo da técnica de hibridização *in situ* (Tabela 5). Por isso, os experimentos para a análise de expressão do gene *Cnrip1b* foram repetidos e além da mudança do protocolo (item 4.1.3, pg. 38), também foi utilizado apenas os períodos de 5 dpf e 30 dpf para a realização da técnica. A escolha dessas idades se deve ao fato de que com 5 dpf a VO já está desenvolvida e, por isso, mais fácil de ser visualizada e com 30 dpf, a OI se encontra completamente formada. Cabe dizer que esses novos procedimentos foram adotados para os estudos posteriores de expressão por hibridização *in situ* com o *Cnrip1b* e os demais genes analisados: *Cnrip1a*, *Plek* e *Ppp3r1a*. Assim como no protocolo anterior, nesse também realizamos os experimentos em duplicatas e foi feita a posterior confirmação referente a expressão se manter estável onde cada experimento foi repetido nos possibilitando confirmar a estabilidade desses perfis obtidos.

Tabela 5: Tabela com as modificações sugeridas por nossa colaboradora do Laboratório Varshney para os ensaios de hibridização *in situ*. **A-D)** Estão destacadas a solução correspondente no protocolo de THISSE; THISSE, (2008), divididas por etapas.

Modificações do protocolo do laboratório Varshney		
A) ETAPA: Pré-hibridação e Hibridação (Solução de hibridação)		
Reagente	Concentração de estoque	Concentração final
Formamida	100%	50%
Tampão SSC	20 X	5 X
Denhardt's	50 X	1 X
tRNA	--	1 mg/mL
Heparina	--	0.1 mg/mL
Tween-20	--	0.1%
EDTA	0.5M(500 mM)	5 mM
CHAPS	--	0.1% (1g/L=1mg/mL)
H ₂ O Milli-q	--	--
B) ETAPA: Lavagens pós-hibridação (Solução de HM)		
Reagente	Concentração de estoque	Concentração final
Formamida	100%	50%
Tampão SSC	20 X	5 X
CHAPS	25 X	0,25 X
H ₂ O Milli-q	--	--
C) ETAPA: Bloqueio (Solução de bloqueio)		
Reagente	Concentração de estoque	Concentração final
Tampão MAT	--	--
Soro de Cabra	100%	10%
Soro bovino	100X (100 mg/mL)	1 X
D) ETAPA: Anti-Dig (Concentração)		
Reagente	Concentração de estoque	Concentração final
Anti-DIG-AP Antibody	150 U	1,3000
E) ETAPA: Lavagens pós-hibridação (Solução de HM)		
Reagente	Concentração de estoque	Concentração final
Formamida	100%	50%
Tampão SSC	20 X	5 X
CHAPS	25 X	0,25 X
H ₂ O Milli-q	--	--
F) ETAPA: Bloqueio (Solução de bloqueio)		
Reagente	Concentração de estoque	Concentração final
Tampão MAT	--	--
Soro de Cabra	100%	10%
Soro bovino	100X (100 mg/mL)	1 X

4.1.4 Imunofluorescência Indireta

4.1.4.1 Preparo do tecido

Após eutanásia, os espécimes com 4, 5 e 7 dpf foram fixados em PFA 4 % a 4 °C *overnight*. Em seguida, foram lavados três vezes com PBST por 5 min cada. Os espécimes foram despigmentados como descrito no item 4.1.2.4. Após a despigmentação, foram lavados 3 X de 5 min cada com PBST e incubados com sacarose 10 % (*Sigma Aldrich*, St. Louis, Missouri, EUA) por 2 h, e posteriormente com sacarose 20 % *overnight* a 4 °C. As larvas foram lavadas duas vezes com PBS por 5 min cada e armazenadas em PBS a 4 °C até o uso.

4.1.4.2 Imunofluorescência Indireta

As larvas foram lavadas duas vezes por 5 min cada em TA com PBST e em seguida, foram permeabilizadas com acetona (*Sigma Aldrich*, St. Louis, Missouri, EUA), previamente gelada, por 20 min a 20 °C. Em seguida, lavadas com H₂O Milli-q por 5 min, seguida de três lavagens com PBST por 5 min cada. Após as lavagens, foi adicionada a solução de bloqueio constituída de: soro de cabra 2 % (Abcam, Cambridge, Reino Unido) e BSA 1 % e as larvas foram incubadas a 4 °C *overnight*. Após o bloqueio foram realizadas quatro lavagens de 5 min cada com PBST, seguida da incubação com os anticorpos primários: 1:50 *Cnrip1 Rabbit* (*Mackie*), 1:50 *Cnrip1 Rabbit* (*Protein Tech*, 16827-1-AP) e 1:50 *NF-H Mouse* (*NovusBio*, NB500-416), assim como, o marcador para os filamentos de actina, 1:50 Faloidina (*Thermo Fisher*, A22287) diluídos em tampão PBS contendo BSA 1% a 4 °C *overnight*. Após o término da incubação, os espécimes foram lavados três vezes de 5 min cada com PBST e incubados com os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 (1:400) ou Alexa Fluor 546 (1:300), (*Molecular Probes Thermo Fisher Scientific*, Inc, MA, EUA) diluídos em tampão PBS contendo BSA 1 % por 4 horas a TA. Faltando 30 min para o término da incubação, foi adicionado o DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (*Molecular Probes Thermo Fisher Scientific*, Inc, MA, EUA), na concentração de 1:1500 seguido de cinco lavagens de 5 min cada com PBS. Em seguida, transferidos para lâminas de vidro escavadas contendo agarose *low gelling temperature* 1 % (*Sigma Aldrich*, St. Louis, Missouri, EUA), para fixação do posicionamento das larvas. As lâminas foram seladas com lamínula e armazenadas a TA até a captura das imagens. As imagens foram obtidas em microscópio confocal de fluorescência LSM 780 (*Carl Zeiss*, Ostalbkreis, BW, Alemanha) ou LSM880 (*Carl Zeiss*, Ostalbkreis, BW, Alemanha) e as imagens capturadas com o programa Zen (*Carl Zeiss*, Ostalbkreis, BW, Alemanha).

4.1.5 PCR em tempo real quantitativo (RT-qPCR)

Com o objetivo de analisar quantitativamente a expressão dos genes candidatos ao locus DFNA58 por meio da análise do seu RNAm (*Cnrip1a* - NM_001003607.2, *Cnrip1b* - NM_001327770.1, *Ppp3r1a* - NM_001327772.1, *Ppp3r1b* - NM_001004553.1 e *Plek* - NM_200841.1), assim como dos genes já relacionados a perda auditiva e/ou expressos na orelha interna (*Slc1a3a* - NM_212640.1, *Eya4* - NM_001282173.1, *Elavl4* - NM_001244600.1, *Gsdmea*- XM_005170077.3, *Gsdmeb* - NM_001001947.1, *Pou4f1* - NM_001312866.2, *Gab1* - NM_001326713.1, *Mettl13*- NM_001044769.4) foi realizada a RT-qPCR utilizando os tecidos dissecados da OI que contém os epitélios neurosensoriais responsáveis pela mecanotransdução (lagena+utrículo). A fim de comparar os níveis de expressão destes genes, foram utilizados outros tecidos do *zebrafish* como a OI, coração, bexiga natatória e cérebro. Estes tecidos foram escolhidos por serem os de mais fácil dissecação e apresentarem expressão gênica diversa da OI. Os *primers* foram desenhados usando a ferramenta *Primer-Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), (Tabela 6).

Foi utilizado *PowerUp SYB Green Master Mix 1 X* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA) e de 0,2 µM a 0,35 µM de cada *primer* em cada reação de RT-qPCR (Tabela 6). Na placa de 48 poços *MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction Plate* ou *MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip* (ambos, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA), foram adicionados 8 µl do mix (*SYBR máster mix* + *primers*) e 2 µl por poço de cDNA a ~20 ng/µl. As corridas de RT-qPCR foram realizadas no equipamento *Step One* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) obedecendo à ciclagem: ativação à 50 °C por 2 min (1 ciclo); ativação da ação da DNA polimerase à 95 °C por 2 min (1 ciclo); desnaturação à 95 °C por 15 seg (50 ciclos) e anelamento e extensão à 60 °C por 1 min (50 ciclos). Todos os experimentos de RT-qPCR foram realizados em duplicatas, sendo que em todos foi realizada a curva de *melting* a 98 °C após o final da amplificação das regiões de interesse a fim de evidenciar a presença de um único pico, demonstrando que a PCR está específica e bem semelhante entre as diferentes amostras amplificadas com o mesmo par de *primers*. A eficiência de amplificação de cada par de *primers* foi verificada por meio de curva padrão de diluições seriadas. Priorizamos a utilização de *primers* com eficiência entre 1,9 e 2,1, isto é, de 90% a 110%, porém não abandonamos *primers* com eficiências mais baixas, pois utilizamos o modelo matemático que leva em consideração a eficiência dos *primers* no cálculo da quantificação relativa proposto por PFAFFL, (2001), vide figura 9. Foram testados os seguintes genes de referência: *Actb2*, *Efl*, *Rps18*, *Sep15*, *Metap1*, *Rpl13* e *Gapdh*. Em virtude

de reprodutibilidade de eficiência próxima ao ideal, realizamos todos os testes com três destes genes (*Actb2*, *Rpl13* e *Gapdh*), mas devido à grande variação no nível de expressão do *Gapdh* entre os tecidos/órgãos pesquisados, optamos por ficar apenas com *Actb2* e *Rpl13* e foram utilizadas as médias geométricas ou medianas entre seus valores.

Para a realização dos testes estatísticos, foi empregado o teste t de *student unpaired two-tailed* com o auxílio do *software Graphpad Prism 5.03* (2009) a fim de determinar se a diferença observada entre as médias dos vários tecidos era estatisticamente significativa.

Tabela 6: Relação dos *primers* utilizados para realizar a amplificação do cDNA que foi usado como molde para as análises em PCR quantitativa em tempo real.

Gene	Sequencia	Tamanho	Motivo da escolha	Referência
<i>Ppp3r1a</i>	F: GCTGTTTCATTCCGAGGGG	84pb	Candidato ao DFNA58	LEZIROVITZ <i>et al.</i> , 2020
	R: TGCGAGCACATTTCAGGG			
<i>Ppp3r1b</i>	F: GTCAGATTCTGCACAAGGCG	84pb	Candidato ao DFNA58	LEZIROVITZ <i>et al.</i> , 2020
	R: TGTGAGCACATCTCCAAGGG			
<i>Plek</i>	F: AGGTGCGATAGTCAAACAGGG	142pb	Candidato ao DFNA58	LEZIROVITZ <i>et al.</i> , 2020
	R: GCCCAGAGGATCATCTTCACC			
<i>Cnrip1b</i>	F: CAGCCTGTTTCAGTTCAGCATACA	109pb	Candidato ao DFNA58	LEZIROVITZ <i>et al.</i> , 2020
	R: ATGCTGTTGAAGCTGTTCCCC			
<i>Cnrip1a</i>	F: CAACTACGACACTGAGGGCG	101pb	Candidato ao DFNA58	LEZIROVITZ <i>et al.</i> , 2020
	R: AGACGGTTTCGAACATCCCCG			
<i>Elavl4</i>	F: CAGAAGGAGCTGGAACAACCTCT	94pb	Expressão importante na orelha interna/Marcador neuronal SAG	SCHWARZER <i>et al.</i> , 2020; LI <i>et al.</i> , 2020
	R: GCGAGCCACCTGTGGGG			
<i>Gab1</i>	F: TCGACTTGGACCTGGGAAATCAA	106pb	Expressão importante na orelha interna-marcador / Associado a DFNB26	YOUSAF <i>et al.</i> , 2018
	R: TGCTGATCCACCAGCACATAGTCT			
<i>Mettl13</i>	F: AGACATGCAGGCTGTCCAATCAGA	146pb	Expressão importante na orelha interna/ Associado a DFNMI	YOUSAF <i>et al.</i> , 2018
	R: AAGCACTGAGCCCTCTTCCAATCA			
<i>Gsdmeb</i>	F: TCTACAGTCAAACAACACGAGA	141pb	Expressão importante no gânglio espiral/ Associado a DFNA5	HOSOYA <i>et al.</i> , 2016
	R: AGGCACAACACTGGGATCAG			
<i>Gsdmea</i>	F: ACTCCGTTTCTCCATCTTGGTC	103pb	Expressão importante no gânglio espiral/ Associado a DFNA5	HOSOYA <i>et al.</i> , 2016
	R: AGCTTCGTCACGTCTCAGG			
<i>Eya4</i>	F: CCCACTGCCCAAGTATGAA	131pb	Expressão importante o gânglio espiral/ Associado a DFNA10	MATSUZAKI <i>et al.</i> , 2018
	R: GGACTGAATCCACTGCTGCT			
<i>Pou4f1</i>	F: GGACTCGTCAACAACGGACT	108pb	Expressão importante o gânglio espiral/ Marcador de neurônio sensorial em zebrafish	LI <i>et al.</i> , 2020
	R: CACCCCGAGTTTGATCCTCC			
<i>Slc1a3a</i>	F: TGTCGTATCGGGAGGTGAAG	122pb	Expressão importante na orelha interna de Zebrafish e baixa nos tecidos ao redor. Camundongos nulos quanto a este gene, isto é, sem a função deste gene, apresentam fenótipo vestibular de compartimento circling de manifestação tardia aos 7 meses de vida. Há evidências que GLAST desempenhe papel importante tanto em proteger as sinapses da cóclea de exposição a excesso de glutamato extracelular quanto atenuar a perda auditiva decorrente de superestimulação acústica.	THISSE <i>et al.</i> , 2004; CHEN <i>et al.</i> , 2010; SCHRAVEN <i>et al.</i> , 2012.
	R: ACTGTCCAGAGCTGCCATTC			
<i>Rpl13</i>	F: AGCTGCGCTATTCCAAGAAGA	79pb	Gene Endógeno/Housekeeping/Referência	RASSIER <i>et al.</i> , 2020
	R: ACTGCGATCTTGCTCTCAACG			
<i>Ef1a1</i>	F: CTGGAGGCCAGCTCAAAACAT	176pb	Gene Endógeno/Housekeeping/Referência	RASSIER <i>et al.</i> , 2020
	R: ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTAGCATTAC			
<i>Rps18</i>	F: GGGAAATACAGCCAGGTCCTT	88pb	Gene Endógeno/Housekeeping/Referência	RASSIER <i>et al.</i> , 2020
	R: CACGGTGAGCCCTGATCTTC			
<i>Actb2</i>	F: CGTGCTGTCTTCCCATCCA	86pb	Gene Endógeno/Housekeeping/Referência	RASSIER <i>et al.</i> , 2020
	R: TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG			
<i>Sep15</i>	F: CCTGTGAGCTTCTGGGTCAG	115pb	Gene Endógeno/Housekeeping/Referência	XU <i>et al.</i> , 2016
	R: TCAAGGATGGCTCCTGGGTA			
<i>Metap1</i>	F: CCATGCCCCGGGTACAGATA	123pb	Gene Endógeno/Housekeeping/Referência	XU <i>et al.</i> , 2016
	R: CTCCGACATCCCCAAAGGATGA			
<i>Gapdh</i>	F: AATTCTGGGATACACGGAGCACCA	167pb	Gene Endógeno/Housekeeping/Referência	YOUSAF <i>et al.</i> , 2018; RASSIER <i>et al.</i> , 2020
	R: TCAGGTCACATACACGGTTGCTGT			

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

Figura 9: Equação utilizada nos cálculos de quantificação relativa de expressão gênica proposto por PFAFFL (2001). Ratio = Quantificação relativa a amostra calibradora ou controle, E = Eficiência dos *primers*. $\Delta\text{CP}_{\text{target}}$ = diferença nos limiares Cp ou Ct (*cycle threshold*) entre controle e amostra (*sample*) relativo ao gene alvo ou teste; $\Delta\text{CP}_{\text{ref}}$ = diferença nos limiares Cp ou Ct (*cycle threshold*) entre controle e amostra (*sample*) relativo ao gene de referência, endógeno ou *housekeeping*.

4.2 Critérios para análise dos dados de transcriptoma do *zebrafish* e camundongo

Foram feitas buscas no Google usando as palavras-chave “*transcriptome*” e “*inner ear*” para encontrar trabalhos científicos que tivessem realizado este tipo de estudo. Os dados de transcriptoma referente aos valores de RPKM (*Reads Per Kilobase Million*) ou FPKM (*Fragments Per Kilobase Million*) ou *Mean Normalized Counts* de RNAseq foram coletados a partir das tabelas de materiais suplementares e/ou de tabelas disponíveis no NCBI GEO obtidos de trabalhos já publicados cuja análise específica dos genes aqui estudados não foi realizada por não se tratar do foco dos estudos em questão. Esses dados foram retirados dos seguintes artigos científicos: para *Danio rerio* (BAUMGART *et al.*, 2016; OOSTERHOF *et al.*, 2017 e BARTA *et al.*, 2018) e para *Mus musculus* (HERTZANO *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2018 e LI *et al.*, 2020). Como cada estudo teve parâmetros próprios para a análise dos dados já processados (não brutos), não foi possível fazer comparações entre os números de cada um deles, apenas traçar tendências observadas em mais de um estudo, da mesma forma como os sites: SHIELD and gEAR mostram os dados de diferentes estudos. Estudo semelhante a reanálise dos dados de transcriptoma foi realizada por GIFFEN *et al.* (2019) onde ele comparou os resultados entre ortólogos, *zebrafish* e camundongo, em relação a genes diferencialmente expressos em CSs.

BARTA *et al.* (2018) coletaram cerca de 1000 CCs GFP+ contendo seus feixes de estereocílios e mais 1000 células não sensoriais vizinhas à elas GFP- (nsSC) a partir dos epitélios sensoriais (lagena, sáculo e utrículo) de cerca de quatro peixes adultos (11-13 meses) transgênicos onde o gene GFP (fluorescência verde) está sob o controle do promotor *Pou4f3*, para obter dados de transcriptoma de ambos os grupos de células, por meio de RNA-seq. Com isso, eles pretendiam identificar genes com expressão enriquecida nas CCs em comparação com nsSCs, que por isso, poderiam estar por trás da especialização das CCs. O conjunto de dados gerados nesse estudo proporcionou recursos extensos para novas investigações que buscassem entender os mecanismos moleculares que originam a morfologia, função e patologia das CCs

do *zebrafish* adulto, além de estabelecer o arcabouço para caracterizações futuras de genes expressos nas CCs, assim como no que diz respeito ao processo evolutivo desse grupo de células. Quanto aos dados de transcriptoma de microglia, foram utilizados espécimes transgênicos neuro-NTR/mpeg1-GFP de *zebrafish* com 3 meses de idade (OOSTERHOF *et al.*, 2017). Quanto aos dados de transcriptoma de fígado, BAUMGART *et al.* (2016) utilizaram animais adulto de 3 anos.

HERTZANO *et al.* (2011) desenvolveram uma nova técnica para separar os diferentes tipos celulares da cóclea a fim de caracterizar o perfil de expressão de cada um por meio de *array* de expressão contendo 24.000 genes *RefSeq* anotados à época e mais de 7.000 genes preditos utilizando a citometria de fluxo. Foram obtidos transcriptomas de oito tipos celulares diferentes e um dos objetivos foi identificar genes diferencialmente expressos entre os diferentes tipos celulares e com isso foi gerada uma tabela com 3.000 desses genes. Depois eles aplicaram uma análise de *clustering* hierárquico o que permitiu separar estes genes em conjuntos de acordo com o padrão de expressão. A maioria destes *clusters* (conjuntos) apresentou padrões simétricos de expressão entre a cóclea e o vestíbulo, por exemplo, o *cluster* 2 que agrupava genes muito expressos de epitélio sensorial em ambos os órgãos da OI. Em contraste, o *cluster* 7 era formado por genes altamente expressos nas células sensoriais auditivas, mas sem sua correspondência no sistema vestibular. Em seguida eles buscaram verificar se grupos funcionais relacionados a ontologia gênica (GO) estavam enriquecidos em cada *cluster* e encontraram tal correspondência que estava relacionada a função conhecida daquele grupo celular.

No estudo de LI *et al.* (2018), foram comparados os níveis de expressão entre IHC (*inner hair cells* – células ciliadas internas) X OHC (*outer hair cells* - células ciliadas externas) e células de Deiters X células Pilares. As IHC e OHC para a realização do RNAseq.

5. RESULTADOS

5.1 Hibridização *in situ*

Os ensaios de hibridização *in situ* foram iniciados em primeira instância, com o objetivo de observar o padrão de expressão do gene *Cnrip1b* em espécimes de *zebrafish*, nos estágios 4, 5, 6, 7 e 30 dpf. Obtendo-se resultados reprodutíveis e confiáveis, estenderíamos o estudo aos demais ortólogos. Todos os ensaios com a sonda anti-senso (para detectar a expressão do gene alvo) e a sonda senso (controle negativo) foram realizados em paralelo (Figura 10A-B).

De início foi utilizado o protocolo de THISSE;THISSE, (2008) o que permitiu observar um padrão de expressão intenso e ubíquo ao longo de todo o corpo dos espécimes analisados. No cérebro, foi identificada forte marcação nas regiões do telencéfalo, prosencéfalo e do mesencéfalo. Além disso, a marcação em 4 dpf se mostrou mais intensa na região do telencéfalo enquanto que nos estágios larvais 5, 6 e 7 dpf, a expressão do gene *Cnrip1b* se mostrou mais intensa no prosencéfalo e mesencéfalo. No entanto, a alta marcação observada na cabeça e em todo o corpo do espécime dificultou a análise da expressão do *Cnrip1b* nas estruturas mecanossensoriais, principalmente no que diz respeito a marcação na VO (larvas) ou OI (juvenil) (Figura 11A-B, zoom na região da VO das larvas representadas na Figura 10). Desse modo, precisámos otimizar o protocolo.

5.1.1 Gene *Cnrip1b* (Protocolo do Laboratório Varshney)

5.1.1.1 Espécimes no estágio larval (5 dpf)

Após a execução do novo protocolo, foi observado que ocorreu uma maior preservação do tecido e com isso, a marcação se mostrou mais específica e menos difusa. Diferentemente do protocolo de THISSE; THISSE, (2008), para esse mesmo estágio larval (Figura 12A), onde foi observado com clareza marcação positiva apenas em algumas regiões do cérebro e ausente nos demais órgãos vitais, com os novos ajustes, ficou evidente as marcações em outros locais, tanto no cérebro: telencéfalo, prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, no qual, a marcação no mesencéfalo se demonstrou mais intensa em relação as demais regiões, o que confirmou os dados obtidos com o protocolo de THISSE; THISSE, (2008). Além disso, com o protocolo de Laboratório Varshney também foi observada a expressão desse gene ao redor do otólito anterior utricular e nos órgãos internos: coração, pâncreas, fígado e intestino (Figura 12B).

5.1.1.2 Espécimes no estágio Juvenil (30 dpf)

A expressão do gene *Cnrip1b* foi observada no cérebro, sendo mais intensa nas regiões do telencéfalo, prosencéfalo e no coração. Não foi observada expressão nos órgãos internos como bexiga natatória e intestino (Figura 13a-b). Quanto a OI (Figura 13c), não ficou claro se havia expressão nos epitélios sensoriais.

Figura 10: Vista lateral dos espécimes larvais (4, 5, 6 e 7 dpf) e juvenil (30 dpf) após a execução do protocolo de THISSE; THISSE, (2008) para identificar o padrão de expressão do gene *Cnrip1b*. **A)** Vista lateral das larvas com 4, 5, 6 e 7 dpf e juvenil com 30 dpf marcados com a sonda anti-senso, onde se encontra evidenciado em: **Círculo amarelo pontilhado:** delimitação anatômica da VO/OI inteiras, contendo todas as estruturas previstas para cada estágio de desenvolvimento; **Retângulo vermelho pontilhado:** está delimitada a região que contém a presença dos órgãos internos: bexiga natatória, pâncreas, intestino, fígado e coração; **O:** olho. As regiões cerebrais estão identificadas por: **Asterisco:** telencéfalo e prosencéfalo; **M:** mesencéfalo; **R:** rombencéfalo. **B)** Vista lateral das larvas nos estágios de 4, 5, 6, 7 dpf e juvenil de 30 dpf marcados com a sonda senso, evidenciando as mesmas estruturas observadas para a sonda anti-senso, porém sem marcar onde o RNAm do gene alvo está expresso. Barra de escala: 500 µm para as larvas e 200 µm para o espécime juvenil.

Figura 11: Zoom da vista lateral das VO das larvas com 4, 5, 6 e 7 dpf após a execução do protocolo de THISSE; THISSE, (2008) para identificar o padrão de expressão do gene *Cnrip1b*. **A)** Representação *in vivo* e esquemática de uma VO de um espécime larval. As estruturas da VO estão delimitadas por linhas pontilhadas, no qual: **Verde pontilhado:** contorno da morfologia geral da VO; **Vermelho pontilhado:** canais semicirculares; e pelas setas, sendo elas: **Seta amarela:** marcando o otólito posterior sacular que está ligado ao epitélio celular do sáculo. **Seta preta:** marcando o otólito anterior utricular que está ligado ao epitélio celular do utrículo; **Setas brancas:** indicando a posição dos canais semicirculares. **B)** VO marcadas com as sondas anti-senso e sondas controle negativo (senso) para o gene *Cnrip1b*. **Imagem *in vivo* retirada por:** Nascimento, LR; Esquematização baseada na imagem *in vivo*. Barra de escala: 100 μ m.

Figura 12A: Vista lateral das larvas com 5 dpf após a execução do protocolo de THISSE; THISSE, (2008) evidenciando o padrão de expressão ubíquo. As regiões cerebrais estão identificadas por: **Asterisco:** telencéfalo e prosencéfalo; **M:** mesencéfalo; **R:** rombencéfalo. **Círculo amarelo pontilhado:** delimitação anatômica da VO inteira, contendo todas as estruturas previstas para este estágio de desenvolvimento; **Quadrado vermelho pontilhado:** está delimitada a região que contém a presença dos órgãos internos: bexiga natatória, pâncreas, intestino, fígado e coração. **O:** olho; **BN:** Bexiga natatória. As estruturas da VO estão delimitadas por linhas pontilhadas, no qual: **Verde pontilhado:** contorno da morfologia no geral; **Vermelho pontilhado:** canais semicirculares; e pelas setas, sendo elas: **Seta amarela:** marcando o otólito posterior sacular que está ligado ao epitélio celular do sáculo. **Seta preta:** marcando o otólito anterior utricular que está ligado ao epitélio celular do utrículo; **Setas brancas:** indicando a posição dos canais semicirculares. Barra de escala: 500 μ m para as larvas e 100 μ m para as ampliações da VO.

Figura 12B: Vista lateral das larvas com 5 dpf após a execução do protocolo de Laboratório Varshney evidenciando o padrão de expressão em diferentes tecidos. As regiões cerebrais estão identificadas por: **Asterisco:** telencéfalo e prosencéfalo; **M:** mesencéfalo; **R:** rombencéfalo. **Circulo amarelo pontilhado:** delimitação anatômica da VO inteira, contendo todas as estruturas previstas para este estágio de desenvolvimento; **Quadrado vermelho pontilhado:** está delimitada a região que contém a presença dos órgãos internos: bexiga natatória, pâncreas, intestino, fígado e coração. **O:** olho; **BN:** Bexiga natatória; **C:** coração; **F:** fígado; **I:** intestino; **P:** pâncreas. As estruturas da VO estão delimitadas por linhas pontilhadas, no qual: **Verde pontilhado:** contorno da morfologia no geral; **Vermelho pontilhado:** canais semicirculares; e pelas setas, sendo elas: **Seta amarela:** marcando o otólito posterior sacular que está ligado ao epitélio celular do sáculo. **Seta preta:** marcando o otólito anterior utricular que está ligado ao epitélio celular do utrículo; **Setas brancas:** indicando a posição dos canais semicirculares. Barra de escala: 500 µm para as larvas e 100 µm para as ampliações da VO.

Figura 13: Vista lateral dos espécimes com 30 dpf após a execução do protocolo do Laboratório Varshney evidenciando o padrão de expressão em diferentes tecidos para o gene *Cnrip1b*. **A)** Espécime marcado com a sonda anti-senso. **B)** Espécime marcado com a sonda senso. **Asterisco branco:** telencéfalo e prosencéfalo; **M:** mesencéfalo; **R:** rombencéfalo. **O:** olho; **BN:** bexiga natatória; **C:** coração; **F:** fígado; **I:** intestino; **P:** pâncreas. **C)** Ampliação da OI inteira, contendo todas as estruturas previstas para este estágio de desenvolvimento delimitada pelo quadrado pontilhado amarelo, foto da esquerda anti-senso, da direita senso. **Verde pontilhado:** contorno da morfologia no geral; **Seta amarela:** marcando o otólito posterior sacular que está ligado ao epitélio celular do sáculo. **Seta preta:** marcando o otólito anterior utricular que está ligado ao epitélio celular do utrículo; **Setas brancas:** indicando a posição dos canais semicirculares. Barra de escala: 500 µm para as larvas e zoom de 5 X para as ampliações da OI.

5.1.2 Gene *Cnrip1a* (Protocolo do Laboratório Varshney)

5.1.2.1 Espécimes no estágio larval (5 dpf)

Em relação ao padrão de expressão do gene *Cnrip1a*, foi observada marcação nas regiões cerebrais do telencéfalo, prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, assim como observado para o *Cnrip1b*. Também foi observada marcação, no fígado, intestino, bexiga natatória e pâncreas. No entanto, não foi possível confirmar essa marcação como sendo positiva, uma vez que, identificamos no controle negativo (sonda senso) a presença de coloração residual de fundo. Quanto à VO, não foi observada marcação para o gene *Cnrip1a* nesse estágio larval (Figura 14).

5.1.2.2 Espécimes no estágio Juvenil (30 dpf)

A expressão do gene *Cnrip1a* no espécime juvenil de 30 dpf (Figura 15A-B) foi observada no cérebro, sendo mais intensa na região do mesencéfalo e rombencéfalo, no coração e no intestino. Além disso, também apareceu marcação na bexiga natatória bem como a região onde estão localizados os ossículos do Aparelho de Weber que se conectam à bexiga natatória. Na OI (Figura 15C), sua expressão foi observada desde a região superior onde se encontram os três canais semicirculares e o utrículo até a região inferior, onde estão localizados o sáculo e a lagena.

Figura 14: Vista lateral das larvas com 5 dpf após a execução do protocolo de Laboratório Varshney evidenciando o padrão de expressão em diferentes tecidos para o gene *Cnrip1a*. As regiões cerebrais estão identificadas por: **Asterisco:** telencéfalo e prosencéfalo; **M:** mesencéfalo; **R:** rombencéfalo. **O:** olho; **BN:** bexiga natatória; **C:** coração; **F:** fígado; **I:** intestino; **P:** pâncreas. **Circulo amarelo pontilhado:** delimitação anatômica da VO inteira, contendo todas as estruturas previstas para este estágio de desenvolvimento; As estruturas da VO estão delimitadas por linhas pontilhadas, no qual: **Verde pontilhado:** contorno da morfologia no geral; **Vermelho pontilhado:** canais semicirculares; e pelas setas, sendo elas: **Seta amarela:** marcando o otólito posterior sacular que está ligado ao epitélio celular do sáculo. **Seta preta:** marcando o otólito anterior utricular que está ligado ao epitélio celular do utrículo; **Setas brancas:** indicando a posição dos canais semicirculares. Barra de escala: 500 μ m para as larvas e 100 μ m para as ampliações da VO.

Figura 15: Vista lateral dos espécimes com 30 dpf após a execução do protocolo de Laboratório Varshney evidenciando o padrão de expressão em diferentes tecidos para o gene *Cnrip1a*. **A)** Espécime marcado com a sonda anti-senso. **B)** Espécime marcado com a sonda senso. **Asterisco branco:** telencéfalo e prosencéfalo; **M:** mesencéfalo; **R:** rombencéfalo. **O:** olho; **BN:** bexiga natatória; **C:** coração; **F:** fígado; **I:** intestino; **P:** pâncreas. **C)** Ampliação da OI inteira, contendo todas as estruturas previstas para este estágio de desenvolvimento delimitada pelo quadrado pontilhado amarelo, foto da esquerda anti-senso, da direita senso. **Verde pontilhado:** contorno da morfologia no geral; **Seta amarela:** marcando o otólito posterior sacular que está ligado ao epitélio celular do sáculo. **Seta preta:** marcando o otólito anterior utricular que está ligado ao epitélio celular do utrículo; **Setas**

brancas: indicando a posição dos canais semicirculares. Barra de escala: 500 µm para as larvas e zoom de 5 X para as ampliações da OI.

5.1.3 Gene *Ppp3r1a* (Protocolo do Laboratório Varshney)

5.1.3.1 Espécimes no estágio larval (5 dpf)

O gene *Ppp3r1a*, em larvas com 5 dpf, se mostrou intensamente expresso nas regiões cerebrais: telencéfalo, prosencéfalo, mesencéfalo e do rombencéfalo. Assim como, na bexiga natatória, pâncreas, fígado e intestino. Na VO, foi possível observar a expressão do gene *Ppp3r1a* nos canais semicirculares e ao redor dos otólitos associados a mácula sensorial anterior utricular (equilíbrio) e posterior sacular (audição) (Figura 16).

5.1.3.2 Espécimes no estágio Juvenil (30 dpf)

O gene *Ppp3r1a* se mostrou intensamente expresso nas regiões cerebrais: telencéfalo, prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. Também foi possível observar expressão no coração, no intestino (Figura 17A-B) e na porção superior da OI (Figura 17C).

5.1.4 Gene *Plek* (Protocolo do Laboratório Varshney)

5.1.4.1 Espécimes no estágio larval (5 dpf)

A expressão para o gene *Plek* em larvas com 5 dpf também foi observada no cérebro, com maior intensidade nas regiões do mesencéfalo e do rombencéfalo (Figura 18). Na VO a expressão desse gene foi positiva nos canais semicirculares e ao redor da mácula posterior sacular. Não foi identificada marcação em outros órgãos internos.

5.1.4.2 Espécimes no estágio Juvenil (30 dpf)

O gene *Plek* se mostrou intensamente expresso na bexiga natatória e intestino. Não foi possível observar expressão nas regiões cerebrais ou no coração no espécime com 30 dpf (Figura 19A-B). Na OI (Figura 19C), foi identificada uma marcação de menor intensidade, principalmente se comparado ao observado em 5 dpf, na porção inferior.

Figura 16: Vista lateral das larvas com 5 dpf após a execução do protocolo do Laboratório Varshney evidenciando o padrão de expressão em diferentes tecidos para o gene *Ppp3r1a*. As regiões cerebrais estão identificadas por: **Asterisco:** telencéfalo e prosencéfalo; **M:** mesencéfalo; **R:** rombencéfalo. **O:** olho; **BN:** bexiga natatória; **C:** coração; **F:** fígado; **I:** intestino; **P:** pâncreas. **Circulo amarelo pontilhado:** delimitação anatômica da VO inteira, contendo todas as estruturas previstas para este estágio de desenvolvimento; As estruturas da VO estão delimitadas por linhas pontilhadas, no qual: **Verde pontilhado:** contorno da morfologia no geral; **Vermelho pontilhado:** canais semicirculares; e pelas setas, sendo elas: **Seta amarela:** marcando o otólito posterior sacular que está ligado ao epitélio celular do sáculo. **Seta preta:** marcando o otólito anterior utricular que está ligado ao epitélio celular do utrículo; **Setas brancas:** indicando a posição dos canais semicirculares. Barra de escala: 500 µm para as larvas e 100 µm para as ampliações da VO.

Figura 17: Vista lateral dos espécimes com 30 dpf após a execução do protocolo do Laboratório Varshney evidenciando o padrão de expressão em diferentes tecidos para o gene *Ppp3r1a*. **A)** Espécime marcado com a sonda anti-senso. **B)** Espécime marcado com a sonda senso. **Asterisco branco:** telencéfalo e prosencéfalo; **M:** mesencéfalo; **R:** rombencéfalo. **O:** olho; **BN:** bexiga natatória; **C:** coração; **F:** fígado; **I:** intestino; **P:** pâncreas. **C)** Ampliação da OI inteira, contendo todas as estruturas previstas para este estágio de desenvolvimento delimitada pelo quadrado pontilhado amarelo, foto da esquerda anti-senso, da direita senso. **Verde pontilhado:** contorno da morfologia no geral; **Seta amarela:** marcando o otólito posterior sacular que está ligado ao epitélio celular do

sáculo. **Seta preta:** marcando o otólito anterior utricular que está ligado ao epitélio celular do utrículo; **Setas brancas:** indicando a posição dos canais semicirculares. Barra de escala: 500 µm para as larvas e zoom de 5 X para as ampliações da OI.

Figura 18: Vista lateral das larvas com 5 dpf após a execução do protocolo do Laboratório Varshney evidenciando o padrão de expressão em diferentes tecidos para o gene *Plek*. As regiões cerebrais estão identificadas por: **Asterisco:** telencéfalo e prosencéfalo; **M:** mesencéfalo; **R:** rombencéfalo. **O:** olho; **BN:** bexiga natatória; **C:** coração; **F:** fígado; **I:** intestino; **P:** pâncreas. **Circulo amarelo pontilhado:** delimitação anatômica da VO inteira, contendo todas as estruturas previstas para este estágio de desenvolvimento; As estruturas da VO estão delimitadas por linhas pontilhadas, no qual: **Verde pontilhado:** contorno da morfologia no geral; **Vermelho pontilhado:** canais semicirculares; e pelas setas, sendo elas: **Seta amarela:** marcando o otólito posterior sacular que está ligado ao epitélio celular do sáculo. **Seta preta:** marcando o otólito anterior utricular que está ligado ao epitélio celular do utrículo; **Setas brancas:** indicando a posição dos canais semicirculares. Barra de escala: 500 µm para as larvas e 100 µm para as ampliações da VO.

Figura 19: Vista lateral dos espécimes com 30 dpf após a execução do protocolo do Laboratório Varshney evidenciando o padrão de expressão em diferentes tecidos para o gene *Plek*. **A)** Espécime marcado com a sonda anti-senso. **B)** Espécime marcado com a sonda senso. **Asterisco branco:** telencéfalo e prosencéfalo; **M:** mesencéfalo; **R:** rombencéfalo. **O:** olho; **BN:** bexiga natatória; **C:** coração; **F:** fígado; **I:** intestino; **P:** pâncreas. **C)** Ampliação da OI inteira, contendo todas as estruturas previstas para este estágio de desenvolvimento delimitada pelo quadrado pontilhado amarelo, foto da esquerda anti-senso, da direita senso. **Verde pontilhado:** contorno da morfologia no geral; **Seta amarela:** marcando o otólito posterior sacular que está ligado ao epitélio celular do sáculo. **Seta preta:** marcando o otólito anterior utricular que está ligado ao epitélio celular do utrículo; **Setas brancas:** indicando a posição dos canais semicirculares. Barra de escala: 500 μ m para as larvas e zoom de 5 X para as ampliações da OI.

5.1.5 Visão geral do padrão de expressão dos genes: *Cnrip1a*, *Cnrip1b*, *Plek* e *Ppp3r1a* nos estágios de desenvolvimento 5 e 30 dpf

Na Tabela 7 temos o quadro geral de expressão observado nos diferentes tecidos do *zebrafish* e nas duas idades analisadas. Em relação ao cérebro, foi observada marcação para os genes *Cnrip1a*, *Cnrip1b* e *Ppp3r1a* em ambas as idades analisadas com exceção do gene *Plek* no qual no estágio de 30 dpf não foi observado marcação nessa região. Quanto aos órgãos neurossensoriais associados à audição e ao equilíbrio, somente para o *Ppp3r1a* foi confirmada a marcação na VO e OI, para as idades de 5 dpf e 30 dpf. *Cnrip1b* apresentou marcação na VO apenas em 5 dpf, enquanto que *Cnrip1a* mostrou marcação na OI do espécime juvenil. Quanto ao *Plek* observa-se marcação somente na VO de espécimes de 5 dpf.

Tabela 7: Resumo do padrão de expressão dos genes *Cnrip1a*, *Cnrip1b*, *Plek* e *Ppp3r1a* em ambos os estágios de desenvolvimento após a execução da técnica de hibridização *in situ*. (X): presença de expressão; (-): ausência de expressão; (*): expressão inconclusiva.

Gene	Estágio em dpf	Cérebro	VO 5 dpf OI 30 dpf	Coração	Bexiga natatória	Pâncreas	Intestino	Fígado
<i>Cnrip1a</i>	5	X	-	-	*	*	*	*
	30	X	X	X	*	*	X	-
<i>Cnrip1b</i>	5	X	X	X	-	X	X	X
	30	X	*	X	*	*	*	*
<i>Plek</i>	5	X	X	*	-	-	-	-
	30	-	*	*	X	-	X	-
<i>Ppp3r1a</i>	5	X	X	X	X	X	X	X
	30	X	X	X	*	*	X	*

5.2 Imunofluorescência

Para os ensaios de imunofluorescência desse estudo, foram analisadas somente as proteínas dos genes *Cnrip1* e *Ppp3r1*.

5.2.1 *Cnrip1a/Cnrip1b*

Os ensaios de imunofluorescência foram inicialmente padronizados em espécimes larvais de 4, 5 e 7 dpf, onde foram utilizados dois diferentes anticorpos: um disponível comercialmente, *CNRI1* - *Protein Tech* (16827-1-AP) e outro fornecido pelo pesquisador Dr. Ken Mackie da Universidade de Indiana. Ambos os anticorpos foram produzidos a partir da proteína inteira CRIP1a humana que apresenta cerca de 60% de similaridade em relação às

proteínas codificadas pelos genes de *zebrafish* (*Cnrip1a/Cnrip1b*), portanto, com este anticorpo não é possível distinguir se a proteína expressa é codificada pelo *Cnrip1a* ou *Cnrip1b*. O anticorpo fornecido pelo Dr. Mackie teve sua especificidade validada por imunofluorescência em uma linhagem celular com superexpressão de CRIP1a e por competição com peptídeos nas seções da retina do mouse (HU *et al.*, 2010; SMITH *et al.*, 2015). Quanto ao anticorpo comercial, apesar de não ter sua especificidade validada, em experimentos preliminares de *western blotting* realizados em nosso laboratório, utilizando como controle positivo tecido de cérebro de camundongos, ele teve como resultado uma banda única e de grande intensidade na posição próxima a sua massa molecular (MM) de 18kDa (dados não mostrados). Além disso, os ensaios de imunofluorescência em paralelo com os dois anticorpos demonstraram o mesmo padrão de expressão e as mesmas estruturas marcadas, o que contribui para ratificar a especificidade do anticorpo comercial da *Protein Tech*.

Na Figura 20-21, observa-se que o anticorpo anti-Cnrip1 (Mackie) em larvas com 4 dpf marca a rede neuronal presente em toda extensão do corpo e da cabeça do espécime. Além da expressão na inervação sensorial periférica, a proteína também se demonstrou expressa na inervação da VO, dos olhos e na rede nos neuromastos. Tomando como base para a identificação dos neuromastos ao longo da LL e cabeça dos espécimes larvais, a representação esquemática caracterizada por HAEHNEL-TAGUCHI *et al.* (2018) como demonstrado na figura 22, foi possível observar nas larvas de 4 dpf a expressão da proteína codificada dos genes *Cnrip1a/Cnrip1b* nos neuromastos da cabeça e LL.

Padrão de marcação similar foi observado nas larvas com 7 dpf (Figuras 23 e 24) em comparação com a de 4 dpf. No entanto, tivemos dificuldade de identificar os neuromastos presentes na cabeça e ao longo do corpo nessa idade (dados não mostrados) a exemplo do que fizemos com as larvas de 4 dpf. Por outro lado, cabe destacar o fato de que a figura 24 mostra a especificidade dos anticorpos, pois cada marcador (Faloidina – marca F-actina e *Cnrip1a/b*) tem um padrão particular e também confirma que as proteínas dos genes *Cnrip1a/b* parecem estar expressas nos neurônios que fazem inervação dos olhos, bulbo olfatório e OI. Cabe dizer que parece não haver alteração na expressão das proteínas dos genes *Cnrip1a/b* nas idades analisadas de 4 e 7 dpf.

Uma vez que não identificamos padrão de expressão diferenciado entre as idades de 4 e 7 dpf, assim como nos experimentos de hibridização *in situ*, para dar continuidade as análises de imunofluorescência demos preferência para o estágio larval de 5 dpf.

Com a finalidade de confirmar a marcação na rede neuronal, realizamos imunofluorescência com dupla marcação, anti-Cnrip1 e anti-NFH. O anticorpo anti-NFH

reconhece um epítipo fosforilado do neurofilamento de 210 kDa de várias espécies. Os anticorpos para as várias subunidades de neurofilamentos são marcadores celulares úteis, pois além de serem específicos para neurônios também são bioquimicamente estáveis. Na figura 25, observa-se que o anti-Cnrip1 (*Protein Tech*) se co-localiza em várias regiões da cabeça bem como em alguns pontos ao longo do corpo do *zebrafish* com 5 dpf, o que contribui para ratificar a expressão da proteína do gene *Cnrip1* na rede neuronal e neuromastos, uma vez que, a região é ricamente constituída por eles. No entanto, outros marcadores devem ser utilizados para verificar a expressão dessas proteínas em outros tipos celulares, como, por exemplo, para as células ciliadas presentes nas maculas (OI) e nos neuromastos (cabeça e LL).

Figura 20: Vista superior/frontal de toda extensão de uma larva com 4 dpf de *zebrafish* após a execução da técnica de imunofluorescência com anticorpo anti-Cnrp1 [Mackie] (verde). O núcleo celular é evidenciado em azul pela coloração com DAPI. Em vermelho, temos a marcação com faloidina evidenciando os filamentos de actina. Imagens analisadas ao microscópio confocal Zeiss LSM 780 e capturadas com software ZEN. VO: vesícula ótica inteira, contendo todas as estruturas previstas para este estágio de desenvolvimento; **Regiões cerebrais** (P: prosencéfalo; M: mesencéfalo e R: rombencéfalo); **Seta branca:** olhos; **Circulo amarelo:** neuromastos da LLP e da cabeça; **Quadrado amarelo pontilhado:** região de zoom; **Estrela branca:** bulbo olfatório. Barra de escala: 500 μ m e zoom de 200 % na região da cabeça e porção final da cauda do espécime.

Figura 21: Vista superior dorsal da cabeça de uma larva com 4 dpf de *zebrafish* após a execução da técnica de imunofluorescência com anticorpo anti-Cnrp1 [Mackie] (verde). O núcleo celular é evidenciado em azul pela coloração com DAPI. Em vermelho, temos a marcação com faloidina evidenciando os filamentos de actina. Imagens analisadas ao microscópio confocal Zeiss LSM 780 e capturadas com software ZEN. **VO:** vesícula ótica inteira, contendo todas as estruturas previstas para este estágio de desenvolvimento; **Regiões cerebrais (P:** prosencéfalo; **M:** mesencéfalo e **R:** rombencéfalo); **Seta branca:** olhos; **Circulo amarelo:** neuromastos da LLP e da cabeça; **Estrela branca:** bulbo olfatório. Barra de escala: 100 μ m.

Figura 22: Desenho esquemático de uma larva com 6 dpf demonstrando a disposição dos neuromastos ao longo do corpo do espécime. **A)** Vista lateral do espécime larval inteiro. **B)** visão dorsal apenas da cabeça e **C)** visão ventral apenas da cabeça. Em destaque temos demarcado a localização aproximada do gânglio trigêmeo (TG) e gânglio da LLA (AG) e LLP (PG) e os neuromastos: (I) do ramo lateral LLP (L1 – L8); (II) do ramo lateral secundário (LII.1 – LII.4); (III) do ramo dorsal (D1-D3); (IV) do ramo medial (MI1 e MI2); (V) do ramo ótico (O1 e O2); (VI) do ramo infraorbital (IO4); (VII) do ramo supraorbital (SO1, SO2, SO3); ramo nasal (N1 e N2) e (VIII) ramo mandibular (M1); (I a IV) neuromastos com corpos celulares de seus neurônios aferentes no gânglio da LLP / médio-posterior lateral e (V a VIII) neuromastos com corpos celulares de seus neurônios aferentes no gânglio da LLA. Figura adaptada de HAEHNEL-TAGUCHI *et al.* (2018).

Figura 23: Vista superior dorsal da cabeça de uma larva com 7 dpf de *zebrafish* após a execução da técnica de imunofluorescência com anticorpo anti-Cnrp1 [Mackie] (verde). O núcleo celular é evidenciado em azul pela coloração com DAPI. Em vermelho, temos a marcação com faloidina evidenciando os filamentos de actina. Imagens analisadas ao microscópio confocal Zeiss LSM 780 e capturadas com software ZEN. **VO:** vesícula ótica inteira, contendo todas as estruturas previstas para este estágio de desenvolvimento; **Regiões cerebrais (P: prosencéfalo; M: mesencéfalo e R: rombencéfalo); Seta branca:** olhos; **Círculo amarelo:** neuromastos da LLP e da cabeça; **Estrela branca:** bulbo olfatório. Barra de escala: 200 μ m.

Figura 24: Vista lateral da cabeça de uma larva com 7 dpf de *zebrafish* após a execução da técnica de imunofluorescência com anticorpo anti-Cnrip1 [Mackie] (verde). O núcleo celular é evidenciado em azul pela coloração com DAPI. Em vermelho, temos a marcação com faloidina evidenciando os filamentos de actina. Imagens analisadas ao microscópio confocal Zeiss LSM 780 e capturadas com software ZEN. **VO:** vesícula ótica contendo todas as estruturas previstas para este estágio de desenvolvimento; **Regiões cerebrais (P:** prosencéfalo; **M:** mesencéfalo e **R:** rombencéfalo); **Seta branca:** olhos; **Circulo amarelo:** neuromastos da LLP e da cabeça; **Estrela branca:** bulbo olfatório. Barra de escala: 200 μ m.

Figura 25: Vista inferior/ventral da cabeça de uma larva com 5 dpf de *zebrafish* após a execução da técnica de imunofluorescência com anticorpo anti-Cnrp1 [Protein Tech] (verde) e anti-NFH (vermelho). O núcleo celular é evidenciado em azul pela coloração com DAPI. Em vermelho, temos a marcação com anti-NFH evidenciando os neurofilamentos. Imagens analisadas ao microscópio confocal Zeiss LSM 780 e capturadas com software ZEN. **VO:** vesícula ótica contendo todas as estruturas previstas para este estágio de desenvolvimento; **Seta branca:** olhos; **Quadrado branco pontilhado:** região de zoom 200%. Barra de escala: 500 μ m.

5.2.2 *Ppp3r1a/Ppp3r1b*

Os ensaios de imunofluorescência com o anticorpo anti-Ppp3r1a/b foram realizados em espécimes larvais de 5 dpf. O anticorpo comercial utilizado foi produzido a partir da proteína *PPP3R1* humana que apresenta cerca de 100% de similaridade em relação às proteínas codificadas pelos genes de *zebrafish* (*Ppp3r1a/Ppp3r1b*).

Resultados preliminares de imunofluorescência com esse anticorpo mostraram uma marcação similar a observada com o anticorpo anti-Cnrip1, ou seja, marca a rede neuronal, por isso, marca toda extensão do corpo (dados não mostrados) e também cabeça (Figura 26). No entanto, marcações duplas com anticorpos específicos a neurônios devem ser realizadas para poder de fato confirmar a marcação do *Ppp3r1* na rede neuronal.

Figura 26: Vista superior/dorsal da cabeça de uma larva com 5 dpf de *zebrafish* após a execução da técnica de imunofluorescência com anticorpo anti-Ppp3r1a/b (verde). O núcleo celular é evidenciado em azul pela coloração com DAPI. Imagens analisadas ao microscópio confocal Zeiss LSM 780 e capturadas com software ZEN. **VO:** vesícula ótica contendo todas as estruturas previstas para este estágio de desenvolvimento; **Regiões cerebrais (P:** prosencéfalo; **M:** mesencéfalo e **R:** rombencéfalo); **Seta branca:** olhos. Barra de escala: 200 μ m.

5.3 Estudo dos níveis de RNAm dos genes candidatos ao DFNA58, comparação com outros genes com expressão já caracterizada

5.3.1 RT-qPCR

Como evidenciado previamente por (LEZIROVITZ *et al.*, 2020), a expressão dos genes alvos foi demonstrada em camundongos como sendo majoritariamente presente em células da

cóclea que não as CCs, assim como nos corpos celulares dos neurônios do gânglio espiral. Por isso, nosso objetivo foi verificar se isso era também observado na OI do *zebrafish*. Desse modo, o primeiro passo foi constatar se os genes alvos são expressos no neurepitélio sensorial da lagena e utrículo (devido a maior facilidade de serem dissecados tomando como referência a posição de seus otólitos acoplados, em relação ao sáculo) de espécimes adultos, dado que nosso foco são todas as células importantes para a audição, não somente as células ciliadas. Nos primeiros experimentos, foi comparado o padrão de expressão entre as diferentes idades adultas para as quais a OI foi coletada, como não se observou diferença significativa, continuou-se apenas com a idade de 2 anos.

Para efeitos da comparação dos níveis de expressão com outros genes relacionados a audição ou sua perda, cujo padrão de expressão em camundongo se mostrou semelhante aos dos nossos genes, foram escolhidos os seguintes alvos: **1)** já consagrados (alta evidência, <https://panelapp.genomicsengland.co.uk/> como responsáveis por perda auditiva), os genes *Eya4* e *Dfna5* (*Gsdmea* e *Gsdmeb*); **2)** Alta expressão em neurônios sensoriais ou no gânglio estato-acústico, equivalente ao gânglio espiral em camundongos, os genes *Pou4f1* e *Elavl4*; **3)** Expressão majoritariamente na OI de *zebrafish* e com possível papel na audição em camundongos, gene *Sc11a3a* e **4)** Devido a relação do gene *CNRIP1* com câncer em humanos, foi formulada a hipótese de que sua função na audição poderia ter a ver com o processo de apoptose, o que tornou os genes *Gab1* (uma estrutura essencial na via do receptor tirosina quinase / HGF do proto-oncogene MET/MET/HGF), responsável pela forma de perda auditiva DFNB26 e seu modificador, *Mettl13*, interessantes dado que genes com padrões de expressão semelhantes podem compartilhar a mesma via biológica.

5.3.1.1 Confirmação da especificidade dos *primers* dos genes

A fim de confirmar a especificidade dos nossos *primers* dos genes alvo (*Cnrip1*, *Ppp3r1* e *Plek*) foram sequenciados os produtos de PCR gerados na RT-qPCR com as amostras da OI. Na figura 27 estão as sequências obtidas e o resultado da busca delas na ferramenta BLAT (KENT, 2002). Os genes de perda auditiva também foram sequenciados, contudo, apenas dois deles, *Eya4* e *Mettl13* apresentaram divergências entre as sequências obtidas de diferentes tecidos.

Após as amplificações de PCR em tempo real, os fragmentos foram submetidos a curva de dissociação ou *melting*. Se os *primers* estão específicos o esperado é obter um único pico de fluorescência específico para a sequência de DNA amplificada. Dois genes merecem mais

detalhes quanto as curvas de *melting*, *Eya4* e *Mettl13*. Nas amostras dos neuroepitélios sensoriais (lagena+utrículo), coração, bexiga natatória e OI, foi observado um único pico para o gene *Eya4* (Figura 28A). No entanto, foram observados dois picos na curva de *melting* nas amostras de cérebro (Figura 28B) indicando a amplificação de dois fragmentos distintos. O sequenciamento de ambos os *amplicons*, oriundos da amostra do cérebro e lagena+utrículo, revelou que o *amplicon* dos neuroepitélios sensoriais corresponde ao esperado pelos *primers* desenhados, *primer forward* no exon 5, *primer reverse* no exon 7, pegando assim as sequências dos exons 6-7 devido à proximidade do *primer F* ao final do exon 5 (Figura 29). Porém, a sequência do *amplicon* gerado na amostra de cérebro se alinha com o intron 6 e possivelmente exon 6 (transcrito de referência ENSDART00000158755.2 - NM_001282173.1). A sequência do intron 6 é intrônica em todas as sequências de transcritos alternativos listados no site *Ensembl* e a ferramenta de alinhamento com o genoma *Blat*, não acusa alinhamento com nenhuma região exônica. Logo, chegou-se à conclusão de que pode se tratar de um transcrito ainda não descrito ou depositado nestes bancos de dados. A hipótese é que a sobreposição de picos visualizada no final do cromatograma apresentado na figura 29 provavelmente pode ter sido ocasionado por um artefato de derrapagem da polimerase por conta da sequência de bases Timina, também pode explicar o pico duplo na curva de *melting* do RT-qPCR. Apesar de serem sequências de amostras diferentes, ainda são do mesmo gene, portanto, podem ser analisados juntas, mas com cautela. Seria interessante repetir futuramente o experimento mudando alguns parâmetros para ver se as sequências amplificadas de cada tecido se alteram.

Caso semelhante ocorreu com o gene *Mettl13*, no qual, nas amostras de cérebro, coração, bexiga natatória e OI foi observado um único pico na curva de *melting* indicando amplificação específica do fragmento de DNA (Figura 28C). Porém, nas amostras do neuroepitélio sensorial, observam-se dois picos na curva de *melting*, indicando a amplificação de dois fragmentos distintos (Figura 28D). De fato, o sequenciamento indicou a presença de dois fragmentos sobrepostos na amostra de lagena+utrículo, contudo, não foi observado o mesmo para a amostra de cérebro. A inspeção visual e alinhamento das sequências nos bancos de dados, indicam que na amostra do neuroepitélio sensorial, além do transcrito previsto nos bancos de dados, também foi amplificado um transcrito com retenção do intron 3. Esse evento pode decorrer da presença de transcrito não descrito, restrito a um tecido específico ou de artefatos da técnica. Embora tenha sido feita a quantificação relativa incluindo essas amostras com pico duplo para ter uma ideia do cenário em que esses genes estão expressos nos tecidos de interesse nesse modelo animal, seu resultado foi considerado com cautela.

Figura 27: Sequenciamento e alinhamento quanto a referência do banco de dados dos genes principais em investigação.

Figura 28: Curvas de *Melting* dos genes *Eya4* e *Mettl13* em estudo por meio de RT-qPCR. **A)** Curva de *melting* dos fragmentos amplificados com os *primers* para o gene *Eya4* a partir das amostras de lagena+utrículo, coração, bexiga natatória e orelha interna; **B)** Curva de *melting* dos fragmentos amplificados a partir das amostras de lagena + utrículo (pico único) e cérebro (dois picos muito próximos) o que poderia indicar a detecção de dois transcritos diferentes; **C)** Curva de *melting* dos fragmentos amplificados com os *primers* para o gene *Mettl13* a partir das amostras de cérebro, coração, bexiga natatória e orelha interna; **D)** Curva de *melting* dos fragmentos amplificados a partir das amostras de cérebro (pico único) e lagena + utrículo (dois picos muito próximos) o que poderia indicar a detecção de dois transcritos diferentes.

Figura 29: Exemplos dos diferentes transcritos amplificados com os *primers* do gene *Eya4* a partir de amostras de lagena+utrículo ou cérebro.

5.3.1.2 Eficiência dos *primers*

Foram feitas três diluições seriadas (fator de diluição 1:5) a fim de obter uma curva padrão com quatro pontos. Na Tabela 8 estão os valores de eficiência obtidos. Embora o ideal seja que todos tenham uma eficiência entre 90% e 110%, não foram obtidos valores dentro deste intervalo para todos os genes. Para contornar este problema, foi utilizado o método de quantificação relativa proposto por PFAFFL, (2001) que inclui na equação o valor da eficiência de cada *primer*.

Tabela 8: Eficiência dos *primers* utilizados na quantificação relativa.

Primers Gene	Eficiência	Primers Gene	Eficiência
<i>Ppp3r1a</i>	<u>67%</u>	<i>Slc1a3</i>	95%
<i>Ppp3r1b</i>	<u>80%</u>	<i>Gsdmea</i>	96%
<i>Cnrip1b</i>	<u>75%</u>	<i>Pou4f1</i>	<u>111%</u>
<i>Cnrip1a</i>	96%	<i>Gapdh</i>	92%
<i>Plek</i>	105%	<i>Gab1</i>	94%
<i>Eya4</i>	99%	<i>Actb2</i>	106%
<i>Elavl4</i>	97%	<i>Rpl13</i>	94%
<i>Gsdmeb</i>	95%	<i>Gapdh</i>	92%

5.3.1.3 Genes de referência

Foram analisados em todos os tecidos, cinco genes de referência a fim de obter ao menos dois que tivessem valores de desvio padrão (DP) menores de 2 ao se analisar os valores de Ct de todos os tecidos analisados. Na tabela 9, estão evidenciados os valores de Ct e DP dos três genes de referência que mostraram os melhores resultados de reprodutibilidade, estabilidade e eficiência de amplificação entre 90 e 110%. Em virtude dos menores valores de desvio padrão, foram utilizados como referência os genes *Rpl13* e *Actb2*, os mesmos dois genes escolhidos por BARTA, (2016). Foram utilizados dois genes de referência (média geométrica) para a normalização quanto a expressão dos genes estudados e de outros genes associados a PA, portanto com expressão relevante na OI. A escolha dos genes de referência é sempre um desafio, pois em cada tipo de experimento, um deles pode ser mais adequado que outro. As boas práticas quanto ao RT-qPCR defendem o uso da média geométrica ou mediana dentre ao menos dois genes de referência para normalização. Apesar do gene *Gapdh* ser amplamente utilizado

(YOUSAF *et al.*, 2018), ele apresentou grande variação de expressão nos tecidos analisados neste estudo, enquanto que os genes *Actb2* e *Rpl13* se mostraram mais estáveis e, portanto, mais adequados para serem utilizados como genes de referência. De fato, MCCURLEY; CALLARD, (2008) estudaram a estabilidade de expressão de seis genes de referência quanto a diferentes etapas de desenvolvimento, administração de drogas e diferentes tecidos. Eles verificaram que *Gapdh* foi um dos menos estáveis quando vários tecidos foram analisados.

Tabela 9: Valores de *Cycle Threshold* (Ct) para os diferentes genes nos diferentes tecidos.

Gene	Média de C _t ± DP nos diferentes tecidos					
	LG+UT	CER	COR	BN	OI	DP
<i>Ppp3r1a</i>	28,19±0,81	21,76±0,00	26,70±0,10	17,84±0,32	19,84±0,04	
<i>Ppp3r1b</i>	28,60±0,04	21,65±0,06	23,83±0,09	21,85±0,14	25,29±0,07	
<i>Cnrip1b</i>	33,44±0,68	26,38±0,06	34,02±0,24	28,18±0,32	33,97±0,30	
<i>Cnrip1a</i>	28,87±0,27	23,05±0,12	28,18±0,10	28,09±0,24	28,15±0,31	
<i>Plek</i>	29,95±0,25	26,83±0,19	26,53±0,12	27,34±0,08	26,42±0,10	
<i>Slc1a3a</i>	25,21±0,11	24,51±0,02	25,44±0,05	23,66±0,06	24,69±0,09	
<i>Eya4</i>	29,94±0,53	32,78±0,12	30,83±0,46	32,10±0,40	29,42±0,34	
<i>Elavl4</i>	27,88±0,12	21,45±0,16	29,30±0,18	28,37±0,17	26,36±0,12	
<i>Gsdmeb/Dfna5b</i>	30,28±0,16	28,92±0,37	28,32±0,32	26,19±0,19	27,03±0,06	
<i>Gsdmea/Dfna5a</i>	30,42±0,12	28,27±0,02	27,29±0,13	26,61±0,24	27,20±0,03	
<i>Pou4f1</i>	24,72±0,26	24,70±0,19	undet.	26,33±0,11	26,97±0,15	
<i>Gab1</i>	30,13±0,31	27,14±0,05	26,28±0,03	23,05±0,12	27,31±0,15	
<i>Mettl13</i>	29,21±0,16	27,78±0,34	29,04±0,5	22,95±0,08	29,38±0,16	
<i>Gapdh</i>	26,42±0,30	21,87±0,07	14,97±0,12	16,09±0,24	18,58±0,04	4,50
<i>Actb2</i>	21,08±0,30	17,28±0,04	17,49±0,12	15,67±0,22	17,17±0,03	1,94
<i>Rpl13</i>	22,84±0,09	19,82±0,30	18,65±0,15	17,84±0,32	19,84±0,04	1,83

LG+UT=Lagena+Utriculo, CER=Cérebro, COR=Coração, BN=Bexiga Natatória, OI=Orelha Interna

DP=desvio Padrão

5.3.1.4 Comparação entre os níveis de expressão dos genes de estudo em relação ao valor de Cts

Nos gráficos da Figura 30, há uma comparação geral dos níveis de expressão dos vários genes nos tecidos alvos. Para isso, foram obtidos valores de *deltaCt* (diferença entre o valor de Ct do gene alvo em relação ao gene de referência, no caso mediana de dois genes de referência, lembrando que quanto maior a expressão, menor o Ct). Levando em consideração os níveis de expressão altíssima de alguns genes de referência (Cts abaixo de 20), alta expressão (Cts entre 20 e 27), expressão mediana (Cts entre 28 e 32) e baixa expressão (Cts acima de 33), nosso alvo inicial foi determinar se os genes candidatos ao locus DFNA58 eram expressos na lagena+utrículo de espécimes de *zebrafish* adultos. Dessa forma, com base nos valores de Ct, é possível dizer que *Ppp3r1a*, *Ppp3r1b*, *Cnrip1a* e *Plek* têm expressão mediana, ao passo que

Cnrip1b tem baixa expressão nestes tecidos. Apesar de todos os genes candidatos ao locus DFNA58 investigados por RT-qPCR se mostrarem expressos tanto na OI como um todo (Figura 30A) quanto nos dois tecidos dissecados oriundos da OI (lagena+utrículo) (Figura 30B), em todos os casos, esses genes se mostraram mais expressos nos neuroepitélios sensoriais comparado a OI inteira, o que pode sugerir que de fato todos eles têm expressão associada ao neuroepitélio sensorial. Essa hipótese poderia ser testada em um novo experimento, analisando genes expressos nos outros tecidos que compõe a OI.

Como os valores de Ct dos genes de referência são menores porque eles são mais expressos, são obtidos valores negativos e mais próximos de zero (menor a diferença entre alvo e referência) quanto maior for a expressão. Para facilitar a construção do gráfico, o *deltaCt* foi invertido ficando $1/\text{deltaCt}$ (KROHS *et al.*, 2020; BARTA *et al.*, 2018). Foi observado, que o *Cnrip1b* é o gene de menor expressão, como apontado nos dados de transcriptomas de BARTA *et al.* (2018) apresentados na próxima sessão.

Na OI, o gene *Slc1a3a* apresentou maior expressão assim como já previsto na literatura sendo seguido dos nossos genes candidatos *Ppp3r1a* e *Ppp3r1b*, sugerindo que eles podem desempenhar papel fundamental na audição, dado que mostraram inclusive expressão em nível superior em relação a genes consagrados como associados a PA como *Eya4*, *Gsdmea*, *Gsdmeb*, *Gab1* e *Mettl13*. Após nossos genes candidatos, destacam-se os genes *Elavl4* e *Pou4f1*, considerados importantes no processo neuronal da audição, possivelmente devido a parcela não tão expressiva do tecido neuronal coletado em nossas amostras. Enquanto *Cnrip1a* mostrou expressão superior ao *Eya4* e *Mettl13*, porém inferior a *Gsdmea*, *Gsdmeb* e *Gab1*.

No entanto, analisando especificamente os epitélios neurosensoriais (lagena+utrículo), destaca-se a expressão do gene *Pou4f1* (marcador neuronal com expressão importante no gânglio estado-acústico). Em seguida, novamente aparece o gene *Slc1a3a*, seguido pelo *Elavl4* considerado um marcador de neurônio sensorial. Nossos genes candidatos, *Ppp3r1a* seguido de *Ppp3r1b* e novamente, mas em menor diferença do que observado na OI, o gene *Cnrip1a*, com expressão aparentemente superior aos demais genes ou ao menos, expressão semelhante, aos genes consagrados de PA *Eya4*, *Gsdmea*, *Gsdmeb*, *Gab1* e *Mettl13*. O gene *Cnrip1b* é o que apresentou menor expressão de todos os genes pesquisados, já o *Plek*, apresentou nível de expressão semelhante a genes consagrados.

As análises de expressão no cérebro (Figura 30C) evidenciaram o nível superior de expressão do gene *Elavl4*, seguido pelos genes *Ppp3r1a* e *Ppp3r1b*. Níveis mais baixos, porém superior aos demais, foram observados para o gene *Cnrip1a* mostrando a associação dele com células neuronais, onde o padrão observado foi maior do que em relação os genes *Slc1a3a* e

Pou4f1. Já os genes *Cnrip1b* e *Plek* apresentaram nível de expressão superior em relação aos genes de PA analisados.

No coração (Figura 30D), o gene *Ppp3r1b* apresentou maior expressão dentre os genes analisados, seguido por *Gab1*, *Slc1a3a*, *Plek* e logo depois o *Ppp3r1a*. O transcrito do gene *Pou4f1* não pode ser detectado e o gene *Cnrip1b* se demonstrou menos expresso. Na bexiga natatória (Figura 30E), o gene *Ppp3r1b* apresentou maior expressão seguido dos genes *Gab1*, *Mettl13*, *Ppp3r1a* e o *Slc1a3a*. O marcador neuronal *Pou4f1* demonstrou expressão semelhante aos genes de perda auditiva, *Gsdmea*, *Gsdmeb*, *Plek*, *Cnrip1a* e *Cnrip1b* demonstraram níveis de expressão semelhantes aos níveis de *Elavl4*. Neste órgão, o gene de menor expressão foi o *Eya4*.

5.3.1.5 Comparação entre os níveis de expressão do RNAm entre os genes de estudo em diferentes tecidos

Os níveis de expressão do RNAm de cada gene, avaliado nos diferentes tecidos estão representados nos gráficos da figura 31 no qual, os asteriscos representam os resultados que se mostraram estatisticamente significativos. Nos gráficos da figura 31 e na tabela 10, foi utilizada como amostra controle normalizadora, nosso tecido alvo (lagena+utrículo). Dessa forma, os valores obtidos para as demais amostras irão evidenciar quantas vezes os genes de interesse estão mais expressos (para maior ou menor) em relação a expressão observada desses mesmos genes no tecido-alvo.

Para os genes *Ppp3r1a* e *Ppp3r1b* foi observada expressão 3,6 X e 5,53 X, respectivamente, mais elevadas no cérebro do que em relação a constatada na lagena+utrículo. Cabe destacar que o nível de expressão observado para o gene *Ppp3r1a* nesses tecidos é ao menos, o dobro se comparado aos demais tecidos analisados, sendo mais que 3 X maior se considerar a expressão da OI. Nos neuroepitélios sensoriais da lagena+utrículo ambos os genes *Ppp3r1* obtiveram maiores níveis de RNAm em relação a expressão da OI como um todo evidenciando sua maior expressão nesses epitélios celulares.

Quanto ao gene *Cnrip1a*, apesar da expressão no cérebro ser 5 X maior do que a observada para a amostra de lagena+utrículo, estava bem baixa nos demais tecidos pesquisados, sugerindo a existência de função gênica relevante para estes dois tecidos em específico. Na OI, embora tenha apresentado maior expressão que na bexiga natatória e coração, sua expressão (0,12 X) foi bem inferior a expressão obtida para os neuroepitélios sensoriais. Em outras palavras, a expressão na lagena+utrículo é 8 X maior do que na OI inteira, o que poderia sugerir

que de fato o gene *Cnrip1a* tem expressão essencial ao neuroepitélio sensorial. Quanto ao gene *Cnrip1b*, a expressão observada para a amostra de lagena+utrículo, estava muito próxima ao limite de detecção das nossas condições experimentais (Ct 33-34), por isso o grande desvio padrão (1,02), que mesmo repetindo o experimento, se manteve. Apesar do valor semelhante para a bexiga natatória também ter sido constatado, os resultados mais reprodutíveis atestados pelo desvio padrão dentro do esperado (0,16) indicam que a expressão neste órgão é mais estável, mesmo que em baixos níveis. Coração e OI mostraram níveis de expressão semelhantes, novamente mostrando que os genes analisados possuem expressão com maior intensidade no neuroepitélio sensorial e não nas células ao redor. A expressão no cérebro se mostrou quase 10 X maior o que nos leva a crer que quatro dos nossos genes de interesse (*Cnrip1a/b* e *Ppp3r1a/b*) têm expressão mais relevante nos tecidos ricos em neurônios.

Quanto ao *Plek*, sua expressão apresentou níveis semelhantes na lagena+utrículo, cérebro e coração, contrastando com a menor expressão na bexiga natatória e novamente na OI, menor em relação aos neuroepitélios sensoriais. No entanto, há diferença menos expressiva se comparada aos outros genes candidatos, indicando uma expressão mais ubíqua do que diferencial entre os tecidos pesquisados.

Como levantado na revisão bibliográfica (item 3.5), na literatura tem se buscado por genes diferencialmente expressos, geralmente comparando-se as células ou tecido alvo com as vizinhas ou tecido semelhante nos padrões de expressão gênica, mas com funções específicas a fim de revelar novas vias cruciais a um determinado processo biológico. Desta forma, dentre os nossos candidatos se destaca o *Cnrip1a* como melhor candidato a desempenhar papel na audição do *zebrafish*, por apresentar expressão em níveis médios e estar diferencialmente expresso na lagena+utrículo, epitélios compostos majoritariamente por células ciliadas, em relação a OI inteira, possivelmente devido a maior participação no processo de mecanotransdução. Todavia, não se exclui a participação desse gene nas demais vias biológicas presentes nos demais tecidos pesquisados. Da mesma forma, se destaca o gene *Ppp3r1a* pela expressão diferencial em relação a OI, porém em menores níveis que o *Cnrip1a*.

Figura 30: Comparação entre os níveis de expressão dos diferentes genes de estudo em relação ao valor de Ct em tecidos do espécime de *zebrafish* adulto. **A)** Níveis de expressão entre diferentes genes na orelha interna. **B)** Níveis de expressão entre diferentes genes na lagena + utrículo. **C)** Níveis de expressão entre diferentes genes no cérebro. **D)** Níveis de expressão entre diferentes genes no coração. **E)** Níveis de expressão entre diferentes genes na bexiga natatória.

Tabela 10: Quantificação relativa de cada gene nos diferentes tecidos.

Gene	Quantificação relativa do nível de mRNA (normalizado pelo controle)				
	LG+UT	CER	COR	BN	OI
<i>Ppp3r1a</i>	1±0,12	3,6±0,08	0,21±0,01	0,45±0,05	0,31±0,02
<i>Ppp3r1b</i>	1±0,12	5,53±0,32	1,11±0,08	2,22±1,27	0,67±0,00
<i>Cnrip1b</i>	1,29±1,02	9,76±0,58	0,07±0,04	1,03±0,16	0,07±0,04
<i>Cnrip1a</i>	1,00±0,06	5,05±0,29	0,09±0,04	0,05±0,01	0,12±0,08
<i>Plek</i>	1,03±0,29	1,11±0,12	0,99±0,10	0,23±0,01	0,77±0,02
<i>Slc1a3a</i>	10,1±0,21	0,15±0,0,1	0,02±0,00	0,01±0,00	0,14±0,00
<i>Eya4</i>	1,05±0,37	0,01±0,00	0,06±0,04	0,01±0,00	0,16±0,06
<i>Elavl4</i>	1,01±0,22	7,28±0,59	0,03±0,00	0,02±0,00	0,27±0,04
<i>Gsdmeb/Dfna5b</i>	1,01±0,15	0,24±0,06	0,18±0,04	0,24±0,06	0,84±0,01
<i>Gsdmea/Dfna5a</i>	1,00±0,05	0,40±0,02	0,55±0,06	0,35±0,05	0,83±0,06
<i>Pou4f1</i>	1,00±0,08	0,08±0,01	0	0,01±0,00	0,02±0,00
<i>Gab1</i>	1,03±0,37	0,87±0,01	1,20±0,05	5,36±0,31	0,78±0,04
<i>Mettl13</i>	1,02±0,25	0,27±0,06	0,08±0,03	2,91±0,09	0,08±0,01

Quanto aos demais genes já consagrados como importantes à audição (Figura 32) que foram utilizados como referência para as análises de nossos genes alvos (*Cnrip1*, *Ppp3r1* e *Plek*), foi verificado que de fato o gene *Slc1a3a* é bem mais expresso nos neuroepitélios sensoriais do que nos demais tecidos, cenário muito semelhante ao observado para o gene *Eya4*. Para o gene *Elavl4*, um marcador de neurônios sensoriais, a expressão no cérebro foi 7 X maior em relação a lagena+utrículo, que aparece em segundo lugar no que diz respeito a expressão diferencial em relação a OI, mas principalmente, em relação a observada para o coração e bexiga natatória. Já o marcador neuronal *Pou4f1*, se demonstrou superiormente expresso na lagena+utrículo, inclusive não sendo possível detectá-lo no coração, órgão para o qual ele tem expressão relevante durante o desenvolvimento embrionário (Tabela 12). Sua relevância para a OI do *zebrafish* ainda não foi relatada, mas em camundongos, sabe-se estar associada ao desenvolvimento dos neurônios do gânglio espiral (DENG *et al.*, 2014) no período neonatal P1 e pós-natal P30. Em relação ao gene de PA *Gab1*, pareceu apresentar expressão maior, porém não significativa em relação ao cérebro e a OI inteira. Vale ressaltar que a expressão na bexiga natatória foi quase 5 X maior do que na lagena+utrículo, dado semelhante ao que se observa para o gene modificador da mesma via de *Gab1*, o *Mettl13*, o que pode sugerir que a via a qual compartilham na audição também tem relevância para a bexiga natatória do peixe. Outro fato

interessante é que no coração esses níveis de expressão são invertidos, *Mettl13* tem baixa expressão, quando comparado a lagena+utrículo, assim como na OI.

Figura 31: Comparação entre os níveis de expressão de RNAm dos genes candidatos em relação aos diferentes tecidos em estudo: **LG+UT:** lagena+utrículo; **CER:** cérebro; **COR:** coração; **BN:** bexiga natatória; **OI:** orelha interna.

Figura 32: Comparação entre os níveis de expressão de RNAm dos genes de referência em relação aos tecidos: **LG+UT:** lagena+utrículo; **CER:** cérebro; **COR:** coração; **BN:** bexiga natatória; **OI:** orelha interna.

5.3.2 Transcriptoma – Reanálise dos dados previamente descritos na literatura

5.3.2.1 Zebrafish (*Danio rerio*)

Os dados de transcriptoma do *zebrafish* evidenciaram que todos os genes, exceto *Cnrip1b*, apresentam alguma expressão nas células da OI, sejam ciliadas ou vizinhas. Sem dúvidas, dados mais promissores são vistos para o gene *Cnrip1a* onde os altos níveis de expressão nas CCs (ver Tabela 11 e Figura 33), sendo sua expressão mais elevada nas CCs, muito semelhante ao observado para os genes *Eya4* (DFNA10), *Pou4f1*, *Mettl13* (DFNM1) e *Slc1a3a*, com expressão consagrada na OI. Em segundo lugar, o gene *Ppp3r1b*, seguido pelo *Ppp3r1a* e por último o *Plek*, quanto ao nível de expressão nas CCs. Considerando as células vizinhas *Ppp3r1b* (com a maior expressão nessas células dentre os genes pesquisados) se destaca sendo seguido por de *Ppp3r1a*, *Plek* e por fim *Cnrip1a*.

Embora em nossos ensaios de RT-qPCR tenham sido realizados com o neuroepitélio inteiro, ou seja, incluindo as CCs+vizinhas, ainda assim o destaque para gene diferencialmente

expresso é o *Cnrip1a*. Genes diferencialmente expressos entre variados grupos celulares de um mesmo órgão ou tecido tem maiores chances de exercer funções de destaque. Por essa razão, BARTA *et al.* (2018) elaboraram uma tabela desses genes onde a diferença entre $\log_2$ dos valores RPKM era superior a 1,6 entre CCs e suas vizinhas. Dos genes pesquisados aqueles que constam da lista (Tabela 11) de BARTA *et al.* (2018) como diferencialmente mais expressos nas células ciliadas são: *Cnrip1a*, *Eya4* e *Slc1a3a*, *Pou4f1* e *Mettl13*.

Os genes candidatos ao locus DFNA58 (Figura 34) apresentaram diferenças de expressão entre CCs em comparação às vizinhas, porém não significativas: *Ppp3r1a* (RPKM de 6,99 X 3,75), *Ppp3r1b* (RPKM de 10,63 X 12,80) e *Plek* (RPKM de 2,65 X 1,4), assim como os demais genes pesquisados. O gene *Plek* mostrou expressão maior na microglia do que nas células da OI o que também foi observado para o gene *Ppp3r1b*. O gene *Eya4* se demonstrou mais expresso nas CCs (5.88 X – $\log_2$) em relação as suas vizinhas, ordem de grandeza semelhante ao observado para o *Cnrip1a*. O gene *Slc1a3a* também mostrou expressão alta nos dois outros tecidos, microglial e fígado, porém mais elevada nas CCs da OI.

Já em relação aos genes do *Dfna5*, *Gsdmea* (com maior expressão no fígado, embora baixa) e *Gsdmeb*, se comparados com os genes *Elval4*, *Gab1*, *Mettl13* e *Plek*, não apresentaram grande expressão nas células da OI. Essa observação nos permite hipotetizar que as células estudadas não eram as únicas relevantes à função auditiva ou que o nível de expressão nem sempre nos fornece um panorama da importância do gene em cada célula ou órgão BARTA *et al.* (2018).

Na Tabela 12, estão demonstrados os dados retirados da literatura referente aos diferentes tecidos e idades do espécime *zebrafish* em relação os genes com expressão consagrada na OI utilizados nas comparações com os nossos genes candidatos, bem como o que se já tem descrito de nossos genes alvos. Observa-se que há poucos dados referentes a espécimes adultos, dessa forma não podemos dizer que nossos dados corroboram ou não os dados da literatura, mas a complementam. De *Cnrip1a* e *Cnrip1b* os dados de FIN *et al.* (2017) apontam a expressão em vários tecidos, mas não detalha acerca da expressão na OI, o que foi definitivamente apontado pelo presente estudo quanto ao gene *Cnrip1a*.

Tabela 11: Valores de RPKM dos dados de transcriptoma de: OOSTERHOF *et al.*, 2010, BAUMGART *et al.*, 2016 e BARTA *et al.*, 2018. Na última coluna, estão destacados os genes diferencialmente expressos entre células ciliadas e suas vizinhas dentre aqueles por nós estudados.

	Zebrafish adulto (11-13 meses)		Zebrafish adulto (3 meses)	Zebrafish adulto (~36 meses)	Zebrafish adulto (11-13 meses)
Ref	Barta et al., 2018		Oosterhof et al., 2017	Baumgart et al., 2016	Barta et al., 2018
Gene	célula/tecido				Fold difference (Log2)
	CC	ncSC	Microglial	Fígado	CC/ncSC
<i>Plek</i>	2,65±2,96	1,4±0,43	96,19±19,13	0,94±0,67	-----
<i>Ppp3r1a</i>	6,99±0,99	3,75±0,51	8,93±4,60	2,19±0,26	-----
<i>Ppp3r1b</i>	10,63±0,77	12,80±0,14	20,96±1,06	6,85±0,44	-----
<i>Cnrip1a</i>	52,01±1,17	0,92±0,27	0,32±0,32	0,07±0,04	5,83
<i>Cnrip1b</i>	0	0	0,00	0,02±0,03	-----
<i>Slc1a3a</i>	62,12±2,58	5,17±0,5	40,56±3,32	32,43±3,02	3,59
<i>Eya4</i>	140,07±3,29	2,38±0,27	0,10±0,17	0,33±0,11	5,88
<i>Elavl4</i>	4,00±0,18	2,29±0,6	1,14±0,17	0,02±0,01	-----
<i>Gsdmea</i>	0	0,2±0,03	2,55±1,01	4,79±1,47	0,20
<i>Gsdmeb</i>	5,5±0,2	4,85±0,56	0,24±0,26	0,00	-----
<i>Pou4f1</i>	35,65±2,45	0,11±0,02	0,09±0,1	0	8,30
<i>Gab1</i>	6,98±0,13	8,94±1,24	8,57±3,03	2,87±0,61	-----
<i>Mettl13</i>	0,37±0,07	0,98±0,03	1,38±0,89	0,42±0,1	1,39

Figura 33: Valores de RPKM (vide Tabela 11 plotados em gráficos por tipo celular da orelha interna, com caráter meramente ilustrativo, dos níveis de expressão dos genes candidatos em relação aos demais genes consagrados associados a audição (BARTA *et al.*, 2018).

Figura 34: Valores de RPKM (vide Tabela 11) plotados em gráficos por gene, com caráter meramente ilustrativo, dos níveis de expressão dos genes candidatos na microglia (OOSTERHOF *et al.*, 2010), fígado (BAUMGART *et al.*, 2016) e nas células da orelha interna (BARTA *et al.*, 2018).

Em conclusão, os dados reanalisados do transcriptoma de *zebrafish* apontam o *Cnrip1a* como melhor candidato por sua alta expressão diferencial nas CCs da OI. No entanto, o gene *Ppp3r1b* também se destaca quanto ao alto nível de expressão em relação aos demais genes pesquisados nas células vizinhas às ciliadas. Contudo, o fato dessa expressão não ser diferencialmente maior do que nas CCs o torna menos atrativo. Como outras células do neuroepitélio não foram pesquisadas nestes estudos, decidiu-se recorrer aos transcriptomas de camundongo (*Mus musculus*).

Tabela 12: Expressão gênica de dados da literatura quantos genes e tecidos estudados.

Expressão gênica								
Gene	Idade de expressão	Órgão					Ref.	
			Cérebro	OI	Olho	Coração		Bexiga natatória
<i>Cnrip1a</i> ENSDARG0000037337	10 hpf	Todo o corpo larval						FIN <i>et al.</i> , 2017
	?	Coração				X		BGEE database
	?	Bexiga natatória					X	BGEE database
	?	Olho			X			BGEE database
	?	Cérebro	X					BGEE database
	24-60 hpf	Telencéfalo	X					FIN <i>et al.</i> , 2017
	24-60 hpf	Comissura anterior e pós-óptica, glândula pineal	X					FIN <i>et al.</i> , 2017
	24-60 hpf	Rombencéfalo	x					FIN <i>et al.</i> , 2017
	24-60 hpf	Medula espinhal						FIN <i>et al.</i> , 2017
	24-60 hpf	Células ganglionares da retina, outros gânglios da cabeça	X					FIN <i>et al.</i> , 2017
	?	Orelha interna		X				BGEE database
	24-60 hpf	Regiões de neurônios pós-mitóticos						FIN <i>et al.</i> , 2017
24-60 hpf	Receptores olfatórios						FIN <i>et al.</i> , 2017	
<i>Cnrip1b</i> ENSDARG0000003737	10 hpf	Todo o corpo larval						FIN <i>et al.</i> , 2017
	?	Coração				X		BGEE database
	?	Bexiga natatória					X	BGEE database
	?	Olho		X				BGEE database
	?	Cérebro	X					BGEE database
		Medula espinhal difusa	X		X			FIN <i>et al.</i> , 2017
	24-48 hpf	Somitos e nadadeiras peitorais	X		X			FIN <i>et al.</i> , 2017
<i>Ppp3r1a</i> ENSDARG0000092659	?	Coração				X		BGEE database
	?	Bexiga natatória					X	BGEE database
	?	Olho		X				BGEE database
	?	Cérebro	X					BGEE database
	72-96 hpf	Epifase e bulbo olfatório	X					HAMMOND; UDVADIA, 2010
<i>Ppp3r1b</i> ENSDARG00000069360	?	Coração				X		BGEE database
	?	Bexiga natatória					X	BGEE database
	?	Olho		X				BGEE database
	72-96 hpf	Cérebro	X					BGEE database
		Fígado						HAMMOND; UDVADIA, 2010
		<i>Optic tectum</i>	X					HAMMOND; UDVADIA, 2010
	72-96 hpf	Bulbo olfatório	X					HAMMOND; UDVADIA, 2010
<i>Plek</i> ENSDARG00000104325	?	Coração				X		BGEE database
	?	Bexiga natatória					X	BGEE database
	?	Olho		X				BGEE database
	?	Cérebro	X					BGEE database

Tabela 12, continuação.

Expressão gênica									
Gene	Idade de expressão	Órgão						Ref.	
			Cérebro	OI	Olho	Coração	Bexiga natatória		
<i>Elavl4</i> ENSDARG00000045639 Marcador pan-neuronal	30-42 hpf	Coração	X						BGEE database
	?	Bexiga natatória	X						BGEE database
	?	Olho	X						BGEE database
	todas	SAG	X	X					SCHWARZER <i>et al.</i> , 2020
	24-60 hpf	Cérebro	X						
<i>Gsdmeb (Dfna5)</i> ENSDARG00000040485	22-24 hpf	Crista neural, plácodio olfatório	X						BUSCH-NENTWICH <i>et al.</i> , 2003
	?	Olho	X						BGEE database
	?	Cérebro	X						BGEE database
	?	Bexiga natatória	X						BGEE database
	30-42 hpf	Coração	X						THISSE; THISSE, 2004
	48-60 hpf	Vesícula ótica	X						BLASIOLE <i>et al.</i> , 2006
	48-90 hpf	Canal semicircular	X						BLASIOLE <i>et al.</i> , 2006
<i>Gsdmea (Dfna5)</i> ENSDARG00000086762	?	Bexiga natatória	X						BGEE database
	?	Cérebro	X						BGEE database
	?	Coração	X						BGEE database
	5-6 dpf	Neuromastos							JIAN <i>et al.</i> , 2014
<i>Eya4</i> ENSDARG00000012397	Adulto > 90 dpf	Coração	X						SCHONBERGER <i>et al.</i> , 2005
	24-96 hpf / Adulto > 60 dpf	Mácula anterior e posterior	X						WANG <i>et al.</i> , 2008
	72-96 hpf / Adulto > 60 dpf	Crista lateral	X						WANG <i>et al.</i> , 2008
	24-96 hpf	Neuromastos							SCHONBERGER <i>et al.</i> , 2005
	14-19 hpf	Plácodio ótico							WANG <i>et al.</i> , 2008
	48-60 hpf / Adulto > 60 dpf	Vesícula ótica	X						WANG <i>et al.</i> , 2008
	24-42 hpf / Adulto > 60 dpf	SAG	SAG						WANG <i>et al.</i> , 2008
?	Bexiga natatória	X						BGEE database	
<i>Gab1</i> ENSDARG000000037018	?	Bexiga natatória	X						BGEE database
	?	Coração	X						BGEE database
	12-48 hpf	Cérebro e vesícula ótica	X	X					YOUSAF <i>et al.</i> , 2018
<i>Mettl13</i>	?	Bexiga natatória	X						BGEE database
	12-48 hpf	Cérebro e vesícula ótica	X	X					YOUSAF <i>et al.</i> , 2018
<i>Slc1a3a</i>	72-96 hpf	Cérebro	X						BREUER <i>et al.</i> , 2019
	72-96 hpf	Célula glial	SNC						GESEMANN <i>et al.</i> , 2010
	5-6 dpf	Linha lateral							THISSE; THISSE, 2004
	5-6 dpf	Célula glial do cerebelo	SNC						GESEMANN <i>et al.</i> , 2010
	19-60 hpf	Vesícula ótica	X						THISSE; THISSE, 2004
	19-60 hpf	Medula espinhal	SNC						THISSE; THISSE, 2004
	Adulto > 90 dpf	Cerebelo	X						RICO <i>et al.</i> , 2010
	Adulto > 90 dpf	Fígado							CHENG <i>et al.</i> , 2006
	Adulto > 90 dpf	Cérebro	X						RICO <i>et al.</i> , 2010
<i>Pou4f1</i>	16 hpf - Adulto > 90 dpf	Cérebro	X						SATO <i>et al.</i> , 2007
	32-72 hpf	Olho	X						SATO <i>et al.</i> , 2007
	52hpf-77hpf	Vesículo Ótica	X						SATO <i>et al.</i> , 2007
	24-72 hpf	Coração	X						MASKELL <i>et al.</i> , 2017

5.3.2.2 Camundongo (*Mus musculus*)

Dos genes candidatos ao locus DFNA58, apenas o *Cnrip1* aparece como gene diferencialmente expresso nos diferentes tipos celulares analisados e no *Cluster 6* do grupo que tem baixa expressão no epitélio sensorial e na ontologia gênica de matrix extracelular num dos primeiros estudos de transcriptoma realizado por HERTZANO *et al.* (2011). De fato, dos genes de PA que caíram no mesmo *cluster* do *Cnrip1* foi o gene *Coch* que codifica a coclina, componente de matriz extracelular altamente abundante na cóclea e no vestíbulo. O gene *Slc1a3* está no *cluster* de baixa expressão no sangue e o *Eya4* de alta expressão no epitélio sensorial com ontologias gênicas variadas para cada um (HERTZANO *et al.*, 2011). Corroborando com os dados de *in situ* e imunofluorescência do artigo publicado por LEZIROVITZ *et al.* (2020), porém o oposto do observado no transcriptoma de *zebrafish*, o *Cnrip1* não apresenta grande expressão nas CCIs ou CCEs, sendo maior nas células suporte do tipo Deiters e Pilares. Embora haja diferenças nos níveis de expressão entre os vários tipos celulares da cóclea, quanto aos genes do DFNA58, nenhum deles chega na significância de uma diferença (*Fold difference*) de 1,6 X ou mais. O mesmo é verdadeiro para os demais genes em estudo, exceto o gene *Slc1a3* que revelou grande expressão nas CCIs, diferencialmente em relação às CCEs (*Fold difference* de 2 X), mas ainda maior nas células Pilar em comparação as células Deiters, *Fold difference* de 5,27 X (LI *et al.*, 2018), (Tabela 13 e Figura 35). Nos diferentes tipos celulares, destacam-se com maior expressão Pilar: *Slc1a3* e em segundo, bem menor *Gab1* e *Ppp3r1*; CCE: níveis semelhantes *Eya4*, *Ppp3r1*, *Gab1* e *Slc1a3*; CCI: *Slc1a3* e em segundo, bem menor *Ppp3r1*.

De fato, o *Cnrip1* volta a se destacar quando são analisados transcriptomas dos neurônios do gânglio espiral (SUN *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020). Foi observado que apenas o gene *Cnrip1* dentre os candidatos apresenta-se diferencialmente expresso entre neurônios tipo I e tipo II. No estudo de SUN *et al.* (2018) sobre os genes que caracterizam os diferentes tipos de neurônios do gânglio espiral, *Cnrip1* aparece diferencialmente expresso (valor 0,237975446738325), sendo mais abundante em neurônios do tipo II assim como verificado em LEZIROVITZ *et al.* (2020), dado semelhante ao gene consagrado de PA *Gsmde/Dfna5* (0,267294349119519) e o gene *Pou4f1* (0,00242505110388543) consagrado como marcador de neurônio sensorial. Interessantemente, ambos os três são mais expressos no tipo II que no I, que correspondem a 5% e 95% dos neurônios do SGN, respectivamente.

Os dados apontados por LI *et al.* (2020) evidenciam que os três genes do DFNA58 são expressos nos neurônios do gânglio espiral, bem como, que os níveis de expressão de *Cnrip1* e *Ppp3r1* são maiores que de *Plek* nestas células, diferenças que caem com a idade. Assim a

diferença é significativa para *Ppp3r1* em relação a *Plek* em P1 (3,5 X) e P30 (2,7X) e para *Cnrip1* em relação a *Plek* em P1 (2,5 X), mais uma vez corroborando os dados de LEZIROVITZ *et al.* (2020) nesse caso em relação aos resultados de hibridização *in situ*. No SGN em P1, de maior expressão há *Elval4*, seguido de *Eya4* e *Ppp3r1*, maior até do que o marcador neuronal *Pou4f1*, em seguida vem *Cnrip1* e *Gab1*. Já em P30, os maiores níveis são apresentados pelos genes *Elval4*, seguido de *Eya4*, *Pou4f1*, *Ppp3r1* e *Cnrip1*. O gene *Slc11a3* que se destaca nas células do epitélio sensorial, aqui apresenta os menores níveis de expressão. O gene *Plek* apresenta expressão semelhante a *Mettl13*.

Em P1, dos genes analisados *Eya4* e *Elval4* são os de maior expressão no SGN. Os níveis de expressão de *Cnrip1* no SGN são semelhantes a *Gab1*, gene que já foi relatado como responsável por ocasionar PA relacionada ao DFNB26, a expressão de ambos os genes é maior que a do *Dfna5*. Os níveis de *Ppp3r1* são superiores ao de *Pou4f1*, um marcador neuronal. Já os níveis de *Plek* embora baixos, são semelhantes aos de *Mettl13*, o DFNM1, modificador da função de *Gab1* e também próximos dos níveis de *Slc1a3*. Em P30, os maiores níveis de expressão também são observados em *Eya4* e *Elval4*, seguido por *Pou4f1*. Os níveis de expressão de *Cnrip1* nos SGN se assemelham aos níveis de *Dfna5* e ficam um pouco abaixo de *Gab1*. Os de *Ppp3r1* são ainda elevados, mas menores que de *Pou4f1*. Os de *Plek* são mais elevados que *Mettl13* e *Slc1a3*.

Com relação a expressão diferencial de cada gene em relação aos tipos celulares pesquisados: o gene *Cnrip1* mantém níveis apreciáveis de expressão em todas as idades no SGN, mas é maior em P1, tanto em relação ao período embrionário quanto ao período antes do início da audição (P8-P14) quanto adulto (P30), diferentemente do que se observou para as CCs, com expressão não detectada em P12 neste estudo. A expressão na Glia em P8 também é apreciável, mas inferior em relação ao SGN. Portanto, o *Cnrip1* é diferencialmente expresso no SGN em P1 em relação a glia *Fold difference* de ~2 X) e CCs, nas demais idades em SGN é diferencialmente expresso em relação à CCs (*Fold difference* de ~9 X). Na verdade, se observou que o nível *Cnrip1* apresenta tendência de diminuição com a idade. Quanto a isso, cabe destaque aos dados não publicados de nosso laboratório que acabaram por não entrar no trabalho LEZIROVITZ *et al.* (2020), mas que corroboram com essa observação de que o nível do gene *Cnrip1* diminui com a idade (Figura 37). Para o gene *Plek*, foi observado que a expressão no gânglio é muito superior à observada na glia ou CCs em P12 (*Fold difference* de ~ 7 X), porém, não há uma tendência clara de alta ou baixa da expressão com a idade, também de acordo com o observado em nosso laboratório (Figura 37). Já o gene *Ppp3r1*, se destaca tanto nas CCs de P12 quanto nas várias idades de SGN e glia, embora diferencialmente maior nos neurônios em

P1 e P8. Quanto a variação de expressão no SGN, há a tendência de diminuição da expressão com a idade (Figura 37).

Após análise dos dados de transcriptoma do camundongo, é possível concluir que os três genes do DFNA58 são expressos nos neurônios do gânglio espiral a níveis semelhantes a outros genes já consagrados como associados a fisiologia auditiva. Contudo, os padrões e níveis de expressão do *Cnrip1* e *Ppp3r1* são mais interessantes quando comparadas ao *Plek* nestas células.

Tabela 13: Valores de RPKM do transcriptoma de LI *et al.* (2018).

Camundongo (P28-P35)						
Ref	LI et al., 2018					
<i>Gene</i>	IHC	OHC	DEG (CCI/CCE)	Deiters	Pilar	DEG (Deiters/ Pilar)
<i>Plek</i>	0,00	0,15±0,06	---	1,32±0,14	1,97±0,13	-0,58
<i>Ppp3r1</i>	17,34±1,55	9,95±0,87	0,80	29,84±2,05	14,63±1,25	1,03
<i>Cnrip1</i>	0,11±0,06	0,23±0,04	-1,06	0,85±0,19	0,61±0,13	0,48
<i>Slc1a3</i>	131,02±1,47	7,67±0,25	2,02	5,53±0,34	213,19±1,22	-5,27
<i>Eya4</i>	7,24±0,13	12,32±0,82	-0,77	5,63±0,44	9,25±0,42	-0,72
<i>Elavl4</i>	0,61±0,07	0,8±0,09	-0,39	1,88±0,1	0,82±0,18	1,20
<i>Gsdme/Dfna5</i>	0,62±0,1	0,27±0,05	1,20	0,65±0,09	0,95±0,15	-0,55
<i>Pou4f1</i>	0,00	0,00	---	0,02±0,03	0,15±0,05	---
<i>Gab1</i>	12,36±0,5	9,18±0,65	0,43	41,04±1,15	28,14±0,90	0,54
<i>Mettl13</i>	0,79±0,02	1,78±0,21	-1,17	2,36±0,28	2,15±0,20	0,13

Figura 35: Valores de RPKM plotados em gráficos por gene. **A)** Tipos celular da orelha interna. **B)** Caracter meramente ilustrativo, dos níveis de expressão dos genes candidatos em relação aos demais genes consagrados associados a audição (LI *et al.*, 2018).

Figura 36: Valores de RPKM plotados em gráficos por **A)** gene e por **B)** tipo celular e idade da cóclea, com caracter meramente ilustrativo, dos níveis de expressão dos genes candidatos nos diferentes tipos celulares e idades da cóclea murina (LI *et al.*, 2020).

Figura 37: Dados não publicados do laboratório mostrando a diferença de expressão dos genes candidatos com a idade.

6. DISCUSSÃO

Desde 2012, LEZIROVITZ e seus colaboradores vêm se empenhando na investigação da participação de três genes candidatos a explicar o quadro de PA autossômica dominante em uma grande família brasileira mapeados no locus DFNA58, uma vez que, o estudo da função dos genes implicados na PA tem contribuindo de forma decisiva no conhecimento de suas fisiopatologias e para o desenvolvimento de estratégias com o objetivo de intervir para restaurá-la. Apesar dos achados recentes sobre a participação dos três genes candidatos a explicar o quadro de PA nos afetados dessa família, *CNRIP1*, *PLEK* e *PPP3R1*, obtidos em camundongos e sangue dos pacientes afetados (LEZIROVITZ *et al.*, 2020), não foi possível concluir qual deles ou se mais de um, incluindo aqueles genes de lncRNA pouco caracterizados, está relacionado na fisiopatologia da PA nesta família. Portanto, tornou-se importante ampliar as investigações desses genes no sistema auditivo, também no modelo animal *zebrafish*. Essa investigação prévia no modelo animal é primordial para delineamento de futuros experimentos funcionais mais elaborados que proporcionem maiores dados em relação a participação desses genes no processo biológico em que atuam ocasionando assim a PA nessa família.

Os genes associados a PA em humanos e murinos apresentam padrões variados de expressão. Há aqueles genes cuja expressão é praticamente exclusiva à OI, em outros casos apresentam expressão abundante em diversos tecidos, mas que apresentam alguma função particular na cóclea ou há redundância de função com outros genes em outros tecidos, mas não para a cóclea. Frequentemente, publicações dos estudos de PA genética relatam que esses genes são muito expressos no cérebro, visto que as CCs compartilham características com os

neurônios e há também os neurônios que inervam as CCs, cujos corpos celulares foram o gânglio espiral (SG). No espécime *zebrafish*, ocorre algo semelhante onde as CC sensoriais presentes em seus órgãos auditivos compõem o neuroepitélio.

No presente estudo tivemos o objetivo de conhecer o padrão de expressão dos genes candidatos ao locus DFNA58 em diferentes modelos animais, *zebrafish* e camundongo, bem como em diferentes idades por meio de diferentes técnicas de estudo do RNAm (hibridização *in situ*, RT-qPCR e reuso e análise dos dados de expressão gênica disponíveis na literatura (transcriptomas) e proteína (imunofluorescência). A hibridização *in situ* em *zebrafish* é um método muito utilizado nos estudos de genes candidatos a PA, pois a transparência dos espécimes, bem como a fácil visualização da VO no estágio 5 dpf fornecem respostas rápidas às perguntas referentes ao gene candidato ser expresso no tecido alvo, a OI, e se a expressão é mais relevante na OI em relação aos demais tecidos. Essa aplicação da hibridização *in situ* é muito bem exemplificada no estudo de SALAZAR-SILVA *et al.* (2021) no qual o gene candidato *Ncoa3* mostrou grande expressão praticamente restrita à orelha interna. No entanto, devido a expressão mais ampla dos genes candidatos deste estudo, outras técnicas foram empregadas no sentido de corroborarem uma à outra e fornecerem novas perspectivas sobre o padrão de expressão nos tecidos-alvo. Na tabela 13 temos um sumário dos achados de cada gene frente aos diferentes modelos animais, idades e abordagens. Mesmo utilizando técnicas diferentes e com pontos de vista distintos do mesmo órgão ou sistema, foi possível congregarmos os dados a fim de obter uma hierarquia dentre os genes candidatos, enfatizando aquele que mais se destaca a desempenhar papel relevante na audição.

6.1 Hibridização *in situ* evidenciou *Cnrip1a* seguindo de *Ppp3r1a* com papel sugestivo na audição, ambos com padrão neuronal na imunofluorescência

A hibridização *in situ* evidenciou a diversidade de órgãos em que os genes *Cnrip1a/Cnrip1b* são expressos, em acordo ao que foi observado por FIN *et al.* (2017). De fato, FIN *et al.* (2017) descreve a expressão no cérebro, coração e bexiga natatória entre 1 a 3 dpf e neste estudo foi demonstrado que também ocorre na idade adulta, embora não tão expressiva quanto comparado ao neuroepitélio sensorial da OI como um todo. Conforme demonstrado na tabela 13, a análise geral do perfil de expressão de RNAm, obtidos pelas técnicas de hibridização *in situ* do gene *Cnrip1b* apresentou menor expressão na VO e OI do *zebrafish* em relação ao *Cnrip1a*, que apresentou expressão destacada na região de todos os neuroepitélios em 30 d.

Os dados de imunofluorescência em espécimes larvais de *zebrafish* evidenciaram a presença das proteínas dos genes *Cnrip1a/Cnrip1b* na rede neuronal presente em toda extensão do corpo e cabeça, assim como na inervação sensorial periférica, VO, dos olhos e nos neuromastos. Portanto, os dados do presente estudo estão de acordo com o observado por OLTRABELLA *et al.* (2017) que relata a conservação da expressão do gene *Cnrip1* na rede neuronal dentre diferentes espécies de vertebrados e também com o descrito por FIN *et al.* (2017), cuja expressão do *Cnrip1a* foi evidenciada nas regiões de neurônios pós-mitóticos, abrangendo cérebro, neuromastos e possíveis gânglios da região da cabeça por meio de ensaios de hibridização *in situ* a partir de embriões com 10 hpf até 48 hpf. Entre o estágio de desenvolvimento de 24-48 hpf, houve uma divergência quanto a expressão do *Cnrip1b* se comparada a observada para *Cnrip1a*. *Cnrip1b* é expresso no cérebro, olhos e medula espinhal, contudo, devido ao padrão de expressão ubíquo, não foi possível fazer uma análise mais precisa. Logo, os autores concluíram que ambos os genes possuem uma diferenciação quanto as suas expressões, sugerindo que poderiam ter uma função distinta.

Seguindo a linha de raciocínio da análise da árvore genética para o gene *Cnrip1* no qual, *Cnrip1b* apresenta os genes *Ppp3r1a*, *Pno1*, *Wdr92 downstream* e *Plek upstream*, portanto, mais semelhante ao que se observou para a duplicação que co-segrega com PA na família DFNA58, priorizou-se a investigação do padrão de expressão do gene *Ppp3r1a* por meio de ensaios de hibridização *in situ* nos estágios de desenvolvimento de 5 e 30 dpf. Em virtude da necessidade de adequação no protocolo da técnica visto que esses ensaios são muito trabalhosos, sensíveis em muitos aspectos e requerem a obtenção de grandes quantidades de

espécimes fixados para sua execução, nesse trabalho não foram realizados ensaios dessa técnica para o gene *Ppp3r1b*. Todavia, experimentos futuros serão feitos.

A expressão do gene *Ppp3r1a* demonstrou predominância nas regiões cerebrais nos ensaios de *in situ* nos estágios de desenvolvimento analisados e na bexiga natatória, pâncreas, fígado e intestino. Na VO, sua expressão ficou mais evidente nos canais semicirculares e ao redor dos otólitos associados a mácula sensorial anterior utricular (equilíbrio) e posterior sacular (audição). Dados semelhantes foram observados por HAMMOND; UDVADIA, (2010), que também evidenciou por hibridização *in situ* no sistema nervoso central (SNC) em larvas de 24-72 hpf os genes que codificam cada uma das subunidades da calcineurina, as catalíticas: *Ppp3ca*, *Ppp3cb* e *Ppp3cc*, e regulatórias codificadas pelos genes *Ppp3r1* e *Ppp3r2*.

Os dados de imunofluorescência mostram presença das proteínas dos genes *Ppp3r1a/Ppp3r1b* também na rede neuronal presente em toda extensão do corpo e cabeça, na inervação sensorial periférica e também na inervação da VO nos espécimes larvais.

Conforme apontado pelos dados da tabela 13, o *Plek* se mostrou o menos candidato dos três a desempenhar papel relevante na audição. Sua expressão observada por meio de hibridização *in situ* se mostrou mais evidente nas larvas com 5 dpf em suma maioria no cérebro e a VO, foi observada nos canais semicirculares e ao redor da mácula posterior sacular. O mesmo não foi observado nessas regiões nos espécimes com 30 dpf onde apenas ficou evidente a forte expressão na bexiga natatória e intestino. Acreditamos que não foi possível visualizar a expressão desse gene nas estruturas de interesse (OI e cérebro) muito provavelmente por se tratar de uma baixa expressão nesse estágio.

6.2 Análise de RT-qPCR e transcriptoma corrobora o *Cnrip1a* como candidato mais significativo a desempenhar papel na audição

Conforme demonstrado na tabela 13, a análise geral do perfil de expressão de RNAm por meio de RT-qPCR e transcriptoma está de acordo com a hibridização *in situ* no qual apontam que o gene *Cnrip1b*, não apresenta expressão significativa na orelha interna. Já em relação ao gene *Cnrip1a*, observam-se resultados promissores demonstrando que as CCs apresentam expressão diferencial em relação às suas vizinhas. Em contrapartida, o *Cnrip1* nos camundongos realmente se destaca no que diz respeito a expressão nos neurônios do gânglio espiral, onde é diferencialmente expresso entre os dois tipos de neurônios (maior no tipo II), corroborando com todos os achados publicados em LEZIROVITZ *et al.* (2020). Vale ressaltar que dados não publicados de nosso laboratório corroboram com os dados de transcriptoma nos

quais se observa uma diminuição do nível de expressão nos neurônios do gânglio espiral (SGN) da idade P1 (neonatos) para a idade P30 (adultos). Esse fato favorece a hipótese formulada inicialmente de que a superexpressão de um gene ocasionada pela duplicação, principalmente na idade adulta onde essa expressão não deveria ser tão alta, estaria causando a PA na família DFNA58. Logo, *Cnrip1a* (zebrafish) e seu ortólogo no camundongo (*Cnrip1*) se destacaram demonstrando indicativos de participação na fisiologia auditiva.

Assim como o observado para o gene *Cnrip1*, a análise da expressão por RT-qPCR nos adultos evidenciou *Ppp3r1a* e *Ppp3r1b* no cérebro, em acordo com o visto no estágio de 30 dpf por *in situ*, seguido em nível de expressão pelo neuroepitélio sensorial da lagena e utrículo em relação aos demais órgãos observados. Níveis de expressão significativos quanto a OI como um todo também foram observados onde a diferença de expressão de ambos os genes é pequena. Vale salientar que a expressão estatisticamente diferente foi obtida quanto ao neuroepitélio em relação a todos os tecidos analisados, no qual, o *Ppp3r1a* evidenciou maior relevância do que *Ppp3r1b* quanto às especializações celulares/teciduais cruciais à fisiologia auditiva. Nos dados de transcriptoma (diferença entre $\log_2$) também verificamos a expressão de ambos os genes tanto nas CCs quanto em suas vizinhas e mesmo na microglia, não houve diferença significativa.

Quanto as células da cóclea de camundongos adultos, a expressão de *Ppp3r1* em diferentes níveis, embora não significativo, foi evidenciada em CCIs, CCEs, Deiters e Pilares, mostrando maior expressão nas células Deiters. Dentre os genes estudados, mostrou a segunda maior expressão nas CCEs. Esses dados corroboram com os publicados por LEZIROVITZ *et al.* (2020), onde foi relatada a expressão do gene *Ppp3r1* nas células pilares na idade de P7 e nos fibrócitos do ligamento espiral em P21 e P35. Além das CCs, também apresenta níveis de expressão no SGN e glia, embora diferencialmente maior nos neurônios em P1 e P8, mostrando uma expressão mais generalizada do que *Cnrip1* quanto aos tipos celulares da audição.

Assim como o gene *Cnrip1*, o *Ppp3r1* possui uma alta expressão no cérebro de diferentes espécies de eucariotos no qual a proteína codificada por ele também desempenha um papel importante e diversificado em muitas vias biológicas, incluindo a regulação da atividade sináptica e excitabilidade neuronal (REESE; TAGLIALATELA, 2011). Portanto, os dados obtidos nesse trabalho corroboram com a alta gama de órgãos e vias biológicas em que o gene *Ppp3r1* já foi associado na literatura até o presente momento. Logo, os dados aqui obtidos sugerem que os genes de *Ppp3r1a* e *Ppp3r1b* do zebrafish assim como o *Ppp3r1* em camundongo podem ter papel na fisiologia auditiva.

Os dados de RT-qPCR do gene *Plek* de amostras da OI e de dois epitélios neurosensoriais juntos (lagena+utrículo) de adultos mostraram destaque na expressão do *Plek* no epitélio neurosensorial em relação aos demais órgãos observados, porém, diferença menos expressiva se comparada aos outros genes candidatos. Quanto aos dados de transcriptoma, foi possível constatar que diferentemente dos dois outros genes (*Cnrip1* e *Ppp3r1*), o gene *Plek* mostrou maior expressão na microglia do que nas células da OI (CCs e suas vizinhas).

Quanto aos dados de transcriptoma das células da cóclea de camundongos, assim como o observado para o *zebrafish* onde a expressão desse gene não estava tão presente nas CCs, foi possível observar que o gene *Plek* se destacou quanto sua expressão no gânglio sendo está muito superior à observada na glia ou CCs em P12, porém, não há clara tendência de alta ou baixa da expressão com a idade. Esses dados corroboram com os publicados por LEZIROVITZ *et al.* (2020), onde foi relatada a expressão do gene *Plek* nos neurônios do gânglio espiral e no órgão de Corti e também foram observadas marcações nos fibrócitos do limbo espiral nas idades P21 e P35.

6.3 Potenciais papeis de *Cnrip1* e *Ppp3r1* na audição

A duplicação gênica em grande escala como ocorreu especialmente entre peixes teleósteos (TAYLOR *et al.*, 2003), viabiliza que na maioria dos casos, um dos pares duplicados degenera enquanto o outro retém sua função original, podendo ocorrer também um novo ganho de função no par duplicado, ou mesmo os genes duplicados também podem “dividir a função” após o evento de duplicação de modo que ambos os genes são necessários para complementar a função integral do gene ancestral (FORCE *et al.*, 1999, PRINCE; PICKETT, 2002). Pelos padrões de expressão observados para *Cnrip1a* e *Cnrip1b* parece mais provável que cada um esteja exercendo funções distintas, ao menos em alguns tecidos como a OI, semelhante ao descrito para os genes *Myo6a* e *Myo6b* (SEILER *et al.*, 2004).

O *International Mouse Phenotyping Consortium*, cujo objetivo é gerar camundongos *knockout* para todos os genes, atualizou recentemente os dados fenotípicos quanto ao camundongo *knockout* para o gene *Cnrip1* (<https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:1917505/#order>). Eles realizaram a avaliação da audição nos camundongos por meio de ABR (do inglês, *auditory brainstem response*; em português, reposta auditiva do tronco cerebral auditivo) ao redor de 14 semanas de vida e não observaram diferenças significativas quando comparado aos selvagens, bem como nenhuma outra alteração fenotípica. Isso está de acordo com o estudo realizado por FIN *et al.* (2017), que também não observou alterações fenotípicas (quanto aos olhos, cérebro, medula

espinhal, músculos, notocorda, nadadeiras, pigmentação, bexiga natatória, mandíbula, intestino e na forma e tamanho dos espécimes) nos *zebrafish* duplo *knockout* para *Cnrip1a* e *Cnrip1b*, embora a audição no peixe não tenha sido avaliada. Assim, ainda resta determinar se haveria prejuízo da audição e em que idade no caso de superexpressão do gene *Cnrip1* na cóclea. No entanto, não há publicações sobre isso até o momento.

Em relação ao papel do gene *Ppp3r1* na PA, diversas evidências *in vitro* e *in vivo* mostraram que o excesso de cálcio pode causar a morte celular por uma série de vias que incluem a calcineurina (JAYARAMAN; MARKS, 2000; ORRENIUS *et al.*, 2003), o que também foi demonstrado na cóclea. De fato, a superestimulação acústica mostrou envolver imunorreatividade da calcineurina na placa cuticular das CCs auditivas, e essas células marcadas com calcineurina também coraram para o corante iodeto de propídio indicando morte celular. Além disso, a inibição química da calcineurina mostrou diminuir a perda auditiva induzida por ruído (MINAMI *et al.*, 2004). No entanto, assim como se conhece pouco sobre a contribuição desse gene nos processos e vias auditivas de outros espécimes, em relação ao sistema auditivo do *zebrafish*, também há a necessidade de estudos posteriores que auxiliem na melhor compreensão de sua expressão e identificação funcional nas vias biológicas da audição.

Quanto a possível papel do gene *Plek* nas vias auditivas, podemos destacar os estudos realizados por CMARIK *et al.* (2000), que relataram a sua superexpressão em células primárias ou transformadas que pode levar a alteração na pseudopodia do tipo lamelipódios mediada pela organização do citoesqueleto de actina. Os lamelipódios se assemelham aos estereocílios CCs, seu produto interage com a radixina que já foi associada à PA em humanos e camundongos (KITAJIRI *et al.*, 2004). Contudo, até o presente momento, apenas nos estudos de LEZIROVITZ *et al.* (2020) o gene *PLEK* foi diretamente associado ao possível envolvimento na atuação dos processos e vias auditivas por meio de estudos realizados em camundongos e sangue dos pacientes afetados da família DFNA58.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Nas diversas abordagens descritas na literatura utilizadas com esses modelos animais para elucidação do papel de genes candidatos a PA não síndrômica, já se conhecia qual gene estava com sua função prejudicada devido a mutação. No entanto, isso difere da realidade encontrada para a família DFNA58 onde ainda estamos investigando qual ou quais genes podem estar associados com a PA, dificultando ainda mais a escolha da melhor estratégia a ser implementada. Ainda assim, conseguimos obter dados interessantes.

No presente estudo, foi demonstrada a presença de expressão dos genes *Cnrip1*, *Ppp3r1* e *Plek* tanto na VO de espécimes larvais, na OI dos espécimes juvenis de maneira geral, quanto em epitélios sensoriais específicos da audição e equilíbrio. Esses dados evidenciam e corroboram com a hipótese de que ao menos algum desses genes deve ter um papel na fisiologia do sistema auditivo e, conseqüentemente, na perda auditiva apresentada pela família que deu origem aos estudos.

Nossa equipe vem empenhando um grande esforço para elucidar a fisiopatologia associada o quadro de PA nos pacientes afetados dessa família tanto em modelos animais (camundongo e *zebrafish*) quanto em linhagens celulares dos pacientes afetados e não afetados da família DFNA58. Portanto, o fato de que os achados recentes de LEZIROVITZ *et al.* (2020) demonstrarem que não apenas a superexpressão de gene codificador de proteína decorrente da duplicação, mas também lncRNAs podem estar ocasionando a PA na família estudada, abre um leque ainda maior de abordagens indiretas a serem pensadas para confirmar a função desses genes e o real cenário fisiopatológico da PA nessa família. Partindo do pressuposto que os dados basais aqui obtidos com *zebrafish* fornecem uma maior compreensão de como ocorre a atuação desses genes em diferentes órgãos, em três fases de desenvolvimento distintas (Larval: 5 dpf; Juvenil: 30 dpf e Adulto: > 1 ano), técnicas tais como CRISPR/Cas9, indução de superexpressão transitória por intermédio de microinjeção e conseqüentemente, a análise comportamental do impacto da aplicação dessas técnicas no organismo dos espécime, devem ficar mais factíveis de serem implementadas mediante a colaborações futuras com outros pesquisadores.

8. CONCLUSÃO

Com o objetivo de caracterizar o padrão de expressão dos ortólogos dos genes *Cnrip1*, *Ppp3r1* e *Plek* nos órgãos sensoriais dos espécimes larvais e juvenis de *zebrafish* para obtenção de dados basais para futuros ensaios mais avançados de biologia molecular onde se pretende a curto e médio prazo a realização de ensaios personalizados que permitam fechar o quadro fisiopatológico da PA nos pacientes afetados da família DFNA58, os principais achados desse estudo foram:

Os dados de hibridização *in situ* em animal inteiro demonstraram que o gene *Cnrip1* e seu ortólogo em *zebrafish* *Cnrip1a* se destacam de maneira relevante pelo perfil de expressão observado para a fisiologia auditiva. Assim como o *Cnrip1a*, os ortólogos de *Ppp3r1* apresentam alta expressão no cérebro e na rede neuronal e o gene *Plek* observou-se marcação

somente na VO de espécimes de 5 dpf o que nos leva a hipotetizar que não há uma grande participação desse gene na fisiologia auditiva.

Em relação aos dados de RT-qPCR, pudemos confirmar que de fato o ortólogo do gene *Cnrip1a* no *zebrafish* apresentou perfis mais restritos especificamente nas CCs, corroborando com o perfil de expressão obtido com a hibridização *in situ* em 30 dpf. Resultados semelhantes foram observados para o gene *Ppp3r1*, no entanto, diferentemente do gene *Cnrip1a* que se demonstrou mais expresso nos epitélios sensoriais da lagena+utrículo, o *Ppp3r1* se demonstrou expresso em uma variedade maior de tecidos sugerindo algum papel na audição, porém possivelmente semelhante a outros tecidos com componente neural importante, mas não relacionados a especializações celulares próprias da fisiologia auditiva. Por fim, o gene *Plek* que não apresentou níveis de expressão significativos nos epitélios sensoriais individuais e/ou da OI não sugerindo padrão importante a audição.

Os dados de imunofluorescência tanto das proteínas codificadas pelos genes *Cnrip1* quanto *Ppp3r1* evidenciaram a expressão protéica nos neuromastos que contém células ciliadas, quanto na rede sensorial periférica e neuronal, corroborando com os dados de hibridização *in situ* e RT-qPCR. Todavia, ainda são necessários mais estudos futuros no que diz relação a expressão protéica do gene *Ppp3r1* visando comparar se há de fato semelhança com o obtido para o gene *Cnrip1*.

Por fim, os dados de transcriptoma do *zebrafish* evidenciaram que o gene *Cnrip1a* se destaca quanto sua expressão nas CCs, o *Ppp3r1* apesar de também estar expresso nos epitélios sensoriais da OI, se expressou principalmente na rede neuronal acompanhado pelo gene *Plek*. Os achados tanto de camundongos, onde a expressão desses genes se apresentou mais intimamente presente nos neurônios do gânglio espiral, quanto para *zebrafish*, os genes *Cnrip1a* e *Cnrip1* respectivamente, sugerem que o gene apresenta função relevante pelos níveis de expressão em células importantes a audição. No entanto, essa função no peixe é exercida nas CCs e em mamíferos nos neurônios do gânglio espiral, podendo ou não ser distinta. Em virtude da dificuldade em localizar anatomicamente o gânglio stato-acústico do *zebrafish* para a dissecação e extração de RNA, não é possível dizer com precisão que o gene *Cnrip1a* não exerça também uma função importante nestas células, porém, sua importância na audição parece ter se mantido conservada.

Concluindo, os dados deste estudo estão de acordo com o observado em LEZIROVITZ *et al.* (2020) que apontaram o gene *CNRIP1* como melhor candidato, dentre os três codificadores de proteína envolvidos na duplicação, seguido de *PPP3R1* e *PLEK*.

9. REFERÊNCIAS

- ABLAIN, J. et al. A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish. **Developmental cell**, Maryland Heights, v. 32, n. 6, p. 756-764, 2015.
- ABBAS, L; WHITFIELD, T. T. The zebrafish inner ear. In Fish Physiology. **Academic Press**, Cambridge, v. 29, p. 123-171, 2010.
- ABRAMS, C. S. et al. Protein Kinase C Regulates Pleckstrin by Phosphorylation of Sites Adjacent to the N-terminal Pleckstrin Homology Domain. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 270, p. 40, 1995.
- AFRIKANNOVA T; SERRUYS, A. S; BUENAFE, O. E, et al. Validation of the zebrafish pentylenetetrazol seizure model: locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 1, p. e54166, 2013.
- ALBUQUERQUE A. A. S. Estudo comparativo da estrutura da orelha interna de ratos e cobaias através da microscopia eletrônica de varredura [monografia]. Jaboticabal (SP): Universidade de São Paulo, 2006.
- ASAI, A. et al. High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 274, p. 34450-34458, 1999.
- BARTA, C. L, 2016. Transcriptome Characterization of Adult Zebrafish Inner Ear Hair Cells. A THESIS Submitted to the faculty of the Graduate School of the Creighton University in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science in the Department of Biomedical Sciences. **Omaha**, NE, February 16, 2016.
- BARTA, C. L. et al. RNA-seq transcriptomic analysis of adult zebrafish inner ear hair cells. **Scientific data**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2018.
- BANG, P. I., SEWELL, W. F., & MALICKI, J. J. Morphology and cell type heterogeneities of the inner ear epithelia in adult and juvenile zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Comparative Neurology**, Boston, v. 438, n. 2, p. 173-190, 2001.
- BARRETT, T. et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v. 41, n. D1, p. D991–D995, 2013.
- BAXENDALE, S; WHITFIELD, T. T. Methods to study the development, anatomy, and function of the zebrafish inner ear across the life course. In **Methods in cell biology**, San Diego, v. 134, p. 165-209, 2016.
- BEVER, M. M; FEKETE, D. M. Atlas of the developing inner ear in zebrafish. **Developmental dynamics**, Hoboken, v. 223, n. 4, p. 536-543, 2002.

BLAST- BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL. Disponível em: < <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> >. Acesso em: 26 Abr. 2019.

BLUME, L. C. et al. Cannabinoid receptor interacting protein (CRIP1a) attenuates CB1R signaling in neuronal cells. **Cell Signal**. Danvers, v. 27, n. 3, p. 716-26, 2015.

BITNER-GLINDZICZ, M. Hereditary deafness and phenotyping in humans. **British medical bulletin**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 73-94, 2002.

BODMER, D. Protection, regeneration and replacement of hair cells in the cochlea: implications for the future treatment of sensorineural hearing loss. **Swiss Medical Weekly**, Handewitt, v. 138, p. 4748, 2008.

BAUMGART M. et al. Longitudinal RNA-Seq analysis of vertebrate aging identifies mitochondrial complex I as a small-molecule-sensitive modifier of lifespan. **Cell Syst**, v. 2, p. 122–132, 2016.

BROWN, S. D; HARDISTY-HUGHES, R. E; MBURU, P. (2008). Silencioso como um rato: dissecando a base molecular e genética da audição. **Nature Reviews Genetics**, New York, v. 9, n. 4, p. 277-290, 2008.

BURNS, J. C. et al. Single-cell RNA-Seq resolves cellular complexity in sensory organs from the neonatal inner ear. **Nat. Commun**, New York, v. 6, p. 8557, 2015.

CAI, T. et al. Characterization of the transcriptome of nascent hair cells and identification of direct targets of the Atoh1 transcription factor. **J. Neurosci**. Hoboken, v. 35, p. 5870–5883, 2015.

CRABTREE, G. R; OLSON, E. N. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. **Cell**, Maryland Heights, v. 109, n. 2, p. S67-S79, 2002.

CACCIATORE, F. et al. Quality of life determinants and hearing function in an elderly population: Osservatorio Geriatrico Campano Study Group. **Gerontology**, Switzerland, v. 45, p. 323-8, 1999.

CASTRO, A. P. B. M. Calcineurin inhibitors in the treatment of allergic dermatitis. **Jornal de pediatria**, Amsterdam, v. 82, n. 5, p. S166-S172, 2006.

CARTWRIGHT, S; KARAKESISOGLOU, I. Nesprins in health and disease. In Seminars in cell & developmental biology. **Academic Press**, Cambridge, v. 29, p. 169-179, 2014.

CMARIK et al. cDNAcloning and mapping of mouse pleckstrin (Plek), a gene upregulated in transformation-resistant cells. **Genomics**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 204-212, 2000.

CANTRELL, D. T. Cell antigen receptor signal transduction pathways. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 14, n. 1, p. 259-274, 1996.

CHOUDHARI, J. K. et al. Investigation of MicroRNA and transcription factor mediated regulatory network for silicosis using systems biology approach. **Scientific reports**, New York, v. 11, n. 1, p. 1265, 2021.

COFFIN, A. et al. Evolution of sensory hair cells. In: Evolution of the Vertebrate Auditory System. **Springer**, New York, p. 55–94, 2004.

COFFIN, A. et al. Chemical screening for hair cell loss and protection in the zebrafish lateral line. **Zebrafish**, New York, v. 7, n. 1, p. 3-11, 2010.

CURTY, R. G. et al. Attitudes and norms affecting scientists' data reuse. **PloS one**, São Francisco, p. 12, n. 12, p. e0189288, 2017.

DAVIS, H. & SILVERMAN, R.S. **Hearing and deafness**. 3^a ed. New York, p. 253-279, 1970.

DOS SANTOS SILVA, D. et al. Transcriptome profiling of muscle in Nelore cattle phenotypically divergent for the ribeye muscle area. **Genomics**, New York, v.112, n. 2, p. 1257-1263, 2020.

DOYLE, D. A. et al. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. **Cell**, Maryland Heights, v. 85, n. 7, p. 1067-1076, 1996.

DROR, A. A., & AVRAHAM, K. B. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. **Annual review of genetics**, Palo Alto, v. 43, p. 411-437, 2009.

DENG, M. et al. Comparative expression analysis of POU4F1, POU4F2 and ISL1 in developing mouse cochleovestibular ganglion neurons. **Gene Expr Patterns.**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 31-7, 2014.

EGERTOVA, M. & ELPHICK, M. R. Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. **J Comp Neurol**. Medford, v. 422, p. 159–171, 2000.

EINARSSON, R. et al. Patch clamp recordings in inner ear hair cells isolated from zebrafish. Journal of visualized experiments: **JoVE**, Cambridge, v. 68, 2012.

ELPHICK, M.R. The evolution and comparative neurobiology of endocannabinoid signaling. *Transações filosóficas Royal Society*, Londres. Série B. v. 367, p. 3201-3215, 2012.

ELKON, R. et al. RFX transcription factors are essential for hearing in mice. **Nature communications**, New York, 6, n. 1, p. 1-14, 2015.

ENSEMBLE GENOME BROWSER 96 DATABASE. Banco de dados. Disponível em: <<https://www.ensembl.org/index.html>>. Acesso em: 20 Mai. 2019.

ERICKSON, T; NICOLSON, T. Identification of sensory hair-cell transcripts by thiouracil-tagging in zebrafish. **BMC genomics**, New York, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2015.

FIN, L. et al. The Cannabinoid Receptor Interacting Proteins 1 of zebrafish are not required for morphological development, viability or fertility. **Scientific reports**, New York, v. 7, n. 1, p. 4858, 2017.

FLINN, L. et al. Zebrafish as a new animal model for movement disorders. **Journal of neurochemistry**, New York, v. 106, n. 5, p. 1991-1997, 2008.

FORCE, A. et al. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. **Genetics**, New York, v. 151, n. 4, p. 1531-1545, 1999.

FUJITA, M. et al. Calcineurin B1 Deficiency in Glial Cells Induces Mucosal Degeneration and Inflammation in Mouse Small Intestine. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Shibuya-ku, v. 41, n. 5, p. 786-796, 2018.

GALVAN, A. et al. Gene expression signature of non-involved lung tissue associated with survival in lung adenocarcinoma patients. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 34, p. 2767-2773, 2013.

GARCÍA-SÁINZ, J. A; VÁZQUEZ-PRADO, J; DEL CARMEN MEDINA, L. α 1-Adrenoceptors: function and phosphorylation. **European journal of pharmacology**, Amsterdam, v. 389, n. 1, p. 1-12, 2000.

GAWLIŃSKA, K. et al. Cocaine Administration and Its Abstinence Conditions Modulate Neuroglia. **Int J Mol Sci.**, Basel, v. 21, n. 21, p. 7970, 2020.

GENECARDS HUMAN GENE DATABASE. Banco de dados. Disponível em: < <http://www.genecards.org/> >. Acesso em: 10 Abr. 2019.

GODINHO R, KEOGH I, EAVEY R. Perda Auditiva Genética. **Rev Bras Otorrinolaringol**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 100-4, 2003.

GOU, Y. et al. Sox2 and Sox3 Play unique roles in development of hair cells and neurons in the zebrafish inner ear. **Developmental biology**, Amsterdam, v. 435, n. 1, p. 73-83, 2018.

GUGGENHUBER, S. et al. Impaired 2-AG signaling in hippocampal glutamatergic neurons: aggravation of anxiety-like behavior and unaltered seizure susceptibility. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, Oxford, v. 19, n. 2, p. pyv091, 2016.

GHYSEN, A; DAMBLY-CHAUDIÈRE, C. Development of the zebrafish lateral line. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 14, n. 1, p. 67–73, 2004.

GRAEF, I. A. et al. Signals transduced by Ca²⁺/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. **Cell**, New York, v. 105, n. 7, p. 863-875, 2001.

GYÖRGY, B. et al. Gene transfer with AAV9-PHP. B rescues hearing in a mouse model of Usher syndrome 3A and transduces hair cells in a non-human primate. **Molecular Therapy-Methods & Clinical Development**, Amsterdam, v. 13, p. 1-13, 2019.

GRUNDT, A; ROTTBAUER, W. Mutagenesis Approaches in the Zebrafish. In: Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine. **Springer**, Berlin, Heidelberg.

GROFF, J. A; LIBERMAN, M. C. Modulation of cochlear afferent response by the lateral olivocochlear system: activation via electrical stimulation of the inferior colliculus. **J Neurophysiol**. Rockville, v. 90, n. 5, p. 3178-200, 2003.

HAMMOND, D. R; UDVADIA, A. J. Cabin1 expression suggests roles in neuronal development. **Developmental Dynamics**, Hoboken, v. 239, n. 9, p. 2443-2451, 2010.

HADDON, C; LEWIS, J. Early ear development in the embryo of the zebrafish, *Danio rerio*. **Journal of Comparative Neurology**, Boston, v. 365, n. 1, p. 113-128, 1996.

HARRIS, J. A. et al. Neomycin-induced hair cell death and rapid regeneration in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, Brentwood, v. 4, n. 2, p. 219-234, 2003.

HAWKINS, A. D., & POPPER, A. N. Effects of Man-Made Sound on Fishes. **In Effects of Anthropogenic Noise on Animals**, New York, p. 145-177, 2018.

HAEHNEL-TAGUCHI et al. Projections of the diencephalospinal dopaminergic system to peripheral sense organs in larval zebrafish (*Danio rerio*). **Frontiers in neuroanatomy**, Lausanne, v.12, n. 20, 2018.

HERTZANO, R. et al. Cell type-specific transcriptome analysis reveals a major role for *Zeb1* and *miR-200b* in mouse inner ear morphogenesis. **PLoS Genet.**, São Francisco, v. 7, p. e1002309- e1002323, 2011.

HILGERT, N; SMITH, RJ; CAMP, GV. Função e padrão de expressão de genes de surdez não síndrômica. **Current molecular medicine**, Sharjah, v. 9, n. 5, p. 546-564, 2009.

HOAGLAND, H. Electrical responses from the lateral-line nerves of catfish. I. **J. Gen Physiol.** New York, v. 16, p. 695–714, 1933.

HOFFMAN, H. J. et al. Declining Prevalence of Hearing Loss in US Adults Aged 20 to 69 Years (link is external). **JAMA Otolaryngology – Head & Neck Surgery** 2016.

HOGAN, P. G. et al. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. **Genes & development**, USA, v. 17, n. 18, p. 2205-2232, 2003.

HORN, H. F. et al. (2013). The LINC complex is essential for hearing. **The Journal of clinical investigation**, Michigan, v. 123, n. 2, 2013.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, New York, P. 496-498, 2013.

HUANG, Q. et al. Screening of exon methylation biomarkers for colorectal cancer via LC-MS/MS strategy. **Journal of mass spectrometry**, Hoboken, v. 52, n. 12, p. 860-866, 2017.

HU, S. et al. Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina. **J Comp Neurol.** Medford, v. 518, n. 18, p. 3848-66, 2010.

IZANT, J. G; WEINTRAUB, H. Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. **Cell**, Maryland Heights, v. 36, n. 4, p. 1007-1015, 1984.

IVANCHENKO, M. V. Preclinical testing of AAV9-PHP. B for transgene expression in the non-human primate cochlea. **Hearing research**, Amsterdam, v. 394, p. 107930, 2020.

JAYARAMAN, T; MARKS, A. R. Calcineurin is downstream of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the apoptotic and cell growth pathways. **J. Biol. Chem.**, Rockville, v. 275, p. 6417-6420, 2000.

JERO, D. E; COLING, A. K; LALWANI, J. The use of Preyer's reflex in evaluation of hearing in mice. **Acta oto-laryngologica**, v. 121, n. 5, p. 585-589, 2001.

KARDONG, K. V. Vertebrados—Anatomia Comparada, Função e Evolução. 5ª edição. *Editora Roca, São Paulo. 913pp*, 2010.

KEIMPEMA, E. et al. Differential subcellular recruitment of monoacylglycerol lipase generates spatial specificity of 2-arachidonoyl glycerol signaling during axonal pathfinding. **J Neurosci**. New Haven, v. 30, n. 42, p. 13992-4007, 2010.

KENT, W. J. BLAT - The BLAST-like alignment tool. **Genome Res.**, Maryland, v. 12, n. 4, p. 656-64, 2002.

KREITZER, A. C; REGEHR, W. G. (2001). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. **Neuron**, New York, v. 29, n. 3, p. 717-727, 2001.

KINCAID, R. L. The role of calcineurin in immune system responses. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Basel, v. 96, p. 1170-1177, 1995.

KINDT, K. S., & SHEETS, L. Transmission disrupted: modeling auditory synaptopathy in zebrafish. **Frontiers in cell and developmental biology**, Lausana, v. 6, 2018.

KITAJIRI, S. et al. Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia. **The Journal of cell biology**, New York, v. 166, n. 4, p. 559-570, 2004.

KODAMA, Y; SHUMWAY, M; LEINONEN, R. The sequence read archive: explosive growth of sequencing data. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 40, n. D1, p. D54–D56, 2012.

KRONE, P. H., EVANS, T. G., & BLECHINGER, S. R. Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. **Sem. Cell Dev. Biol**, Amsterdam, v. 14, n. 5, p. 267-274, 2003.

KROHS, C. et al. Expression pattern of cochlear microRNAs in the mammalian auditory hindbrain. **Cell Tissue Res.**, New York, v. 383, p. 655-666, 2021.

LANG H. Loss, degeneration, and Preservation of the Spiral Ganglion Neurons and Their Processes. **The Primary Auditory Neurons of the Mammalian Cochlea**, Part of the Springer Handbook of Auditory Research book series (SHAR, volume 52), p. 229-262, 2015.

LEZIROVITZ, K. et al. A novel autosomal dominant deafness locus (DFNA58) maps to 2p12-p21. **Clinical genetics**, Hoboken, v. 75, n. 5, p. 490-493, 2009.

LEZIROVITZ, K. et al. A rare genomic duplication in 2p14 underlies autosomal dominant hearing loss DFNA58. **Human molecular genetics**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 1520-1536, 2020.

LI, Y. et al. Transcriptomes of cochlear inner and outer hair cells from adult mice. **Sci Data.**, v. 5, p. 180199, 2018.

LI, C. et al. Comprehensive transcriptome analysis of cochlear spiral ganglion neurons at multiple ages. **Elife.** v. 9, p. e50491, 2020.

LIBERMAN, L. D; LIBERMAN, M. C. Cochlear Efferent Innervation Is Sparse in Humans and Decreases with Age. **J Neurosci.**, New Haven, v. 39, n. 48, p. 9560-9569, 2019.

LIEM, K. F. et al. **Anatomia funcional dos vertebrados: uma perspectiva evolutiva.** *Trad. EZ2 Translate*, 3, 2012.

LIESCHKE, G. J; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, New York, v. 8, n. 5, p. 353-367, 2007.

LIND, G. E. et al. Identification of an epigenetic biomarker panel with high sensitivity and specificity for colorectal cancer and adenomas. **Molecular cancer**, New York, v. 10, n. 1, p. 85, 2011.

LINDSTRÖM, S. et al. Genomic and transcriptomic association studies identify 16 novel susceptibility loci for venous thromboembolism. **Blood**, Washington, v. 134, n. 19, p. 1645-1657, 2019.

LIU, H. et al. (2014). Characterization of transcriptomes of cochlear inner and outer hair cells. **Journal of Neuroscience**, Washington v. 34, n. 33, p. 11085-11095, 2014.

LOH, C. et al. T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 16, n. 7, p. 3945-3954, 1996.

LUNDMARK, A. et al. Transcriptome analysis reveals mucin 4 to be highly associated with periodontitis and identifies pleckstrin as a link to systemic diseases. **Scientific reports**, New York, v. 5, p. 184-75, 2015.

MA, E. Y; RUBEL; RAIBLE, D. W. Notch signaling regulates the extent of hair cell regeneration in the zebrafish lateral line. **Journal of Neuroscience**, Washington, v. 28, n. 9, p. 2261-2273, 2008.

MASCIA, F. et al. CRIP 1a inhibits endocytosis of G-protein coupled receptors activated by endocannabinoids and glutamate by a common molecular mechanism. **Journal of neurochemistry**, Hoboken, v. 141, n. 4, p. 577-591, 2017.

MANNERS, H. N; ROY; KALITA, J. K. Intrinsic-overlapping co-expression module detection with application to Alzheimer's Disease. **Computational biology and chemistry**, Amsterdam, v. 77, p. 373-389, 2018.

MANSUY, I. M. et al. Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. **Cell**, Maryland Heights, v. 92, n. 1, p. 39-49, 1998.

MAIER, E. C; WHITFIELD, T. T. RA and FGF signalling are required in the zebrafish otic vesicle to pattern and maintain ventral otic identities. **PLoS Genet**, São Francisco, v. 10, n. 12, p. e1004858, 2014.

MAILLEUX, P., PARMENTIER, M. & VANDERHAEGHEN, J. J. Distribution of cannabinoid receptor messenger RNA in the human brain: an *in situ* hybridization histochemistry with oligonucleotides. **Neuroscience letters**, Amsterdam, v. 143, p. 200–204, 1992.

MASTERSON, J et al. A novel variant in SYNE4 confirms its causative role in sensorineural hearing loss. **Balkan medical journal**, Balkan, v. 35, n. 2, p. 196, 2018.

MCDERMOTT, B. M; BAUCOM, J. M; HUDSPETH, A. J. Analysis and functional evaluation of the hair-cell transcriptome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, p. 104, n. 28, p. 11820-11825, 2008.

MINAMI, S. B. at al. Calcineurin activation contributes to noise-induced hearing loss. **J. Neurosci. Res.**, Hoboken, v. 78, p. 383-392, 2004.

MOLKENTIN, J. D. et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. **Cell**, Maryland Heights, v. 93, n. 2, p. 215-228, 1998.

MOLKENTIN, J. D. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. **Cardiovasc Res**, New York, v. 63, p. 467–475, 2004

MONROE, J. D. et al. Hearing sensitivity differs between zebrafish lines used in auditory research. **Hearing research**, Amsterdam, v. 341, p. 220-231, 2016.

MORSLI, H. et al. Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. **Journal of Neuroscience**, USA, v. 18, n. 9, p. 3327-3335, 1998.

MOSER T, BRANDT A, LYSAKOWSKI A. Hair cell ribbon synapses. **Cell Tissue Res**. New York, v. 326, n. 2, p. 347-59, 2006.

MULROW, C. D. et al. Association between hearing impairment and the quality of life of elderly individuals. **J Am Geriatr Soc**, USA, v. 38, p. 45-50, 1990.

NANCE W. E. The genetics of deafness. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, Malden, v. 9, n. 2, p. 109-119, 2003.

NAKAI, J; OHKURA, M; IMOTO, K. A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. **Nature biotechnology**, New York, v. 19, n. 2, p. 137-141, 2001.

NIEHAUS J. L. et al. CB1 cannabinoid receptor activity is modulated by the cannabinoid receptor interacting protein CRIP 1a. **Mol Pharmacol**. Rockville, v. 72, n. 6, p. 1557-66, 2007.

NICOLSON, T. The genetics of hearing and balance in zebrafish. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 39, p. 9-22, 2005.

NICOLSON, T. The genetics of hair-cell function in zebrafish. **Journal of neurogenetics**, v. 31, n. 3, p. 102-112, 2017.

OOSTERHOF, N. et al. Identification of a conserved and acute neurodegeneration-specific microglia transcriptome in the zebrafish. **Glia**, v. 65, p. 138–149, 2017.

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN. DISPONÍVEL em: < <http://omim.org/>>. Acesso em: Abril/2019.

ORRENIUS, S; ZHIVOTOVSKY, B; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptotic link. **Nat. Rev. Cell. Biol.**, New York, v. 4, p. 552-565, 2003.

OSTER, B. et al. Identification and validation of highly frequent CpG island hypermethylation in colorectal adenomas and carcinomas. **International journal of cancer**, Hoboken, v. 129, n. 12, p. 2855-2866, 2011.

OLTRABELLA, F. et al. Role of the endocannabinoid system in vertebrates: Emphasis on the zebrafish model. **Development, growth & differentiation**, v. 59, n. 4, p. 194-210, 2017.

PAIVA et al. Envelhecimento e deficiência auditiva referida: um estudo de base populacional. **Cadernos de saúde Pública** 2011, v. 27, p. 1292-1300.

PASQUIER J, et al. Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: the PhyloFish database. **BMC Genomics**. New York, v. 18, n. 17, p. 368, 2016.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PERL, K; SHAMIR, R; AVRAHAM, K. B. Computational analysis of mRNA expression profiling in the inner ear reveals candidate transcription factors associated with proliferation, differentiation, and deafness. **Human genomics**, Maryland, v. 12, n. 1, p. 30, 2018.

PETERSON, D. et al. Variants in PPP3R1 and MAPT are associated with more rapid functional decline in Alzheimer's disease: The Cache County Dementia Progression Study. **Alzheimers Dement.**, Michigan, v. 10, p. 366-371, 2014.

PETITPRÉ, C. et al. Neuronal heterogeneity and stereotyped connectivity in the auditory afferent system. **Nat Commun**. New York, v. 9, n. 1, p. 3691, 2018.

PETIT, C.; LEVILLIERS, J.; HARDELI, J. P. Molecular Genetics of Hearing Loss. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 35, p. 589–646, 2001.

PIATTO, V. B. et al. Genética molecular da deficiência auditiva não-sindrômica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. São Paulo, 2005.

PRINCE, V. E; PICKETT, F. B. Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. **Nature Reviews Genetics**, New York, v. 3, n. 11, p. 827-837, 2002.

RAO, A; LUO, C; HOGAN, P. G. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 15, n. 1, p. 707-747, 1997.

REESE, L.C; TAGLIALATELA, G. A Role for Calcineurin in Alzheimer's Disease. **Curr. Neuropharmacol.**, Sharjah, v. 9, p. 685–692, 2011.

RESENDE, R. R; SOCCOL, C. R. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações (1st ed.). Capítulo 1: zebrafish como modelo para estudos comportamentais. 2015.

RICHTER H; RANDAU L; PLAGENS A. Exploiting CRISPR/Cas: interference mechanisms and applications. **Int J Mol Sci.**, Basel, v. 14, n. 7, p. 14518-31, 2013.

ROMERO-CARVAJAL, A. et al. Regeneration of sensory hair cells requires localized interactions between the Notch and Wnt pathways. **Developmental cell**, Maryland Heights, v. 34, n. 3, p. 267-282, 2015.

RUSNAK, F; MERTZ, P. Calcineurin: form and function. **Physiol. Rev.**, Rockville, v. 80, p. 1483-1521, 2000.

RUSTICI G. et al. ArrayExpress update—trends in database growth and links to data analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 41, n. D1, p. D987–D990, 2013.

SAI, X., & LADHER, R. K. Early steps in inner ear development: induction and morphogenesis of the otic placode. **Frontiers in pharmacology**, Lausana, v. 6, p. 19, 2015.

SAMPAIO, A. L. L; OLIVEIRA, C. A. C. P. Estrutura e ultra-estrutura da orelha interna dos mamíferos com ênfase na cóclea. **Arq Int Otorrinolaringol**, v. 10, n. 3, p. 228-240, 2006.

SANDER, J. D; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulation and targeting genomes. **Nature Biotechnol.**, New York, v. 32, n. 4, p. 347-55, 2014.

SANO, K. et al. A role of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase in human platelet activation. Comparison of thrombin and collagen actions. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 258, n. 3, p. 2010-2013, 1983.

SAPEDE, D; PUJADES, C. Hedgehog signaling governs the development of otic sensory epithelium and its associated innervation in zebrafish. **Journal of Neuroscience**, Washington, v. 30, n. 10, p. 3612-3623, 2010.

SEILER, C. et al. Myosin VI is required for structural integrity of the apical surface of sensory hair cells in zebrafish. **Developmental biology**, Amsterdam, v. 272, n. 2, p. 328-338, 2004.

SIELEMANN, K; HAFNER, A; PUCKER, B. The reuse of public datasets in the life sciences: potential risks and rewards. **PeerJ**, v. 8, p. e9954, 2020.

SIMPSON, D; NOBLE, S. Tacrolimus Ointment: A Review of its Use in Atopic Dermatitis and its Clinical Potential in Other Inflammatory Skin Conditions. **Drugs**, Berlim, v. 65, n. 6, p. 827–858, 2005.

SIMMONS D.D. Development of the inner ear efferent system across vertebrate species. **J Neurobiol.** New York, v. 53, n. 2, p.228-50, 2002.

SMITH, R. J. H. et al. Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. **Bookshelf**, 2012.

SMITH, T. H. et al. Cannabinoid receptor-interacting protein 1a modulates CB1 receptor signaling and regulation. **Mol. Pharmacol.**, v. 87, p. 747–765, 2015.

SINGH, S. et al. Genome Wide Analysis Approach Suggests Chromosome 2 Locus to be Associated with Thiazide and Thiazide Like-Diuretics Blood Pressure Response. **Scientific reports**, New Yor, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

STINCIC, T. L; HYSON, R. L. The localization and physiological effects of cannabinoid receptor 1 in the brain stem auditory system of the chick. **Neuroscience**. Washington, v. 194, p. 150-9, 2011.

SJÖSTRÖM, P. J; TURRIGIANO, G. G; NELSON, S. B. Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. **Neuron**, New York, v. 39, n. 4, p. 641-654, 2013.

SUMMERTON, J; WELLER, D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. **Antisense and Nucleic Acid Drug Development**, New Rochelle, v. 7, n. 3, p. 187-195, 1997.

SUN, S. et al. Hair Cell Mechanotransduction Regulates Spontaneous Activity and Spiral Ganglion Subtype Specification in the Auditory System. **Cell**. Maryland Heights, v. 174, n. 5, p. 1247-1263, 2018.

SUN, X. et al. Genome-wide methylation and expression profiling identify methylation-associated genes in colorectal cancer. **Epigenomics**, Berlim, v. 12, n. 1, p. 19-36, 2019.

SUCKLING, E. E., & SUCKLING, J. A. The electrical response of the lateral line system of fish to tone and other stimuli. **J. Gen. Physiol.** New York, v. 34, p. 1–8, 1950.

TAIBER, A. et al. "Neonatal AAV gene therapy rescues hearing in a mouse model of SYNE4 deafness." *EMBO molecular medicine*, Heidelberg, v. 13, n. 2, p. e13259, 2021.

TAYLOR, J. S. et al. Genome duplication, a trait shared by 22,000 species of ray-finned fish. **Genome research**, New York, p. 13, n. 3, p. 382-390, 2003.

THISSE, C; THISSE, B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. **Nature protocols**, New York, v. 3, n. 1, p. 59-69, 2008.

TON, C; PARNG, C. The use of zebrafish for assessing ototoxic and otoprotective agents. **Hear Res.**, v. 208, p. 79–88, 2005.

TUMLIN, J. A. Expression and function of calcineurin in the mammalian nephron: physiological roles, receptor signaling, and ion transport. *Am. J. Kidney Dis.*, New York, v. 30, p. 884-895, 1997.

TYERS, M. et al. Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets. **Nature**, New York, v. 333, n. 6172, p. 470, 1988.

VACHER, M. et al. Validation of a priori candidate Alzheimer's disease SNPs with brain amyloid-beta deposition. **Scientific reports**, New York, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.

VAN LAER, L. et al. Autosomal dominant nonsyndromic hearing impairment. **Am J Med Genet**, Hoboken, v. 89, n. 3, p. 167-74, 1999.

VAN CAMP, G; SMITH, R.J.H. (05/2019). HEREDITARY HEARING LOSS HOMEPAGE. Disponível em: < <http://hereditaryhearingloss.org/>>. Acesso em: 13 Mai. 2019.

VEMARAJU, S. et al. A spatial and temporal gradient of Fgf differentially regulates distinct stages of neural development in the zebrafish inner ear. **PLoS genetics**, São Francisco, v. 8, n. 11, e1003068, 2012.

WADE, T. D. Traits and types of health data repositories. **Health information science and systems**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2014.

WANG, X; CULOTTA, V. C; KLEE, C. B. Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. **Nature**, New York, v. 383, n. 6599, p. 434-437, 1996.

WANG, Y. et al. Down-regulation of msrb3 and destruction of normal auditory system development through hair cell apoptosis in zebrafish. **International Journal of Developmental Biology**, Amsterdam, v. 59, n. (4-5-6), p. 195-203, 2015.

WANG, H. et al. Further evidence for “gain-of-function” mechanism of DFNA5 related hearing loss. **Scientific reports**, New York, v. 8, n.1, p.1-7, 2018.

WANG, B. et al. Does comorbidity increase the risk of patients with COVID-19: evidence from meta-analysis. **Aging**, Albany NY, v. 12, n. 7, p. 6049, 2020.

WANGEMANN, P. Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. **The Journal of physiology**, Hoboken, v. 576, n. 1, p. 11-21, 2006.

WATERSTON, R. H; PACHTER, L. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature**, New York, v. 420, n. 6915, p. 520-562, 2002.

WHITFIELD, T. Zebrafish as a model for hearing and deafness. **Journal of neurobiology**, Hoboken, v. 53, n. 2, p. 157-171, 2002.

WHITFIELD, T. T. et al. Models of congenital deafness: mouse and zebrafish. **Drug Discovery Today: Disease Models**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 85-92, 2005.

WHITELEY, A. R. et al. Population genomics of wild and laboratory zebrafish (*Danio rerio*). **Molecular Ecology**, Hoboken, v. 20, n. 20, p. 4259-4276, 2011.

WINDER, D. G. et al. Genetic and pharmacological evidence for a novel, intermediate phase of long-term potentiation suppressed by calcineurin. **Cell**, Maryland Heights, v. 92, n. 1, p. 25-37, 1998.

WILSON, R. I; KUNOS, G; NICOLL, R. A. Especificidade pré-sináptica da sinalização endocanabinóide no hipocampo. **Neuron**, New York, v. 31, n. 3, p. 453-462, 2001.

WINSTEL, R. et al. Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, n. 5, p. 2105-2109, 1996.

WORKEL, H. H. et al. Transcriptional Activity and Stability of CD39+CD103+CD8+ T Cells in Human High-Grade Endometrial **Cancer Int J Mol Sci.**, Basel, v. 21, n. 11, p. 3770, 2020.

WU, X. et al. Opposing roles for calcineurin and ATF3 in squamous skin cancer. **Nature**, New York, v. 465, n. 7296, p. 368-372, 2010.

XIA, W. et al. Mutations in TOP 2B cause autosomal-dominant hereditary hearing loss via inhibition of the PI 3K-Akt signalling pathway. **FEBS letters**, Hoboken, v. 593, n. 15, p. 2008-2018, 2019a.

XIA, W. et al. Novel TRRAP mutation causes autosomal dominant non-syndromic hearing loss. **Clinical Genetics**. Hoboken, 2019b.

YAO, Q. et al. Hearing assessment in zebrafish during the first week postfertilization. **Zebrafish**, New York, v. 13, n. 2, p. 79-86, 2016.

YE, Q. et al. Structural basis of calcineurin activation by calmodulin. **Cellular signalling**, Danvers, v. 25, n. 12, p. 2661-2667, 2013.

YOUSAF, R. et al. Modifier variant of METTL13 suppresses human GAB1-associated profound deafness. **The Journal of clinical investigation**, Michigan, v. 128, n. 4, p. 1509-1522, 2018.

ZENG, H. et al. Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. **Cell**, Maryland Heights, v. 107, p. 617-629, 2001.

ZHENG, X. et al. Cnrip1 is a regulator of eye and neural development in *Xenopus laevis*. **Genes Cells**. Hoboken, v. 20, n. 4, p. 324-39, 2015.

ZHANG, T. et al. Value of CNRIP1 promoter methylation in colorectal cancer screening and prognosis assessment and its influence on the activity of cancer cells. **Archives of medical science: AMS**, Poznań, v. 13, n. 6, p. 1281, 2017.

ZHANG, K. D; COATE, T. M. (2017, May). Recent advances in the development and function of type II spiral ganglion neurons in the mammalian inner ear. In *Seminars in cell & developmental biology*. **Academic Press.**, Cambridge, v. 65, p. 80-87, 2017.

ZHANG, Z; WANG, J; CHEN, O. Identification of biomarkers and pathogenesis in severe asthma by coexpression network analysis. **BMC Med Genomics**, New York, v. 14, n. 1, p. 51, 2021.

ZHU, Y. et al. The calcineurin regulatory subunit polymorphism and the treatment efficacy of tacrolimus for idiopathic membranous nephropathy. **Int. Immunopharmacol.**, Amsterdam, v. 65, p. 422-428, 2018. polaroids