

**OTOLOGIA**

# DESENVOLVIMENTO DO OUVIDO INTERNO DOS MAMÍFEROS: CONTRIBUIÇÃO PARA A COMPREENSÃO DAS DOENÇAS CONGÊNITAS DO OUVIDO

## *DEVELOPMENT OF THE MAMMALIAN INNER EAR CONTRIBUTION TO THE UNDERSTANDING OF CONGENITAL DISEASES OF THE EAR*

Nuno Trigueiros Cunha . Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Pedro Hispano, Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto  
Carla Pinto de Moura . Serviço de Otorrinolaringologia, Serviço de Genética Médica, Hospital S. João, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

### **RESUMO**

O ouvido interno dos mamíferos é um sistema muito complexo na sua estrutura e altamente sofisticado na sua função. Neste artigo, apresenta-se uma revisão sobre o desenvolvimento do ouvido interno, particularmente da cóclea, descrevendo os principais mecanismos moleculares e celulares implicados nesse processo, relacionando-os com as modificações morfológicas e funcionais que se vão sucedendo. O conhecimento destes mecanismos ajuda a compreender melhor a fisiologia deste órgão e a fisiopatologia que está subjacente às suas doenças, designadamente as congénitas e as de causa genética.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cóclea e desenvolvimento embriológico.

### **ABSTRACT**

*The mammalian inner ear is highly organized in its structure and very sophisticated in its function. In this paper, a review of the inner ear development is presented, giving special attention to the cochlea. The molecular and cellular mechanisms involved in this process are described and related to the morphological and functional alterations that succeed in time. The knowledge of these mechanisms helps in a better understanding of the inner ear physiology and of the physiopathology of its illnesses, namely the congenital and those of genetic cause.*

**KEY-WORDS:** Cochlea and embryologic development.

## INTRODUÇÃO

O ouvido interno dos mamíferos divide-se num órgão receptor da audição e num órgão vestibular, implicado no equilíbrio. O órgão da audição encontra-se no interior da cóclea, cujo nome se deve à sua semelhança com um caracol, sendo constituído por uma faixa de células sensoriais, tonotopicamente organizadas, dispostas ao longo da membrana basilar do canal coclear. São as variações das propriedades mecânicas da membrana basilar e das propriedades mecano-eléctricas das células ciliadas que permitem a detecção de diferentes frequências sonoras ao longo do comprimento da cóclea. O órgão vestibular ocupa a porção posterior do labirinto, sendo constituído pelas máculas do utrículo e do sáculo e as cristas dos canais semicirculares (CSC).

Estas estruturas são responsáveis pela detecção dos movimentos resultantes de acelerações linear e angular e da acção da gravidade, sendo estas funções necessárias à manutenção do equilíbrio<sup>1</sup>.

Para se poder compreender a fisiologia deste órgão e a fisiopatologia das doenças que o afectam, particularmente as congénitas e as de causa genética, é necessário conhecer os principais mecanismos moleculares e celulares que estão implicados no seu desenvolvimento.

O desenvolvimento do ouvido pode ser resumido em 4 fases cronologicamente organizadas: 1) indução do placódio ótico; 2) invaginação do placódio e morfogénese do otocisto; 3) proliferação e diferenciação dos neurónios e dos epitélios sensoriais e 4) maturação coclear<sup>2,3</sup>.

## INDUÇÃO DO PLACÓDIO ÓTICO

Nos vertebrados, o ouvido interno desenvolve-se exclusivamente a partir do placódio ótico que é um espessamento do epitélio ectodérmico, constituído por células altas, localizado na porção cefálica do embrião, lateralmente à parte rombencefálica do tubo neural (rombómeros 5 e 6)<sup>3-6</sup>. A indução das células ectodérmicas que irão originar o placódio faz-se no estágio de 4-5 sómitos, embora só seja visualizável no estágio de 12 sómitos<sup>6</sup>; no Homem, este estágio corresponde ao 23º dia de vida intrauterina (E23) e no Ratinho ao E8,0 – 8,5<sup>3,6-8</sup>. O marcador mais precoce das células precursoras do placódio é o factor de transcrição do gene *Pax8*, logo seguido dos genes *Pax2* e *Dlx3* no estágio de 5 sómitos, e os dos genes *Sox3* e *BMP7* no de 7 sómitos<sup>6</sup>.

A formação do placódio ótico é induzida por sinais neuroquímicos (factores de transcrição e neurotrofinas) com origem na mesoderme paraxial e na placa neural adjacentes (ver Quadro 2). Apesar do mecanismo molecular não ser completamente conhecido, Ladher *et al.* propõem que o factor de crescimento *FGF19*, produzido na mesoderme, activa o gene *Wnt8c* na neuroectoderme e que ambos funcionariam como interruptor da diferenciação do placódio, induzindo a expressão do factor de crescimento *FGF3* bem como de outros marcadores necessários para essa diferenciação (ex.: *Nkx5*, *Pax2*, *SOHo1* e *Dlx5*)<sup>9</sup>.

## INVAGINAÇÃO DO PLACÓDIO E MORFOGÉNESE DO OTOCISTO

O placódio ótico invagina-se, dando origem à tacícula ótica que, ao encerrar, forma uma vesícula - otocisto ou vesícula ótica - limitada por epitélio pseudoestratificado que se afunda na mesoderme subjacente, separando-se da ectoderme<sup>3-6</sup>. Este passo é induzido e controlado por factores de transcrição de genes (ex.: *Pax3*, *Hoxa1*, *kreisler*) que, difundindo-se do rombencéfalo adjacente, regulam indirectamente a morfogénese do otocisto através de factores como o *FGF3* (ver Quadros 2 e 3). (para revisão ver Rinkwitz *et al.*, 2001<sup>6</sup>).

No Ratinho, a primeira alteração morfológica visível no otocisto consiste no aparecimento, na sua parede medial, do ducto endolinfático, no dia E10.75<sup>3</sup>. Simultaneamente, na porção ventral do otocisto, surge uma protuberância que irá originar o sáculo e o canal coclear<sup>3,6</sup>.

No E11,5, o primórdio coclear continua a prolongar-se ventralmente e, na porção dorsolateral do otocisto, surge um prolongamento, a placa vertical, que irá originar os canais semicirculares (CSC) posterior e superior<sup>3</sup>.

No dia E12, surgem duas zonas de reabsorção na placa vertical, começando a individualizar-se os CSC posterior e superior; ao mesmo tempo, na parede lateral do otocisto surge a placa horizontal, o primórdio do CSC lateral<sup>3</sup>. O primórdio coclear divide-se em duas partes, proximal e distal. A parte proximal expande-se para dar origem ao sáculo, enquanto a parte distal continua a prolongar-se anteriormente, tomando a forma dum gancho, dando origem ao canal coclear<sup>3</sup>.

No dia E13, os três CSC estão bem individualizados, o pavimento do utrículo adopta a posição horizontal e o sáculo apresenta-se como uma expansão da porção proximal do canal coclear. Nesta fase, a cóclea apresenta meia espira<sup>3</sup>.

No dia E15, surgem os canais utriculosacular e cocleosacular, os CSC apresentam ampolas onde se irão alojar as cristas e a cóclea tem uma espira e meia<sup>3</sup>. No dia E17, o labirinto posterior apresenta o seu aspecto definitivo, mas a cóclea possui apenas uma espira e três quartos<sup>3</sup>.

No Rato a cronologia da morfogénese do labirinto é muito semelhante. Na porção ventromedial do otocisto, o canal coclear separa-se do sáculo no E14<sup>10</sup>. No E16, o canal coclear já apresenta uma espira completa e o mesênquima circundante tornou-se compacto para formar a cápsula ótica<sup>10</sup>, sendo a condrogénese da cápsula ótica controlada pelo factor de *TGFβ1*<sup>11</sup>. Na cóclea, no E18, já se observam as 3 espiras contornando o modíolo, e no E19 surge o espaço perilinfático<sup>10</sup>.

No Homem, a morfogénese do labirinto segue um percurso morfológico semelhante ao descrito anteriormente para os roedores, mas com diferente padrão cronológico (ver Quadro 1). O placódio ótico surge no início da quarta semana de vida embrionária (embrião de 4mm), na superfície da ectoderme da parte lateral da cabeça, ao nível do quarto ventrículo. Na quinta semana, o placódio afunda na mesoderme adjacente, perde a continuidade com a ectoderme e forma-se o otocisto. A parte dorsal do otocisto dá origem ao aqueduto do vestibulo e aos CSC, e a parte ventral origina o sáculo e a cóclea

no embrião de 37 dias (15mm). Pelas 10 semanas o labirinto tem um aspecto semelhante ao do adulto, crescendo apenas em tamanho até às 25 semanas<sup>12</sup>.

## PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DOS NEURÓNIOS E DOS EPITÉLIOS SENSORIAIS

No Ratinho, as células precursoras dos neurónios primários originam-se imediatamente após o encerramento do otocisto na porção anteroventral da vesícula ótica, no dia E9,5<sup>13</sup>. Posteriormente, no 12º dia de vida embrionária (E12), estas células progenitoras migram para formar, com as células progenitoras do gânglio geniculado, um único primórdio ganglionar, o gânglio facioestatoacústico, que se localiza cranio-medialmente ao otocisto<sup>2,10,14,15</sup>. As células progenitoras do gânglio geniculado originam-se no primeiro placódio epibrânquial<sup>14,15</sup>. No E12,5, o gânglio geniculado separa-se do facioestatoacústico, formando o gânglio estatoacústico<sup>14,15</sup>. Entre o E13,5 e o E14,5, o gânglio estatoacústico divide-se no gânglio espiral e no gânglio vestibular, e os neurónios do gânglio espiral migram para o modiolo da cóclea<sup>3,15</sup>. No entanto, os neurónios ganglionares começam a inervar os seus alvos periféricos, no dia E11,5, logo que se inicia a diferenciação dos epitélios sensoriais do labirinto membranoso<sup>3</sup>.

Tem havido alguma polémica sobre a origem das células precursoras dos neurónios, centrando-se a discussão desta génese na exclusividade da origem no placódio ótico ou na contribuição de células da crista neural, que na fase de contacto íntimo entre estas estruturas migrariam para o placódio ótico<sup>2,16-18</sup>. Contudo, está hoje demonstrado que todos os neurónios derivam de células ectodérmicas que se transformam, pela activação duma cascata de genes, em células precursoras de neurónios e que apenas as células de Schwann e os melanócitos têm origem na crista neural<sup>2,13</sup>.

Os genes que regulam esta diferenciação são designados genes proneurais e pertencem à família dos genes "Helix-Loop-Helix" básicos (bHLH). Os genes proneurais formam dímeros com as proteínas-E e ligam-se ao ADN para exercerem as suas funções<sup>13</sup>. Esta família de genes divide-se em três grupos, os verdadeiros genes bHLH que originam a linhagem neural, os que promovem a sua diferenciação e os que interferem na determinação da linhagem neural ou glial<sup>2,13</sup>.

Para que se formem neurónios primários no ouvido interno é necessário que se exprima o gene neurogenina1 (*ngn1*)<sup>19</sup>. A definição da linhagem celular precursora dos neurónios determina para onde estes devem migrar e a forma como se comportarão os seus axónios e dendritos, mas é essencial a contribuição doutros genes, como os da família NeuroD, para a maturação e migração destes neurónios (ver Quadro 3)<sup>13</sup>.

O crescimento das fibras dos neurónios auditivos primários para o epitélio alvo é, inicialmente, independente da presença de neurotrofinas. Contudo, muito precocemente, segue-se um período em que as neurotrofinas BDNF e NT3 e os seus receptores (TrkB e TrkC) parecem desempenhar papel crítico na sobrevivência e orientação das fibras<sup>13,20</sup>. Estes factores de crescimento desempenham papel importante na eliminação das fibras anormais e que não estabelecem conexões, ini-

ciando-se este processo de selecção muito precocemente, (no Ratinho, E11 no vestíbulo e E12 na cóclea)<sup>13,21</sup>.

No Ratinho, o primeiro dos epitélios sensoriais a individualizar-se é a crista do CSC posterior (E11.5), seguindo-se a mácula do utrículo e as cristas dos CSC superior e lateral (E12) e, por fim, a mácula do sáculo e o epitélio coclear, que se originam em conjunto (E13)<sup>3</sup>.

Anteriormente a E12, o ducto coclear apresenta o pavimento formado por células epiteliais em fase proliferativa que constituem o precursor do epitélio sensorial e irá originar o órgão espiral e os sulcos interno e externo<sup>22</sup>. O primeiro marcador destas células prosensoriais é o factor de transcrição Sox2 (Quadro 3)<sup>22</sup>. No dia E12, estas células atingem a mitose terminal, no ápice da cóclea, tornando-se permanentemente pós-mitóticas. Nos dias seguintes, uma onda de mitoses terminais estende-se ao longo da cóclea, no sentido ápice-base, sendo este processo regulado pela expressão do inibidor do ciclo celular p27 (*kip1*)<sup>23</sup>.

Após a última mitose das células progenitoras dos epitélios sensoriais da cóclea e do vestíbulo, a sinalização molecular desempenha um papel fundamental na génese das linhagens celulares (ciliadas ou de suporte) e na sua diferenciação (ver Quadro 3). O gene proneural *Atoh1/Math1* codifica um factor de transcrição bHLH essencial (e possivelmente suficiente) na indução da diferenciação das células ciliadas<sup>24</sup> e que é dependente da expressão do factor de transcrição Sox2, que deve actuar a montante deste gene<sup>22</sup> (ver Quadro 3). O sistema de sinalização *Notch* que actua através das proteínas *notch1*, *jagged1* e *2* e *delta1*, controla a diferenciação celular no sentido de células ciliadas ou de suporte usando um mecanismo de inibição lateral<sup>25</sup>. As células ciliadas exprimem as proteínas *jagged2* e *delta1*, enquanto as de suporte exprimem a *notch1*. A sinalização do sistema *Notch*, através da proteína *notch1*, induz a expressão do gene *Hes1* que, ao ser expresso nas células de suporte, antagoniza o gene *Atoh1/Math1* que controla a diferenciação no sentido das células ciliadas<sup>26,27</sup>. Os genes *Brn3c (Pou4f3)* e *Gfi1* são essenciais para a maturação, sobrevivência e migração das células ciliadas e estão implicados na diferenciação final destas células<sup>28,29</sup>, não estando implicados na génese das linhagens celulares. O mecanismo de acção do factor de transcrição do gene *Brn3c (Pou4f3)* é induzir o promotor do BDNF e do NT3, levando à síntese destas moléculas nas células sensoriais do ouvido interno<sup>30</sup> (ver Quadro 3). O gene *Barhl1* produz um factor de transcrição que se expressa nas células ciliadas da cóclea e do vestíbulo, entre os dias E14,5 e o DPN5<sup>31</sup>. Este factor de transcrição é necessário para a manutenção das células ciliadas, e talvez para a sua diferenciação final, mas não está envolvido na génese ou na diferenciação precoce destas células<sup>31</sup> (ver Quadro 3).

A ciliogénese das células ciliadas inicia-se no vestíbulo, no dia E12<sup>32</sup>. No dia E14, já é possível observar uma pequena faixa de esteríocílios na face superior das células<sup>33</sup>. No E17, os esteríocílios estão mais longos, apresentam "tip-links" entre eles e são capazes de captar FM1-43, sugerindo a presença dum aparelho transdutor activo<sup>34</sup>. Na cóclea, este processo inicia-se mais tarde (dia E16)<sup>35</sup>.

No início da ciliogénese, os epitélios sensitivos são formados por células poligonais cuja superfície livre é atapetada de microvilosidades e tem no seu centro um quinóclio, com a estrutura microtubular dum cílio<sup>7,35</sup>. Posteriormente, as microvilosidades que

rodeiam este quinocílio vão crescendo progressivamente, até darem origem a esteriocílios, que apresentam um citosqueleto de actina e espina<sup>16,35</sup>. O quinocílio é progressivamente deslocado para a periferia lateral da superfície celular e, na cóclea, ocupa o vértice numa faixa de esteriocílios de alturas crescentes (em escada), com a forma dum V<sup>35</sup>. O quinocílio está adjacente à fiada de esteriocílios mais altos e determina a polaridade dessa faixa<sup>35</sup>. Esta migração do quinocílio não é feita ao acaso, sendo orientada pela expressão das proteínas Celsr1, Vangl2 e Wnt7 (para revisão: Kelley, 2006<sup>41</sup>). Na cóclea, o desenvolvimento dos esteriocílios e da sua polaridade segue um gradiente base-ápice, no eixo longitudinal, e medial-lateral, no eixo transversal<sup>35</sup>. Nos mamíferos o quinocílio desaparece no período pós-natal<sup>35</sup>.

A forma e orientação da faixa de esteriocílios desempenha um papel fundamental na polaridade das células ciliadas pois está demonstrado que a deflexão dos esteriocílios no sentido do mais alto (lateral) resulta na despolarização da célula e, no sentido inverso (medial), na sua hiperpolarização. Esta deflexão provoca quer a abertura, quer a oclusão dos canais de potássio e cálcio associados às "tip-links" existentes entre os esteriocílios, sendo responsável pela transdução da energia mecânica sonora em impulsos nervosos<sup>36-38</sup>. Neste contexto, a formação, o desenvolvimento e a orientação dos esteriocílios são fundamentais para a eficácia funcional das células ciliadas. Por outro lado, foi recentemente demonstrado que a manutenção da forma e dimensão de cada esteriocílio depende da reconstrução permanente do seu citosqueleto de actina e espina que, por sua vez, necessita do transporte de monómeros destas moléculas para a extremidade superior do esteriocílio e da sua incorporação no citosqueleto<sup>39</sup>. Verificou-se que o processo de manutenção do citosqueleto dos esteriocílios é o mesmo que está implicado na sua formação, sendo constituído pela miosina XVa, a "whirlin", a gama-actina e a espina<sup>39</sup>. A miosina XVa actua como transportador de monómeros de actina e de espina do citoplasma até à ponta do esteriocílio onde a "whirlin" promove a sua incorporação no citosqueleto<sup>39</sup>. Se ocorrer uma mutação num dos genes codificadores destas proteínas (miosina XVa, "whirlin", gama-actina e espina) surge surdez não síndromica<sup>40,41</sup>. Outra causa deste tipo de surdez é motivada pela alteração da orientação da faixa de esteriocílios e resulta de mutações dos genes que codificam as proteínas que orientam a migração do quinocílio (Celsr1, Vangl2 e Wnt7)<sup>41</sup>.

A apoptose ou morte celular programada é essencial para o normal desenvolvimento e diferenciação de tecidos e de estruturas. No epitélio coclear do rato, a apoptose é observada durante os períodos embrionário e pós-natal muito precoce, em estruturas que serão removidas, em torno de cavidades e em zonas de proliferação celular rápida ou em diferenciação<sup>10</sup>. Nos gânglios estatoacústico e coclear, a apoptose começa a observar-se no E12, com pico no E18-E19, terminando nos primeiros dias de vida pós-natal (DPN0-DPN1). Este pico da apoptose coincide com a entrada de fibras nervosas no neuroepitélio<sup>10</sup>. Um segundo pico de morte celular programada é observado no gânglio espiral durante a primeira semana de vida pós-natal, verificando-se uma diminuição significativa do número de neurónios. A perda de neurónios atinge especialmente neurónios do tipo II e é coincidente com a mudança do padrão de inervação das células ciliadas externas, de aferente para eferente<sup>42,43</sup>. Ao contrário do gânglio coclear, no órgão espiral, a apoptose observa-se de forma dispersa. Estes dados sugerem que as células ganglionares são produzidas em excesso e que a sua sobrevivência depende de factores tróficos originados pelas células sensoriais<sup>10</sup>.

## ■ ■ ■ MATURAÇÃO COCLEAR

O processo de maturação morfológica do neuroepitélio do canal coclear do Rato começa no E16, seguindo um gradiente basoapical<sup>44,45</sup>. Inicialmente é formado por células poligonais cuja superfície livre é revestida de microvilosidades e um quinocílio, com a estrutura microtubular dum cílio, localizado no seu centro<sup>7,35</sup>. As primeiras células ciliadas internas (CCI) observam-se na espira basal do Rato no E18, e as primeiras células ciliadas externas (CCE) no E20<sup>10,35</sup>. O aspecto morfológico geral do órgão espiral do Rato sofre apenas modificações discretas até ao DPN8, apresentando-se como um epitélio indiferenciado, constituído por células cubóides, em que dificilmente se distinguem os diferentes tipos de células e com a membrana tectória completamente aderente à superfície do epitélio (órgão de Kölliker)<sup>46</sup>. As alterações morfológicas mais importantes na maturação morfológica do órgão espiral ocorrem entre os dias DPN8 e DPN12. Durante este período formam-se os espaços de líquido extracelular (túnel interno ou de Corti e o justacuniculo), o sulco interno abre-se, a membrana tectória liberta-se do epitélio, mantendo apenas contacto com os cílios das células ciliadas e verifica-se a deposição de filamentos na membrana basilar<sup>45-47</sup>. A disposição em V da faixa de esteriocílios nas CCE e, em V muito aberto, quase em linha, nas CCI surge no fim da 1ª semana de vida pós-natal<sup>7,16,35</sup>, sendo coincidente com o aparecimento do túnel interno (de Corti), do justacuniculo (espaço de Nuel), e com a diferenciação e libertação da membrana tectória<sup>47,45</sup>. Este aspecto morfológico é coincidente com a entrada em função da cóclea, que se verifica no DPN12<sup>48</sup>. As células ciliadas atingem as suas dimensões definitivas na espiral basal no fim da 1ª semana pós-natal e durante a semana seguinte, ao longo da restante cóclea<sup>35,47</sup>.

A abertura do túnel interno e do justacuniculo tem início, a nível ultra-estrutural, no DPN4, quando surgem microvilosidades nas paredes laterais das células dos pilares e retículo rugoso no citoplasma adjacente. Este sistema é responsável pela secreção de proteínas e fluído para o exterior destas células criando espaços entre elas que vão aumentando progressivamente. Este processo ocorre entre os DPN6 e 10<sup>49</sup>. Após o DPN14, o fluído dos espaços torna-se claro, paralelamente ao aparecimento de lisossomas no citoplasma das células dos pilares, sendo provável que se verifique a endocitose e digestão das proteínas segregadas anteriormente para o espaço extracelular. O retículo rugoso que se observava anteriormente no citoplasma adjacente à parede lateral das células dos pilares desaparece<sup>49</sup>.

A altura e a área transversal do órgão espiral aumentam, ao longo de toda a cóclea, desde o nascimento até ao DPN24, quando atinge o tamanho adulto<sup>46</sup>. A membrana basilar cresce em largura até ao DPN12 e em comprimento até ao DPN24, ao mesmo tempo que aumenta a densidade de filamentos<sup>46</sup>. O aumento de comprimento da membrana basilar justifica o deslocamento, no sentido apical, da codificação das frequências na cóclea, situação que se verifica durante o primeiro mês de vida pós-natal<sup>50-52</sup>. A veia espiral, localizada sob a membrana basilar, regride no sentido apicobasal, mantendo-se apenas na espira basal no DPN24<sup>46</sup>.

No DPN4, o sulco interno, localizado medialmente às células ciliadas internas, encontra-se recoberto por células mesenquimatosas. Este aspecto mantém-se com poucas alterações



até ao DPN8. Entre os DPN8 e 12, as células mesenquimatosas do sulco interno regridem, ficando este apenas recoberto por um epitélio simples formado pelas células limitantes internas, que crescem em altura até ao dia 24<sup>46</sup>. Por outro lado, as células limitantes externas (Hensen, Claudius e Boettcher) formam um epitélio simples que cobre a parte lateral da membrana basilar e a parte inferior do ligamento espiral, não podendo ser distinguidas entre si até ao DPN8. Entre os DPN8 e 12, estas células aumentam de tamanho e as células de Boettcher, situadas entre as células de Hensen e de Claudius, sobre a membrana basilar, tornam-se visíveis devido à sua coloração mais intensa<sup>46</sup>. Após o DPN 12, as células de Hensen formam várias camadas enquanto as de Claudius permanecem em contacto com o ligamento espiral<sup>46</sup>.

Entre os dias DPN 12 e 24, as principais alterações morfológicas só são visíveis a nível ultra-estrutural, observando-se a diminuição dos organelos no citoplasma das células ciliadas e o aumento dos filamentos nas células de suporte<sup>47</sup>.

A estria vascular é uma estrutura localizada na parede lateral do ducto coclear dos mamíferos, sobre o ligamento espiral, sendo constituída por três tipos de células: as células marginais, em contacto com a endolinfa, as células intermediárias que formam uma camada profundamente a estas, e as células basais que formam uma camada contínua que separa a estria vascular do ligamento espiral<sup>53</sup>. Esta estrutura é responsável pela secreção de iões que possibilita a génese do potencial endococlear através da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase<sup>53,54</sup>. Nos roedores, a estria vascular começa a diferenciar-se nos dias E16-17 na porção rostro-lateral do ducto coclear e a sua maturação faz-se no sentido baso-apical<sup>14</sup>. Inicialmente, surge como uma condensação de mesênquima, rico em capilares, recoberta por epitélio cubóide simples e dele separado por uma membrana basal<sup>14</sup>. Inicialmente as células marginais apresentam grande número de microvilosidades e um quincílio na sua superfície endolinfática, mas estas estruturas vão desaparecendo progressivamente à medida que estas células se diferenciam e se tornam mais densas<sup>53,55</sup>. Paralelamente, na face profunda (baso-lateral) das células marginais, formam-se prolongamentos que se dirigem para o mesênquima subjacente, contactando com células mesenquimatosas, futuras células intermediárias, e com capilares<sup>53,56</sup>. A membrana basal que as separava fragmenta-se e acaba por desaparecer<sup>56,57</sup>. Posteriormente, as células intermediárias em diferenciação formam prolongamentos que se vão interdigitar com os das células marginais, criando um sistema de pregas que se torna progressivamente mais complexo e que envolve os capilares<sup>53</sup>. Ao mesmo tempo, as células basais em diferenciação alinham-se, separando o ligamento espiral das células intermédias<sup>53</sup>. A estria vascular apresenta um importante sistema de "tight-junctions" que, inicialmente, une apenas as células marginais mas, no final da maturação agrega, de forma profusa todas as células do epitélio, tornando estanque o compartimento endolinfático<sup>53</sup>.

No rato, A inervação do epitélio coclear tem início no E16, com a chegada de dendritos das células ganglionares (fibras aferentes). Estas fibras aferentes estabelecem sinapses com a base das futuras CCI e CCE<sup>2,16,58</sup>. A inervação do neuroepitélio também segue um gradiente baso-apical<sup>2,16,59</sup>. O sistema eferente olivococlear, com origem no complexo olivar superior, chega mais tarde ao órgão espiral, começando por contactar as bases das CCI da espira basal durante os primeiros dias de vida pós-natal (DPN0 a DPN2), só alguns dias mais tarde contactando as CCE (DPN6-DPN10)<sup>2,16,59</sup>. A chegada da

inervação eferente olivococlear às CCE, com quem estabelecem sinapses através de grandes botões sinápticos, provoca a regressão das sinapses das fibras aferentes radiais (neurónios de tipo I) que, inicialmente, contactavam a base das CCE, mantendo-se apenas as fibras aferentes espirais (neurónios de tipo II)<sup>4,16,58,60</sup>. A alteração do padrão de inervação destas CCE, para um padrão eferente, parece ser devida à necessidade de controlar a electromotricidade destas células<sup>16</sup>. Paralelamente, verifica-se que as fibras eferentes que contactam a base das CCI se transferem para os botões sinápticos das fibras aferentes, adquirindo o padrão encontrado no adulto<sup>4,7,16</sup>. A regulação do desenvolvimento da inervação coclear parece ser mediado (pelo menos em parte) por neurotrofinas, sendo crucial a acção sinérgica do NT-3 e do BDNF na sobrevivência e na fase final do desenvolvimento dos neurónios<sup>2,61</sup>.

É controverso o papel dos contactos sinápticos para a diferenciação do epitélio coclear, havendo especulações sobre o possível efeito trófico das fibras nervosas sobre as células do neuroepitélio<sup>16</sup>; no entanto, dados recentes apontam para que esta estrutura se desenvolva independentemente do contacto das fibras<sup>2</sup>.

No padrão adulto de inervação, cada CCI estabelece sinapse com várias fibras aferentes radiais (cerca de uma dezena), que constituem os dendritos dos neurónios ganglionares de tipo I, e o seu botão sináptico é contactado por fibras eferentes que, por terem origem na porção lateral do complexo olivar superior, se designam olivococleares laterais<sup>7,16</sup>. A via aferente veicula a informação auditiva entre a cóclea e o SNC (núcleos cocleares). Por outro lado, as CCE são inervadas pelos dendritos dos neurónios de tipo II que, ao chegar ao órgão espiral, inflectem em direcção à base, inervando um número significativo de CCE – fibras aferentes espirais<sup>62,63</sup>. As fibras do sistema eferente que inervam as CCE têm origem na porção medial do complexo olivar superior, constituindo o sistema eferente medial, e estabelecem contacto directo com a base destas células. A inervação das CCE parece ter como objectivo o controlo da electromotricidade destas células<sup>16</sup>.

No Rato, durante o período fetal e a primeira semana de vida pós-natal, as células do gânglio espiral parecem ser homogéneas, não sendo possível distinguir células de tipo I e células de tipo II<sup>43,64</sup>. A diferenciação das células de tipo II faz-se durante a 2ª semana, após estar estabelecido o padrão adulto da inervação do órgão espiral<sup>2,16,43,64</sup>.

No Homem, a mitose terminal das células progenitoras do epitélio sensorial coclear faz-se na 8ª semana de vida intrauterina, e na 9ª semana o órgão espiral apresenta-se como uma crista de células poligonais atapetadas de microvilosidades e com um quincílio central<sup>7,65</sup>. A ciliogénese começa na 11ª semana e faz-se segundo dois gradientes, base - ápice e CCI – CCE<sup>7,16,65</sup>. Na 14ª semana, a organização em fiadas dos dois tipos de células está terminada. Inicialmente, os cílios das CCI e das CCE têm aspecto semelhante, organizando-se em tufos circulares polarizados pelo quincílio. Seguidamente, os cílios mais externos alongam-se, localizando-se os mais longos ao lado do quincílio, e começam a assumir a organização tridimensional definitiva em "V", que nas CCI é muito aberta, parecendo quase linear. A ciliogénese está concluída entre a 22ª e a 24ª semanas<sup>7,65</sup>. A membrana tectória surge pela 10ª semana na parte ântero-inferior da vesícula ótica, sendo formada por material fibrilar<sup>7</sup>. Posteriormente, localiza-se sobre o órgão de Kölliker que ocupa a região do sulco espiral interno e segrega o material gelatinoso que se depõe sobre a estrutura fibrilar.

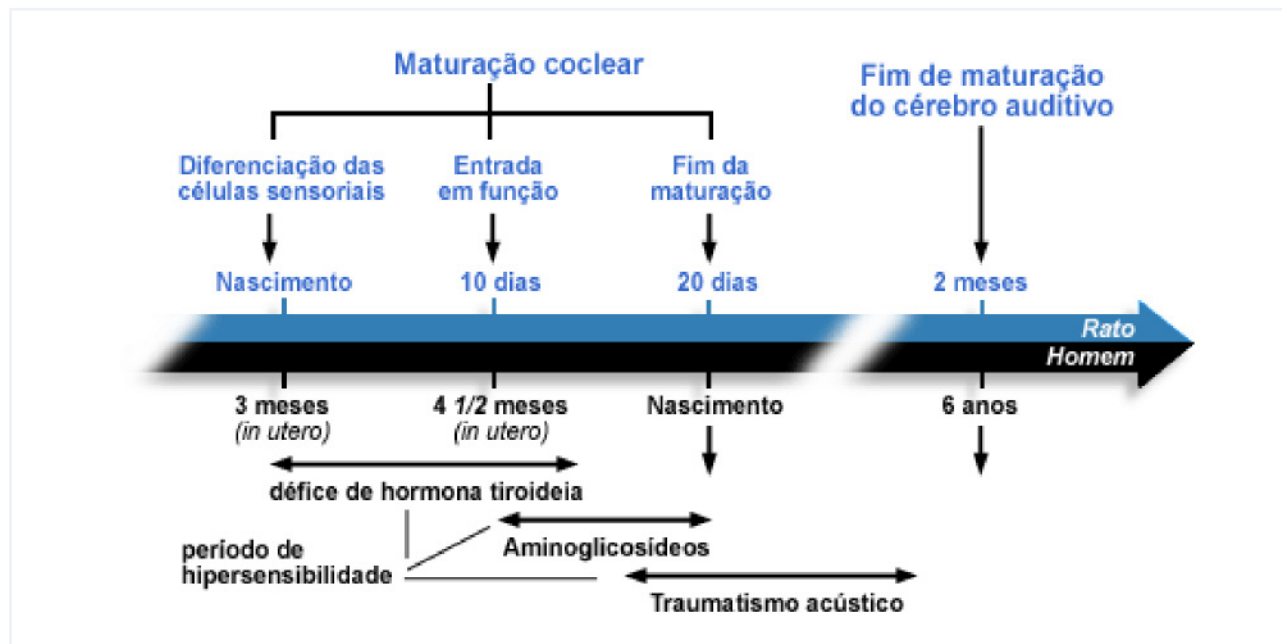


FIG 1

Desenvolvimento comparado da cóclea e cérebro auditivo no rato e no Homem.

Este esquema apresenta a comparação cronológica dos três estádios finais de maturação coclear no rato e no homem e a maturação tardia do cérebro auditivo. As três setas horizontais mostram os períodos de hipersensibilidade a três causas frequentes de lesão coclear, o défice de hormona tiroideia, a exposição a aminoglicosídeos e o traumatismo acústico. Nestes períodos a cóclea é francamente mais vulnerável a estes agentes que a cóclea adulta. (Adaptado de "Em torno da cóclea" 2003).

Pelas 18-20<sup>a</sup> semanas, a membrana tectória liberta-se devido ao desaparecimento do órgão de Kölliker, sendo coincidente com a entrada em função da cóclea. A inserção da membrana tectória nos cílios das CCE da base é forte, enquanto no ápice é mais laxa, como se a região apical ficasse num estágio de diferenciação mais primitivo que a base, correspondendo a um funcionamento mais elementar<sup>7,16</sup>.

A maturação electrofisiológica coclear, no Rato, inicia-se na segunda semana de vida pós-natal<sup>7,66</sup>. O potencial endoclear, gerado pela bomba de iões da estria vascular é muito baixo ao nascimento, verificando-se uma subida abrupta no fim da segunda semana de vida, para estabilizar nos níveis do adulto pela terceira semana<sup>53</sup>. O potencial microfónico coclear surge entre os DPN8 e DPN10, quando as células ciliadas começam a adquirir características de células maduras, verificando-se a estabilização no DPN14. Este potencial é gerado principalmente pelas CCE em resposta a estímulos sonoros<sup>48</sup>. O potencial de somação, atribuído essencialmente à despolarização das CCI, surge entre o 5<sup>o</sup> e o 7<sup>o</sup> dias de vida pós-natal, estabilizando no nível definitivo no DPN15<sup>66,67</sup>. O potencial de acção composto, que representa a despolarização sincronizada de múltiplas fibras do nervo auditivo (neurónio coclear), surge entre os DPN10 e DPN12 e constitui a verdadeira mensagem auditiva<sup>48,66,67</sup>. Inicialmente, os limiares são elevados, mas baixam de forma exponencial até atingir os valores do adulto no DPN20<sup>7,48,66,67</sup>.

O início da audição não parece estar dependente do processo de exocitose e endocitose de glutamato na sinapse entre a CCI e o primeiro neurónio da via auditiva, pois esta actividade tem início próximo do nascimento e provavelmente transmite-se ao longo da via auditiva<sup>68</sup>. Esta transmissão sináptica, observada nas CCI imaturas, está relacionada com a presença de

múltiplos "ribbons" do lado pré-sináptico de cada sinapse e com a elevada densidade de canais de cálcio imaturos que se observa durante a primeira semana de desenvolvimento pós-natal<sup>68</sup>. Como os canais de cálcio imaturos são permeáveis ao cálcio, verifica-se um influxo permanente deste ião para o interior da célula, que é responsável pela despolarização espontânea da CCI que resulta na libertação do mediador para a fenda sináptica<sup>68</sup>. Esta actividade sináptica precoce das CCI observa-se antes do início da audição e poderá ser responsável pela manutenção e diferenciação dos neurónios auditivos, provavelmente devido à libertação de factores neurotróficos ou pela regulação de funções celulares como a expressão de genes<sup>68</sup>. O seu significado fisiológico é demonstrado pela perda maciça de neurónios da via auditiva que se verifica após a lesão intencional precoce das células ciliadas<sup>68</sup>.

A maturação do processo de transdução mecânica nos esteriocílios parece também não ser o passo determinante do início da função auditiva, pois esta surge entre os dias E16 e E17, no do ratinho, sendo observáveis as "tip-links" entre os esteriocílios, a presença da miosina Ic e a presença e a permeabilidade dos canais de transdução<sup>38</sup>.

Pelo que se descreve atrás, tudo indica que o passo determinante no início da função auditiva sejam a presença do potencial endoclear e, possivelmente, a capacidade dos neurónios de tipo I de transmitirem a informação auditiva para os núcleos do SNC através de potenciais de acção compostos.

No Homem, o facto da maturação electrofisiológica se fazer *in utero*, dificulta grandemente o seu estudo. Em prematuros, é possível obter potenciais auditivos do tronco cerebral com limiares de 65 dB na 25<sup>a</sup> semana de gestação, de 45 dB na 30<sup>a</sup> e de 10 dB na 35<sup>a</sup> semana<sup>69</sup>. Os valores normais do adulto são obtidos 1 mês após o nascimento<sup>69</sup>.

## QUA 1

DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DO OUVIDO INTERNO NO HOMEM			
ESTÁDIO DO EMBRIÃO / FETO	COMPRIMENTO (mm)	IDADE	EVENTO DE DESENVOLVIMENTO
X	1,5-2,0	22±1 dias	Formação do placódio ótico.
XI	2,0-3,0	24±1 dias	Aparecimento da tacícula ótica.
XII	3,5	26±1 dias	Tacícula profunda.
XIII	4,0-5,0	28±1 dias	Otocisto separa-se da superfície. Aparecimento do ducto endolinfático.
XIV	6,0-7,0	28-30 dias	Otocisto apresenta espessamentos da parede nos locais dos canais semicirculares e ducto coclear. Ducto endolinfático evidente. Esboço do gânglio estatoacústico surge na parede anterior do otocisto.
XV	7,0-8,0	31-32 dias	Crescimento dos ducto e saco endolinfáticos.
XVI	8,0-11,0	33±1 dias	Surgem os esboços dos canais semicirculares na porção dorsal do otocisto.
XVII		35±1 dias	Aparecimento do ducto coclear na porção ventral do otocisto.
XVIII	14.0-16,0	37±1 dias	Reabsorção da parte central dos canais semicirculares. Ducto coclear separa-se do sáculo. Fibras nervosas do gânglio estatoacústico chegam ao labirinto.
XIX-XXIII		38-48 dias	Alongamento do ducto coclear de $\frac{3}{4}$ de espira para 2 espiras e $\frac{3}{4}$ .
		7-8 sem.	A cápsula ótica torna-se cartilaginosa. Aparecimento das máculas.
		9 sem.	Aparecimento dos outros epitélios sensoriais. Aparecimento dos otolitos.
		24 sem.	Aparece o espaço perilinfático.
<b>Nascimento</b>		38-42 sem.	Fim da maturação coclear.

Adaptado de Anson *et al.*, 1991<sup>12</sup>

## QUA 2

FACTORES DIFUSÍVEIS ENVOLVIDOS NA NEUROGENÉSE DO OUVIDO INTERNO						
FACTOR	MIGRAÇÃO	PROLIFERAÇÃO	SOBREVIVÊNCIA	APOPTOSE	INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO	REFERÊNCIAS
Insulina	nd	+	nd	nd	-	Leon <i>et al.</i> , 1995 <sup>71</sup>
IGF-I	-	+	+	-	+	Leon <i>et al.</i> , 1995 <sup>71</sup>
IGF-II	nd	+	nd	nd	nd	Leon <i>et al.</i> , 1995 <sup>71</sup>
BDNF/TrkB	+	+	+	-	-	Fritzsche <i>et al.</i> , 1998; Farinas <i>et al.</i> 2001 <sup>20,21</sup>
NT3/TrkC	+	+	+	-	+	Fritzsche <i>et al.</i> , 1998 <sup>20</sup>
NGF/p75ntr	nd	-	-	+	nd	Frago <i>et al.</i> , 1998 <sup>72</sup>
FGF2	+	+	+	-	+	Adramska <i>et al.</i> , 2001; Nicholl <i>et al.</i> , 2005 <sup>73,74</sup>
FGF3	+	nd	+	nd	nd	Ladher <i>et al.</i> , 2000 <sup>9</sup>
FGF8	nd	-	nd	nd	nd	Adramska <i>et al.</i> , 2001 <sup>73</sup>
FGF10	-	-	-	-	+	Alsina <i>et al.</i> , 2003 <sup>75</sup>
FGF19	+	nd	nd	nd	+	Ladher <i>et al.</i> , 2000; Sanchez-calderon <i>et al.</i> , 2007 <sup>9,70</sup>

Adaptado de Sanchez-Calderon *et al.*, 2007<sup>70</sup>

Dados obtidos através de ratinhos transgênicos e por experiências *in vitro* utilizando ouvidos internos de ratinho e de pinto. + modulação positiva; - modulação negativa; nd, não determinado.

## GENES ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DO OUVIDO INTERNO DOS MAMÍFEROS

GENES	TIPO DE PROTEÍNA	LOCALIZAÇÃO	MECANISMO DE ACÇÃO OU FENOTIPO DO MUTANTE	REFERÊNCIAS
<b>Atoh1 ou Math1</b>	Factor de transcrição "basic Helix-Loop-Helix (bHLH)"	Epitélio sensorial vestibular e coclear	Indutor da diferenciação das células ciliadas.	Bermingham <i>et al.</i> , 1999 <sup>24</sup>
<b>Barhl1</b>	Factor de transcrição do "homeobox"	Células ciliadas	Manutenção das células ciliadas. Degenerescência progressiva em tempo e espaço das células ciliadas, particularmente das CCE.	Li <i>et al.</i> , 2002 <sup>31</sup>
<b>Brn3a</b>	Factor de transcrição do domínio Pou	Gânglio estato-acústico	Crescimento e migração dos neurónios. Inervação e orientação dos axónios.	Huang <i>et al.</i> , 2001 <sup>15</sup>
<b>Brn3c ou Pou4f3</b>	Factor de transcrição do domínio Pou	Células ciliadas pós-mitóticas	Diferenciação das células Ciliadas. Indução do promotor do BDNF e NT3. Morte precoce das células ciliadas (E18).	Xiang <i>et al.</i> , 1998; Clough <i>et al.</i> , 2004 <sup>28,30</sup>
<b>Brn4</b>	Factor de transcrição do domínio Pou	Mesoderme periótica	Defeito nos fibroblastos do ligamento espiral. Cóclea curta.	Phippard <i>et al.</i> , 1998; Phippard <i>et al.</i> , 1999; Minowa <i>et al.</i> , 1999 <sup>76-78</sup>
<b>Dlx 5</b>	Factor de transcrição do "homeobox"	Parte dorsal do otocisto, CSC, ducto endolinfático	Ausência dos CSC superior e posterior, CSC lateral pequeno, ducto endolinfático e cóclea anormais.	Cantos <i>et al.</i> , 2000 <sup>8</sup>
<b>Eya 1</b>	Coactivador da transcrição	Otocisto ventromedial, epitélio sensorial vestibular e coclear	Ausência de gânglio estatoacústico, ouvido interno amórfico.	Kalatzis <i>et al.</i> , 1998 <sup>79</sup>
<b>FGF3</b>	Factor de crescimento	Rombómeros 5 e 6, placódio, regiões neurogénicas e sensoriais	Ausência do ducto e saco endolinfáticos, gânglios do VIII par pequenos, labirinto membranoso alargado.	Pirvola <i>et al.</i> , 2000 <sup>80</sup>
<b>FGFr2 (IIb)</b>	Receptor do factor de crescimento FGF	Placódio, parede do otocisto, regiões não sensoriais do ouv. Interno	Disgenesia do labirinto membranoso, regiões sensoriais e gânglio do VIIIº rudimentares.	Pirvola <i>et al.</i> , 2000 <sup>80</sup>
<b>Gata3</b>	Factor de transcrição "zinc finger"	Otocisto e cóclea e gânglio espiral	Perda dos neurónios do gânglio espiral.	Lawoko-Kerali <i>et al.</i> , 2002; Lawoko-Kerali <i>et al.</i> , 2004; Lillevali <i>et al.</i> , 2004 <sup>81-83</sup>
<b>GFI1</b>	Factor de crescimento	Células ciliadas e neurónios	Diferenciação e sobrevivência das células ciliadas. Degenerescência das células ciliadas período pós-natal precoce.	Wallis <i>et al.</i> , 2003 <sup>29</sup>
<b>Hes1</b>	Factor de transcrição bHLH	Epitélios sensitivos da cóclea e vestibulo	Histogénese do ouvido interno. Efecto do sistema de sinalização Notch.	Zine <i>et al.</i> , 2001 <sup>27</sup>
<b>Hes5</b>	Factor de transcrição bHLH	Epitélios sensitivos da cóclea e vestibulo	Histogénese do ouvido interno. Efecto do sistema de sinalização Notch.	Zine <i>et al.</i> , 2001 <sup>27</sup>
<b>Hoxa1 e Hoxa1/b1</b>	Factores de transcrição do "homeobox"	Rombómeros 3 e 4 no E8	Ausência do ducto e saco endolinfáticos, gânglio reduzido, ouvido interno amórfico.	Cantos <i>et al.</i> , 2000; Sanchez-Calderon <i>et al.</i> , 2007 <sup>8,70</sup>
<b>Hoxa2</b>	Factor de transcrição do "homeobox"	Rombómeros 1, 2, 3 e 5	Labirinto membranoso aumentado, ausência de rampa vestibular.	Cantos <i>et al.</i> , 2000 <sup>8</sup>
<b>Kreisler</b>	Factor de transcrição do "bZIP"	Rombómeros 5 e 6	Má localização do otocisto, ouvido interno cístico.	Rinkwitz <i>et al.</i> , 2001 <sup>6</sup>
<b>Ngn1</b>	Factor de transcrição bHLH	Região anteroventrolateral do otocisto	Ausência de gânglio do VIII par, Fusão dos sáculo e utrículo, cóclea curta.	Ma <i>et al.</i> , 2000 <sup>19</sup>
<b>NeuroD</b>	Factor de transcrição bHLH	Neurónios e epitélios sensoriais	Sobrevivência dos neurónios. Perda dos neurónios sensitivos, principalmente os cocleares.	Liu <i>et al.</i> , 2000 e 2001 <sup>84,85</sup>
<b>Otx1</b>	Factor de transcrição	Parede lateral do otocisto, CSC lateral e ampola, sáculo e cóclea	Ausência do CSC lateral e ampola, fusão do sáculo e utrículo e malformação do sáculo e ducto coclear.	Morsli <i>et al.</i> , 1999 <sup>86</sup>
<b>Otx2</b>	Factor de transcrição	Extremidade ventral do otocisto, parede lateral do sáculo e cóclea	Potencia o efeito das malformações devidas à alteração do gene Otx1.	Morsli <i>et al.</i> , 1999 <sup>86</sup>
<b>Pax2</b>	Factor de transcrição da "paired-box"	Parede do otocisto, ducto e saco endolinfático e cóclea	Agenesia do ducto coclear e gânglio espiral.	Rinkwitz-Brandt <i>et al.</i> , 1996; Torres <i>et al.</i> , 1996 <sup>87,88</sup>
<b>Pax3</b>	Factor de transcrição da "paired-box"	Metade dorsal do tubo neural	Malformações do ducto e saco endolinfáticos, da cóclea e do vestibulo.	Cantos <i>et al.</i> , 2000; Sanchez-Calderon <i>et al.</i> , 2007 <sup>6,8</sup>
<b>Sox2</b>	Factor de transcrição	Primórdios dos epitélios sensoriais	Actua a montante do gene Atoh1/Math1. Inexistência dos domínios prosensoriais implicando a ausência total de células ciliadas e de suporte.	Kiernan <i>et al.</i> <sup>22</sup>

Adaptado de Cantos *et al.*, 2000 e Sanchez-Calderon *et al.*, 2007<sup>8,70</sup>



**BIBLIOGRAFIA**

1. Manley, GA: *Cochlear mechanisms from a phylogenetic viewpoint*. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(22): 11736-43 (2000).
2. Rubel, EW and Fritzsche, B: *Auditory system development: primary auditory neurons and their targets*. Annu Rev Neurosci, 25: 51-101 (2002).
3. Morsli, H, et al.: *Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs*. J Neurosci, 18(9): 3327-35 (1998).
4. Whitehead, MC, *Development of the cochlea., in Neurobiology of hearing: The cochlea*, R.A. Altschuler, Hoffman, D.W., Bobbin, R.P., Editor. 1986, Raven Press: New York.
5. Bissonnette, JP and Fekete, DM: *Standard atlas of the gross anatomy of the developing inner ear of the chicken*. J Comp Neurol, 368(4): 620-30 (1996).
6. Rinkwitz, S, Bober, E, and Baker, R: *Development of the vertebrate inner ear*. Ann N Y Acad Sci, 942: 1-14 (2001).
7. Pujol, R and Uziel, A, *Auditory development: peripheral aspect., in Handbook of Human Growth and Developmental Biology.*, E. Meisami, Timiras, P.S., Editor. 1988, CRC Press, Inc.: Boca Raton. p. 109-130.
8. Cantos, R, et al.: *Patterning of the mammalian cochlea*. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(22): 11707-13 (2000).
9. Ladher, R, et al.: *Identification of synergistic signals initiating inner ear development*. Science, 290: 1965-7 (2000).
10. Nikolic, P, et al.: *Apoptosis in the developing rat cochlea and its related structures*. Brain Res Dev Brain Res, 119(1): 75-83 (2000).
11. Frenz, DA, et al.: *Transforming growth factor beta 1 is an epithelial-derived signal peptide that influences otic capsule formation*. Dev Biol, 153(2): 324-36 (1992).
12. Anson, BJ, Davies, J, and Duckert, LG, *Embryology of the ear, in Otolaryngology*, M. Paparella, Editor. 1991, W. B. Saunders company. p. 3-21.
13. Fritzsche, B: *Development of inner ear afferent connections: forming primary neurons and connecting them to the developing sensory epithelia*. Brain Res Bull, 60(5-6): 423-33 (2003).
14. Sher, AE: *The embryonic and postnatal development of the inner ear of the mouse*. Acta Otolaryngol Suppl, 285: 1-77 (1971).
15. Huang, EJ, et al.: *Brn3a is a transcriptional regulator of soma size, target field innervation and axon pathfinding of inner ear sensory neurons*. Development, 128(13): 2421-32 (2001).
16. Pujol, R, Lavigne-Rebillard, M, and Lenoir, M, *Development of sensory and neural structures in the mammalian cochlea.*, in Auditory Function: Neurobiological bases of hearing, G.M. Edelman, Gall, W.E., Cowans, W. M., Editor. 1998, John Wiley: New York. p. 146-174.
17. Mayordomo, R, Rodriguez-Gallardo, L., Alvares, I. S.: *Morphological and quantitative study of the neural tube in chick embryos suggest a neuroectodermal origin for the otic placode*. J. Anat., 193: 35-48 (1998).
18. D'Amico-Martel, A, Nodem, D. M.: *Contribution of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia*. Am. J. Anat., 166: 445-468 (1983).
19. Ma, Q, Anderson, DJ, and Fritzsche, B: *Neurogenin 1 null mutant ears develop fewer, morphologically normal hair cells in smaller sensory epithelia devoid of innervation*. J Assoc Res Otolaryngol, 1(2): 129-43 (2000).
20. Fritzsche, B, Barbacid, M, and Silos-Santiago, I: *The combined effects of trkB and trkC mutations on the innervation of the inner ear*. Int J Dev Neurosci, 16(6): 493-505 (1998).
21. Farinas, I, et al.: *Spatial shaping of cochlear innervation by temporally regulated neurotrophin expression*. J Neurosci, 21(16): 6170-80 (2001).
22. Kiernan, AE, et al.: *Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear*. Nature, 434(7036): 1031-5 (2005).
23. Chen, P and Segil, N: *p27(Kip1) links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti*. Development, 126(8): 1581-90 (1999).
24. Bermingham, NA, et al.: *Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells*. Science, 284(5421): 1837-41 (1999).
25. Adam, J, et al.: *Cell fate choices and the expression of Notch, Delta and Serrate homologues in the chick inner ear: parallels with Drosophila sense-organ development*. Development, 125(23): 4645-54 (1998).
26. Zheng, JL, et al.: *Hes1 is a negative regulator of inner ear hair cell differentiation*. Development, 127(21): 4551-60 (2000).
27. Zine, A, et al.: *Hes1 and Hes5 activities are required for the normal development of the hair cells in the mammalian inner ear*. J Neurosci, 21(13): 4712-20 (2001).
28. Xiang, M, et al.: *Requirement for Brn-3c in maturation and survival, but not in fate determination of inner ear hair cells*. Development, 125(20): 3935-46 (1998).
29. Wallis, D, et al.: *The zinc finger transcription factor Gfi1, implicated in lymphomagenesis, is required for inner ear hair cell differentiation and survival*. Development, 130(1): 221-32 (2003).
30. Clough, RL, et al.: *Brn-3c (POU4F3) regulates BDNF and NT-3 promoter activity*. Biochem Biophys Res Commun, 324(1): 372-81 (2004).
31. Li, S, et al.: *Hearing loss caused by progressive degeneration of cochlear hair cells in mice deficient for the Barhl1 homeobox gene*. Development, 129(14): 3523-32 (2002).
32. Ruben, RJ: *Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses*. Acta Otolaryngol: Suppl 220:1-44 (1967).
33. Denman-Johnson, K and Forge, A: *Establishment of hair bundle polarity and orientation in the developing vestibular system of the mouse*. J Neurocytol, 28(10-11): 821-35 (1999).
34. Gale, JE, et al.: *FM1-43 dye behaves as a permeant blocker of the hair-cell mechanotransducer channel*. J Neurosci, 21(18): 7013-25 (2001).
35. Zine, A and Romand, R: *Development of the auditory receptors of the rat: a SEM study*. Brain Res, 721(1-2): 49-58 (1996).
36. Hudspeth, AJ: *How the ear's works work*. Nature, 341(6241): 397-404 (1989).
37. Hudspeth, AJ: *How hearing happens*. Neuron, 19(5): 947-50 (1997).

38. Geleoc, GS and Holt, JR: *Developmental acquisition of sensory transduction in hair cells of the mouse inner ear*. Nat Neurosci, 6(10): 1019-20 (2003).
39. Schneider, ME, et al.: *Rapid renewal of auditory hair bundles*. Nature, 418(6900): 837-8 (2002).
40. Zhu, M, et al.: *Mutations in the gamma-actin gene (ACTG1) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26)*. Am J Hum Genet, 73(5): 1082-91 (2003).
41. Kelley, MW: *Hair cell development: commitment through differentiation*. Brain Res, 1091(1): 172-85 (2006).
42. Echterler, SM, Magardino, T, and Rontal, M: *Spatiotemporal patterns of neuronal programmed cell death during postnatal development of the gerbil cochlea*. Brain Res Dev Brain Res, 157(2): 192-200 (2005).
43. Echterler, SM and Nofsinger, YC: *Development of ganglion cell topography in the postnatal cochlea*. J Comp Neurol, 425(3): 436-46 (2000).
44. Pujol, R and Hilding, D: *Anatomy and physiology of the onset of auditory function*. Acta Otolaryngol, 76(1): 1-10 (1973).
45. Lenoir, M, Shneron, A, and Pujol, R: *Cochlear receptor development in the rat with emphasis on synaptogenesis*. Anat Embryol (Berl), 160(3): 253-62 (1980).
46. Roth, B and Bruns, V: *Postnatal development of the rat organ of Corti. I. General morphology, basilar membrane, tectorial membrane and border cells*. Anat Embryol (Berl), 185(6): 559-69 (1992).
47. Roth, B and Bruns, V: *Postnatal development of the rat organ of Corti. II. Hair cell receptors and their supporting elements*. Anat Embryol (Berl), 185(6): 571-81 (1992).
48. Uziel, A, Romand, R, and Marot, M: *Development of cochlear potentials in rats*. Audiology, 20(2): 89-100 (1981).
49. Ito, M, Spicer, SS, and Schulte, BA: *Cytological changes related to maturation of the organ of Corti and opening of Corti's tunnel*. Hear Res, 88(1-2): 107-23 (1995).
50. Muller, M: *Developmental changes of frequency representation in the rat cochlea*. Hear Res, 56(1-2): 1-7 (1991).
51. Romand, R: *Modification of tonotopic representation in the auditory system during development*. Prog Neurobiol, 51(1): 1-17 (1997).
52. Echterler, SM, Arjmand, E, and Dallos, P: *Developmental alterations in the frequency map of the mammalian cochlea*. Nature, 341(6238): 147-9 (1989).
53. Rybak, LP, Weberg, A, and Whitworth, C: *Development of the stria vascularis in the rat*. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 53(2): 72-7 (1991).
54. Fernandez, C and Hinojosa, R: *Postnatal development of endocochlear potential and stria vascularis in the cat*. Acta Otolaryngol, 78(3-4): 173-86 (1974).
55. Kikuchi, K and Hilding, DA: *The development of the stria vascularis in the mouse*. Acta Otolaryngol, 62(4): 277-91 (1966).
56. Sagara, T, et al.: *Differentiation of the rat stria vascularis*. Hear Res, 83(1-2): 121-32 (1995).
57. Santos-Sacchi, J: *An electronmicroscopic study of microtubules in the development of marginal cells of the mouse stria vascularis*. Hear Res, 6(1): 7-13 (1982).
58. Simmons, DD: *A transient afferent innervation of outer hair cells in the postnatal cochlea*. Neuroreport, 5(11): 1309-12 (1994).
59. Cole, KS and Robertson, D: *Early efferent innervation of the developing rat cochlea studied with a carbocyanine dye*. Brain Res, 575(2): 223-30 (1992).
60. Echterler, SM: *Developmental segregation in the afferent projections to mammalian auditory hair cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 89(14): 6324-7 (1992).
61. Mou, K, et al.: *Synergistic effects of BDNF and NT-3 on postnatal spiral ganglion neurons*. J Comp Neurol, 386(4): 529-39 (1997).
62. Kiang, NY, et al.: *Hair-cell innervation by spiral ganglion cells in adult cats*. Science, 217(4555): 175-7 (1982).
63. Berglund, AM and Ryugo, DK: *Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse*. J Comp Neurol, 255(4): 560-70 (1987).
64. Schwartz, AM, Parakkal, M, and Gulley, RL: *Postnatal development of spiral ganglion cells in the rat*. Am J Anat, 167(1): 33-41 (1983).
65. Lavigne-Rebillard, M and Pujol, R: *Surface aspects of the developing human organ of Corti*. Acta Otolaryngol Suppl, 436: 43-50 (1987).
66. Puel, JL and Uziel, A: *Correlative development of cochlear action potential sensitivity, latency, and frequency selectivity*. Brain Res, 465(1-2): 179-88 (1987).
67. Pujol, R, Carlier, E, and Lenoir, M: *Ontogenetic approach to inner and outer hair cell function*. Hear Res, 2(3-4): 423-30 (1980).
68. Beutner, D and Moser, T: *The presynaptic function of mouse cochlear inner hair cells during development of hearing*. J Neurosci, 21(13): 4593-9 (2001).
69. Uziel, A, Marot, M., Germain, M: *Les potentielles évoque du tronc cérébral chez le nouveau-né et l'enfant*. Rev. Laryngol. Otol. Rhinol., 101: 55-59 (1980).
70. Sanchez-Calderon, H, et al.: *A network of growth and transcription factors controls neural differentiation and survival in developing ear*. Int J Dev Biol, 51: 557-70 (2007).
71. Leon, Y, et al.: *Insulin-like growth factor-I regulates cell proliferation in the developing inner ear, activating glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis and Fos expression*. Endocrinology, 136(8): 3494-503 (1995).
72. Frago, LM, et al.: *Nerve growth factor and ceramides modulate cell death in the early developing inner ear*. J Cell Sci, 111: 549-56 (1998).
73. Adamska, M, et al.: *FGFs control the patterning of the inner ear but are not able to induce the full ear program*. Mech Dev, 109(2): 303-13 (2001).
74. Nicholl, AJ, et al.: *Differentiation of an auditory neuronal cell line suitable for cell transplantation*. Eur J Neurosci, 22(2): 343-53 (2005).
75. Alsina, B, Giraldez, F, and Varela-Nieto, I: *Growth factors and early development of otic neurons: interactions between intrinsic and extrinsic signals*. Curr Top Dev Biol, 57: 177-206 (2003).

76. Phippard, D, et al.: *Changes in the subcellular localization of the Brn4 gene product precede mesenchymal remodeling of the otic capsule*. Hear Res, 120(1-2): 77-85 (1998).
77. Phippard, D, et al.: *Targeted mutagenesis of the POU-domain gene Brn4/Pou3f4 causes developmental defects in the inner ear*. J Neurosci, 19(14): 5980-9 (1999).
78. Minowa, O, et al.: *Altered cochlear fibrocytes in a mouse model of DFNB3 nonsyndromic deafness*. Science, 285(5432): 1408-11 (1999).
79. Kalatzis, V, et al.: *Eya1 expression in the developing ear and kidney: towards the understanding of the pathogenesis of Branchio-Oto-Renal (BOR) syndrome*. Dev Dyn, 213(4): 486-99 (1998).
80. Pirvola, U, et al.: *FGF/FGFR-2(IIIb) signaling is essential for inner ear morphogenesis*. J Neurosci, 20(16): 6125-34 (2000).
81. Lillevali, K, et al.: *Partially overlapping expression of Gata2 and Gata3 during inner ear development*. Dev Dyn, 231(4): 775-81 (2004).
82. Lawoko-Kerali, G, et al.: *Ventral otic cell lines as developmental models of auditory epithelial and neural precursors*. Dev Dyn, 231(4): 801-14 (2004).
83. Lawoko-Kerali, G, Rivolta, MN, and Holley, M: *Expression of the transcription factors GATA3 and Pax2 during development of the mammalian inner ear*. J Comp Neurol, 442(4): 378-91 (2002).
84. Liu, M, et al.: *Essential role of BETA2/NeuroD1 in development of the vestibular and auditory systems*. Genes Dev, 14(22): 2839-54 (2000).
85. Kim, WY, et al.: *NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development*. Development, 128(3): 417-26 (2001).
86. Morsli, H, et al.: *Otx1 and Otx2 activities are required for the normal development of the mouse inner ear*. Development, 126(11): 2335-43 (1999).
87. Torres, M, Gomez-Pardo, E, and Gruss, P: *Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory*. Development, 122(11): 3381-91 (1996).
88. Rinkwitz-Brandt, S, Arnold, HH, and Bober, E: *Regionalized expression of Nkx5-1, Nkx5-2, Pax2 and sek genes during mouse inner ear development*. Hear Res, 99(1-2): 129-38 (1996).