Rodrigo Salazar da Silva

Análise de expressão de gene candidato à surdez em modelos animais

Expression analysis of deafness candidate gene in animal models

São Paulo

2017

Rodrigo Salazar da Silva

Análise de expressão de gene candidato à surdez em modelos animais

Expression analysis of deafness candidate gene in animal models

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

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

São Paulo

2017

Dados catalográficos

Salazar da Silva, Rodrigo

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

108 páginas

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

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

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).	Prof(a). Dr(a).
Prof(a). Dr(a).	Prof(a). Dr(a).

Regina Célia Mingroni Netto

Orientadora

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

Ayrton Senna

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Aos alunos da Profa. Mariz Vainzof pela receptividade em seu laboratório. Em especial à Camila, por toda a paciência dispendida para me ensinar e auxiliar com os experimentos de qRT-PCR.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Índice geral

Introdução 13

1. Heterogeneidade genética da surdez hereditária em humanos 13
2. Fisiologia do sistema auditivo de vertebrados 15
3. O desenvolvimento embrionário da orelha interna de vertebrados 16
4. Modelos animais para o estudo de surdez hereditária: morfologia dos sistemas mecanossensoriais da audição 18
5. O papel do camundongo e do *zebrafish* nos estudos sobre surdez hereditária 22
6. *NCOA3* é gene candidato a explicar surdez em família brasileira 25
7. A família gênica SRC: estrutura e funções de seus integrantes 30

Objetivos 35

Materiais e métodos 36

1. Animais 36
2. RT-PCR e qRT-PCR de cóclea, de órgão de Corti associado à estria vascular e de músculo de camundongo 37
3. Ensaios de imunofluorescência em cortes histológicos de músculo e de cóclea de camundongo 41
4. Hibridação in situ em animal inteiro em *zebrafish* 42
5. Edição gênica por meio do sistema CRISPR/Cas9 44

Resultados 52

1. Análise da expressão de RNAm de *Ncoa3* na cóclea de camundongo 52
2. Expressão da proteína NCOA3 na cóclea de camundongo por meio de ensaio de imunofluorescência 57
3. Análise da expressão de RNAm de *ncoa3* em *zebrafish* por meio de hibridação *in situ* em animal inteiro 71
4. Edição gênica do gene *ncoa3* pelo sistema CRISPR/Cas9 em *zebrafish* 75

Discussão 81

1. Caracterização da expressão do RNAm e da proteína do gene *Ncoa3* no sistema auditivo de camundongo 81
2. Caracterização da expressão do RNAm do gene *ncoa3* nos sistemas mecanossensoriais de *zebrafish* 84
3. Utilização do sistema CRISPR/Cas9 para edição gênica de *ncoa3* em *zebrafish* 85
4. Os possíveis papéis de *NCOA3* no sistema auditivo 88

Perspectivas futuras 97

Conclusões 99

Referências bibliográficas 100

Lista de abreviaturas e siglas

Actb- do inglês, *Actin Beta*

AMPc- do inglês, *Cyclic Adenosin Monophosphate*

AP- Antero-posterior

BCIP- 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato

BDNF- do inglês, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

BED- do inglês, *Browser Extensible Data*

bHLH- do inglês, *basic-Helix-Loop-Helix*

BMP- do inglês, *Bone Morphogenetic Protein*

BSA- do inglês, *Bovine Serum Albumin*

B2m- do inglês, *Beta-2 Microglobulin*

cDNA- do inglês, *complementary DNA*

CEGH-CEL- Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco

CRISPR- do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CSL- do inglês, *CBF1/Suppressor of Hairless/LAG-1*

Ct- do inglês, *Cicle Threshold*

DIAPH3- do inglês, *Diaphanous Related Formin 3*

DNA- do inglês, *Deoxyribonucleotide Acid*

DNAse- Deoxirribonuclease

dNTP- do inglês, *Deoxyribonucleotide Triphosphates*

dpf- Dias Pós-Fertilização

DIG- Digoxigenina

DV- Dorsoventral

ERs- do inglês, *Estrogen Receptor*

FGF- do inglês, *Fibroblast Growth Factor*

GPCR- do inglês, *G-Protein Coupled Receptor*

GWAS- do inglês, *Genomic Wide Association Studies*

hpf- Horas Pós-Fertilização

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMPC- do inglês, *International Mouse Phenotyping Consortium*

MAPK- do inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MAML- do inglês, *Mastermind-like*

NBT- 4-nitrozaul de tetrazólio

NCBI- do inglês, *National Human Genome Research Institute*

NCID- do inglês, *Notch Intracellular Domain*

NCOA3- do inglês, *Nuclear Receptor Coactivator 3*

NRID- do inglês, *Nuclear Receptor Interacting Domain*

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

PAM- do inglês, *Protospacer Adjacent Motif*

PAS- do inglês, *basic Helix-Loop-Helix-Per/ARNT/Sim*

PEATE- Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico

PBS- do inglês, *Phosphate Buffered Saline*

PCR- do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

PKA- do inglês, *Protein Kinase A*

PPR- do inglês, *Prepaclodal Region*

P4,P10,P...- do inglês, *Postnatal Day* 4, 10, ...

PREX1- do inglês, *Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate Dependent Rac Exchange Factor 1*

qRT-PCR- do inglês, *Reverse Transcription Real-Time Polymerase Chain Reaction*

RNA- do inglês, *Ribonucleotide Acid*

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

RUNX2- do inglês, *Runt Related Transcription Factor 2*

SEMG1- do inglês, *Semenogelin 1*

sgRNA- do inglês, *small guide RNA*

SHH- do inglês, *Sonic Hedgehog*

SHIELD- do inglês, *Shared Harvard Inner Ear Laboratory Database*

spf- Semanas Pós-Fertilização

SRC- do inglês, *Steroid Receptor Coactivator*

SSC- do inglês, *Sodium Saline Citrate*

Wnt- do inglês, *Wingless/Int*

Resumo

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

Abstract

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

Introdução

1. Heterogeneidade genética da surdez hereditária em humanos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Fisiologia do sistema auditivo de vertebrados

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

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

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

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

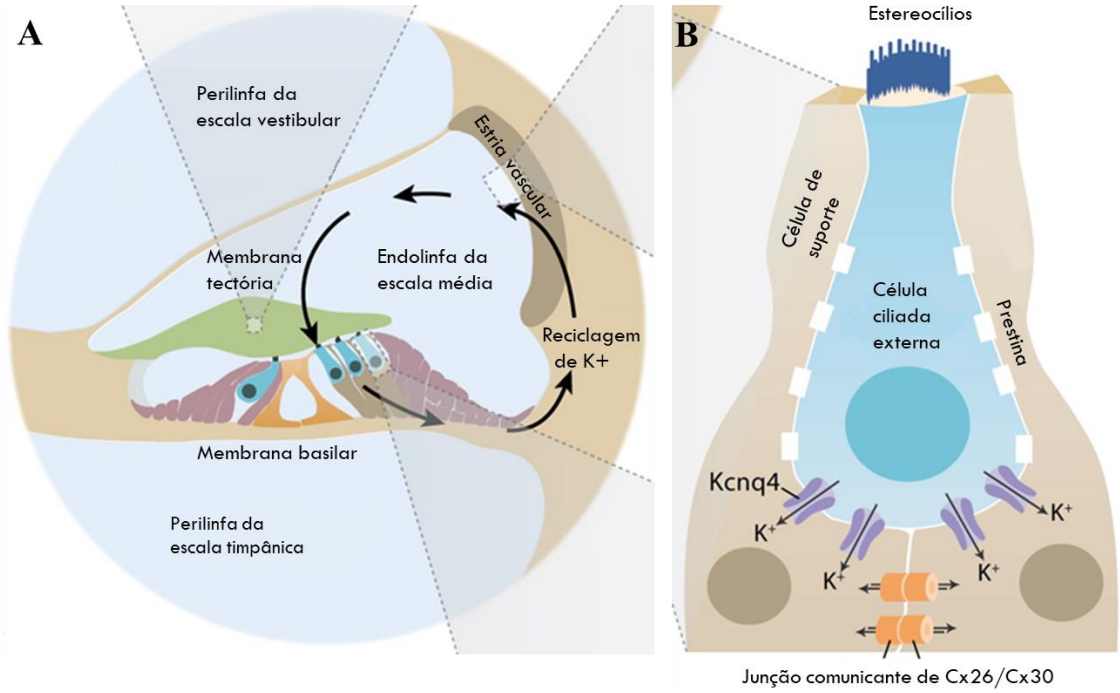


Figura 1 – Esquema representando a reciclagem de íons potássio na orelha interna de mamífero. (a) Seção longitudinal de um giro da orelha interna de camundongo, mostrando o caminho de reciclagem dos íons K^+. (b) Esquema de uma única célula ciliada (em azul), vizinha a duas células de suporte (marrom).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

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

3. O desenvolvimento embrionário da orelha interna de vertebrados

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

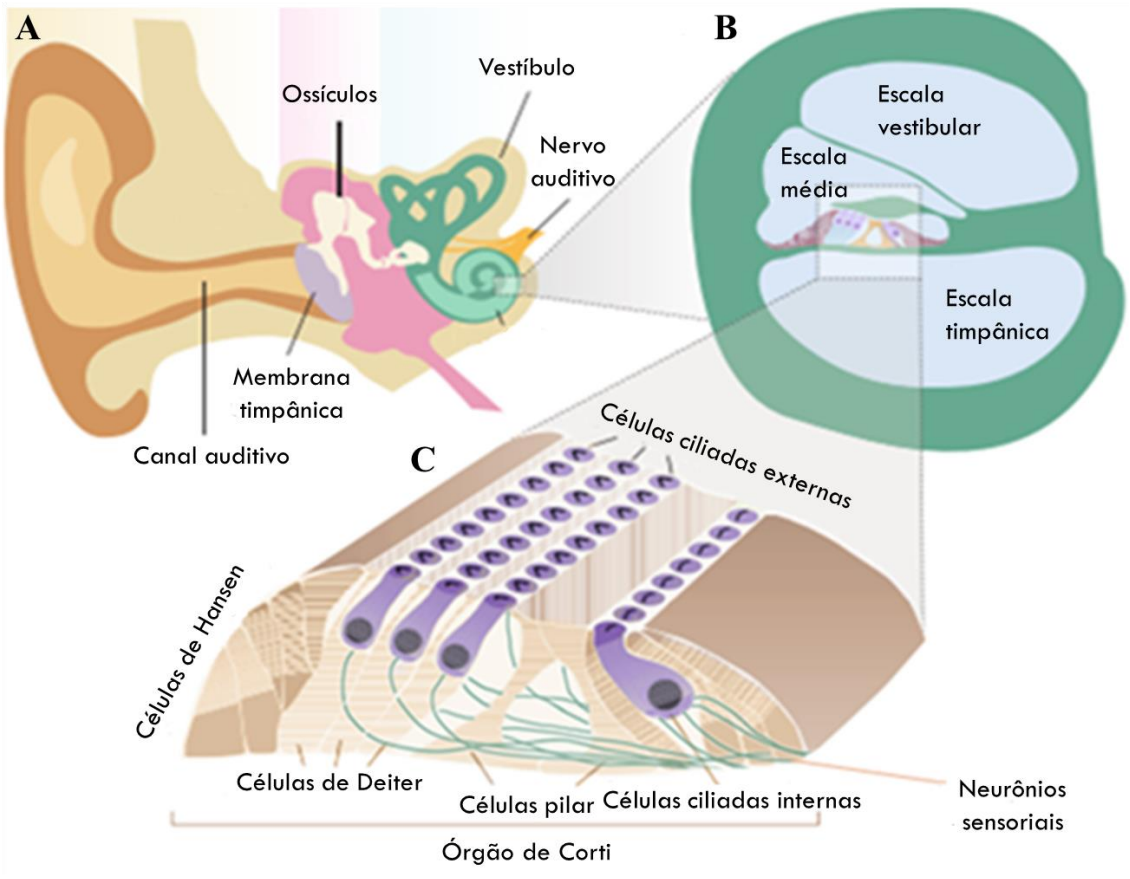


Figura 2 – Representação da orelha de mamífero. (A) Divisão do aparelho auditivo em orelhas externa, média e interna. (B) Seção longitudinal da cóclea, mostrando os três compartimentos que a formam, preenchidos por fluidos. (C) Seção longitudinal do órgão de Corti e seus tipos celulares. Figura modificada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

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

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

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

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

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

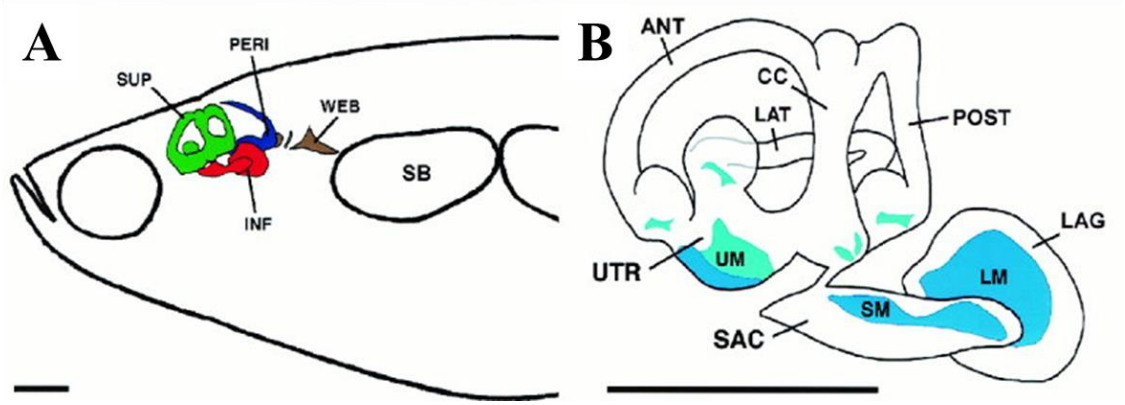


Figura 3 - Representação da orelha de *zebrafish* adulto. (a) Esquema da orelha interna de *zebrafish* em visão lateral. (b) Esquema mais detalhado da orelha interna em visão lateral, sem a representação dos ossículos de Weber. ANT= Canal semicircular anterior, CC= *common crus*, INF= *Pars inferior*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

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

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

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

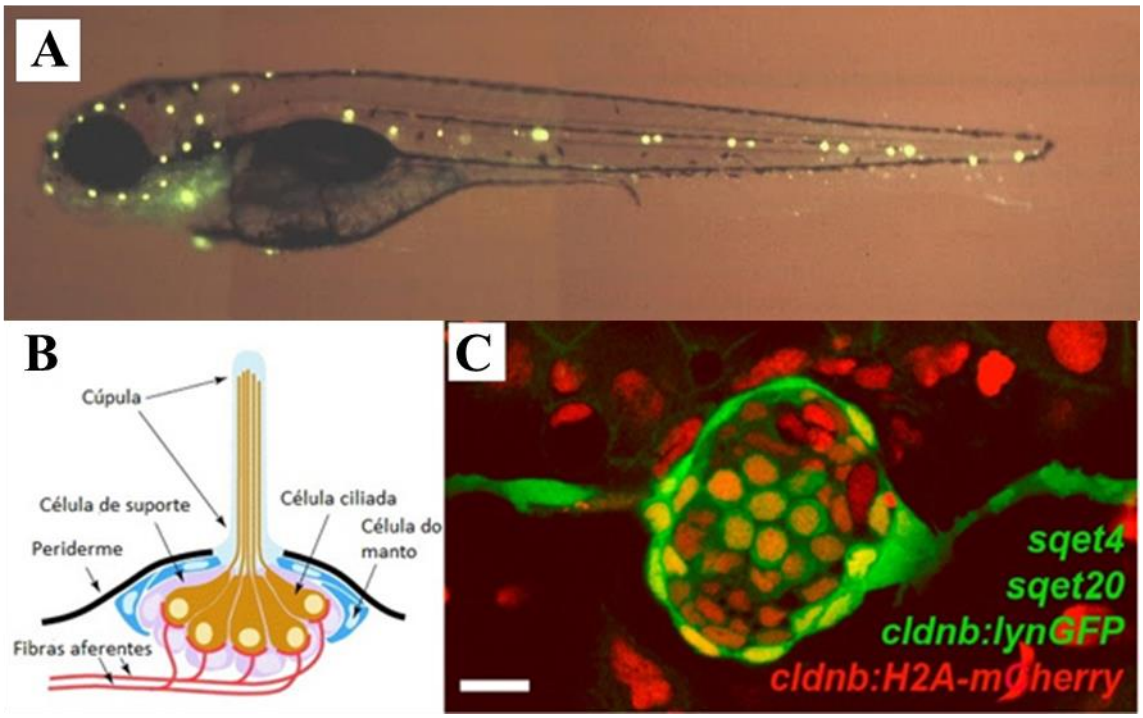


Figura 4 - Fotos e esquemas da linha lateral e dos neuromastos de *zebrafish*. (a) Visão lateral de larva de *zebrafish* 5dpf, com neuromastos marcados com corante vital DASPEI. (b) Esquema de seção longitudinal do neuromasto de *zebrafish*, mostrando os diferentes tipos celulares que o compõem. (c)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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. *NCOA3* é gene candidato a explicar a surdez em família brasileira

Por meio de estudos de ligação seguidos de triagem de mutações em genes candidatos (Lezirovitz, *et al.*, 2009; Lezirovitz *et al.*, 2012) ou por meio de sequenciamento de nova geração de exomas de indivíduos de grandes famílias com perda auditiva (Dantas, 2013), nosso laboratório têm procurado identificar novos tipos de mutação e novos genes candidatos para explicar a surdez, para alguns dos quais ainda falta validação funcional.

Foi identificada uma família brasileira (Figura 5), proveniente do estado de São Paulo, com 15 afetados por perda auditiva neurossensorial não-sindrômica, bilateral, de grau moderado a profundo, com idade de manifestação variando desde 4 até os 35 anos de idade (idade de manifestação média de 12,3 anos). Desta família foram coletadas amostras de 19 indivíduos (7 afetados e 12 fenotipicamente normais, incluindo cônjuges), com as quais estudos de ligação foram realizados. O sequenciamento massivo em paralelo do exoma de amostras de dois indivíduos afetados também foi realizado (Dantas, 2013). Na tabela 5 está apresentado um resumo dos achados audiológicos da família.

Identificação do paciente	Afetado ou não afetado	Grau de perda auditiva	Idade de avaliação da audição	Idade de manifestação	Genótipo em relação à variante do gene *NCOA3*
III-5	Afetado	Moderado a profundo	48 anos	8 anos	+/-
III-8	Afetado	Profunda	40 anos	35 anos	+/-
III-10	Afetado	Moderado a profundo	45 anos	20 anos	+/-
IV-6	Afetado	Moderado	24 anos	7 anos	+/-
IV-9	Afetado	Moderado a grave	22 anos	6 anos	+/-
IV-21	Afetado	Moderado	8 anos	6 anos	+/-
IV-22	Afetado	Moderado	4 anos	4 anos	+/-
II-4	Não afetado	-	-	-	-/-
IV-5	Não afetado	Limítrofe em alta frequência	27 anos	-	-/-
IV-12	Não afetado	Limítrofe em alta frequência	26 anos	-	-/-
IV-15	Não afetado	-	20 anos	-	-/-
IV-17	Não afetado	-	15 anos	-	-/-
IV-18	Não afetado	Perda em alta frequência	11 anos	-	-/-
IV-19	Não afetado	-	8 anos	-	-/-
IV-20	Não afetado	-	11 anos	-	-/-
V-3	Não afetado	-	3 anos	-	-/-
V-5	Não afetado	-	5 anos	-	-/-
V-6	Não afetado	-	4 anos	-	-/-

Tabela 5 - Resumo dos achados clínicos sobre a audição dos indivíduos analisados da família e seus respectivos genótipos em relação à variante no gene *NCOA3*. Alta frequência= 6000 Hz, +/-= Heterozigoto, -/-= Homozigoto selvagem.

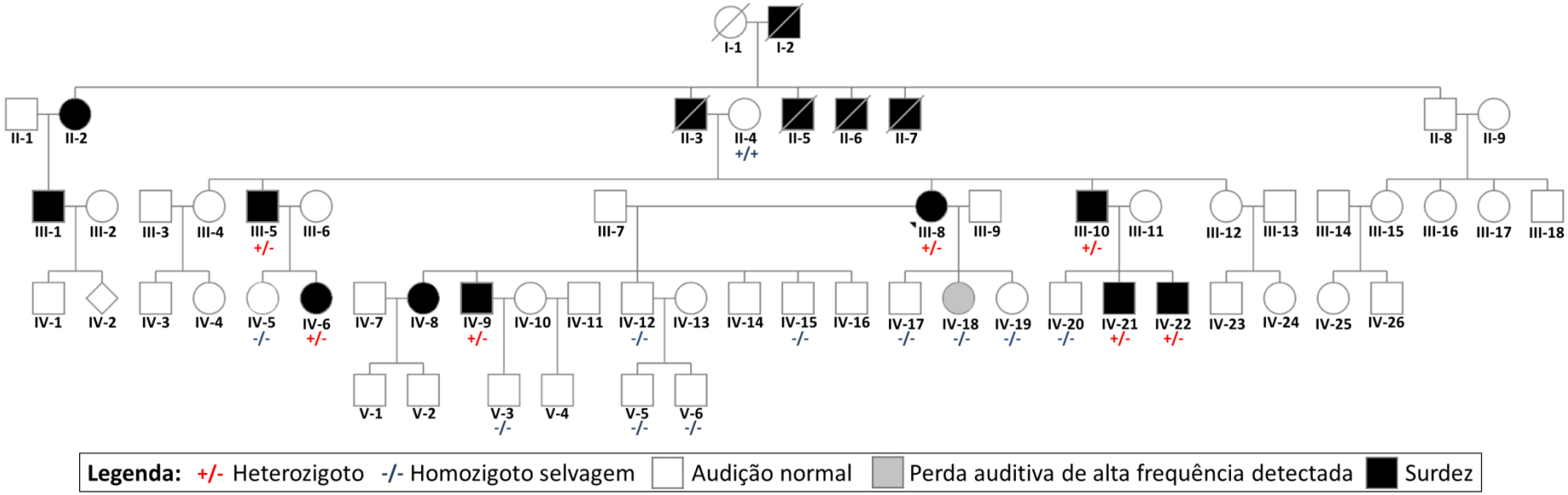


Figura 5 - Heredograma da família estudada por Dantas (2013), mostrando os indivíduos analisados e seus respectivos genótipos em relação à variante c.C2195G no gene *NCOA3*.

O estudo de ligação foi realizado com dados gerados por meio de varredura genômica em *array* de 50k (50.000 SNPs) da *Affymetrix*, em 7 indivíduos afetados. Os valores de *LOD score* foram calculados com o programa Merlin (Abecassis *et al.*, 2002), revelando uma região candidata no cromossomo 20 como tendo maior probabilidade de segregar com o fenótipo de surdez (*LOD score*= +1,8), considerando o modelo de herança autossômico dominante e penetrância completa. Uma análise de ligação feita subsequentemente com 12 marcadores do tipo microssatélite, mapeados no cromossomo 20, revelou uma região candidata de 29,04cM (20: 37.552.294 – 52.953.811). Esta região contém 127 genes, sendo treze destes expressos na cóclea e um no gânglio vestibulococlear.

Foi realizado sequenciamento massivo em paralelo do exoma com o *Nextera rapid Capture Kit* (Illumina), no equipamento Hi-Seq 2500 (Illumina). Foram identificadas 9197 variantes comuns a ambos os indivíduos e em heterozigose. Após uma série de etapas de filtragem que se encontra em mais detalhes na tabela 6, passaram pelos critérios de seleção apenas 192 variantes, sendo que apenas três variantes de sentido trocado se encontram na região de *lod score* positivo no cromossomo 20: PREX1 (do inglês, *Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate Dependent Rac Exchange Factor 1*), c.A1727G: p.Q576R; SEMG1 (do inglês, *Semenogelin 1*), c.A934C: p.S312R; e NCOA3 (do inglês, *Nuclear Receptor Coactivator 3)*, c.C2195G: p.S732C. Estudos de segregação mostraram que apenas a variante no gene *NCOA3* segrega com o fenótipo de surdez na família. Em genes previamente relacionados à surdez hereditária, foi detectada somente uma mutação de sentido trocado (c.A1565G: p.Q522R) no gene *DIAPH3* (do inglês, *Diaphanous related formin 3*), mas no cromossomo 13. Porém, a mutação foi investigada e observou-se que ela não segrega com o fenótipo de surdez na família na tabela 5 e na figura 5.

Etapas	Variantes
Variantes em comum (19292 e 19292R) e em heterozigose	9197
Excluindo variantes com baixa qualidade	9193
Excluindo variantes com frequência > 1% nas amostras controle*	553
Excluindo variantes com frequência > 1% em bancos de dados de variantes**	350
Considerando apenas variantes em autossomos	349
Excluindo variantes em genes hipervariáveis***	302
Excluindo variantes sinônimas	192
Considerando apenas variantes no cromossomo 20	3
Considerando apenas variantes na região de *LOD score* positivo	1

Tabela 6 - Etapas de filtragem de variantes provenientes do sequenciamento massivo em paralelo do exoma de dois indivíduos afetados da família estudada por Dantas (2013). *= 66 amostras controle que foram sequenciadas no mesmo procedimento. **= Bancos de dados *1000 genomes*, *NHLBI Exome Sequencing Project*, *Online Archive of Brazilian Mutations*. ***= Conforme descrito no trabalho de Fajardo *et al.* (2013).

Segundo o banco de dados ENSEMBL (http://www.ensembl.org/index.html), o gene *NCOA3* tem tamanho aproximado de 155kb; possui 23 exons, dos quais 21 são codificantes; e codifica uma proteína com 1420 aminoácidos, cuja principal função é regular positivamente a transcrição gênica mediada por receptores nucleares. A mutação encontrada na família acima está presente no exon 15 do gene (Figura 6B), afetando uma região sem domínio caracterizado na proteína (Figura 6B). Além disso, esta mutação nunca foi descrita em bancos de dados como *1000 genomes* (http://www.internationalgenome.org/), e é considerada potencialmente patogênica (*score*= 90,5%) pelo programa PolyPhen2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), causadora de doença (*score*= 84,5%) pelo programa Mutation Taster (http://www.mutationtaster.org/), e danosa (*score*= 0,030) pelo programa SIFT (http://sift.jcvi.org/). Os genótipos dos indivíduos dos indivíduos analisados no estudo de Dantas (2013) em relação ao alelo mutado de *NCOA3* estão apresentados.

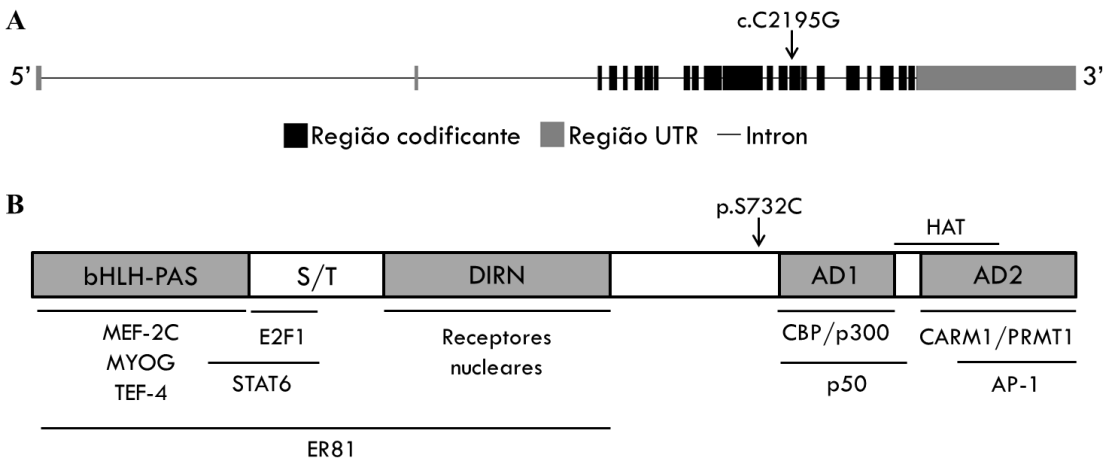


Figura 6 - Esquema do gene *NCOA3* (A) e proteína correspondente (B) em humanos, fora de escala. Em B, o domínio de acetiltransferase de histonas (HAT) está indicado acima das barras; os domínios estruturais estão indicados dentro das barras, e domínios que interagem com diferentes fatores estão indicados abaixo das barras. bHLH-PAS= *basic Helix-Loop-Helix*-Per/ARNT/Sim, S/T= regiões ricas em serina e treonina, DIRN= Domínio de interação com receptores nucleares. As setas apontam as regiões afetadas pela mutação identificada na família estudada por Dantas (2013). Figura B modificada de Yan *et al.*, 2006.

7. A família gênica SRC: estrutura e funções de seus integrantes

A família gênica de co-ativadores de receptor de esteroides (família SCR, do inglês, *Steroid Receptor Coactivator*) é composta por três integrantes em humanos: *NCOA1* (também conhecido como *SRC1*, *KAT13A*, *RIP160*, *F-SRC-1*, *bHLHe42* ou *bHLHe74*), *NCOA2* (também conhecido como *SRC2*, *TIF2*, *GRIP1*, *KAT13C*, *NCoA-2* ou *bHLHe75*) e *NCOA3* (também conhecido como *ACTR*, *AIB1*, *RAC3*, *SRC3*, *pCIP*, *AIB-1*, *CTG26*, *SRC-3*, *CAGH16*, *KAT13B*, *TNRC14*, *TNRC16*, *TRAM-1* ou *bHLHe42*).

Estes co-ativadores possuem vários domínios estruturais e funcionais similares entre si, como podemos observar na figura 7. Na região N-terminal, há um domínio bHLH-PAS (do inglês, *basic Helix-Loop-Helix-Per/ARNT/Sim*), o qual pode servir para ligação com o DNA, ou também como superfície de interação entre proteínas que também contenham o domínio bHLH-PAS (Huang *et al.*, 1993). Na região central, se encontra um domínio de interação com receptores nucleares (NRID, do inglês, *Nuclear Receptor Interacting Domain*), o qual contém três motivos LXXLL (em que L significa Leucina, e X significa qualquer aminoácido) capazes de interagir com receptores nucleares ligados a ligantes (Darimont *et al.*, 1998; Voegel *et al.*, 1998). Por fim, na região C-terminal, há dois domínios intrínsecos de ativação transcricional - AD1 e AD2 - capazes de interagir com proteínas com atividade de acetiltransferase de histonas (como as proteínas CBP, p300 e p/CAF) e de metiltransferase de argininas (a exemplo das

proteínas PRMT1 e CARM1), respectivamente (Spencer *et al.*, 1997; Torchia *et al.*, 1997; Koh *et al.*, 2001). Também já foi identificada atividade acetiltransferase de histonas no domínio C-terminal das proteínas NCOA1 e NCOA3, embora a atividade desta região seja muito mais fraca do que a desempenhada por intermédio das proteínas CBP, p300 e p/CAF (Chen *et al.*, 1997, Spencer *et al.*, 1997).

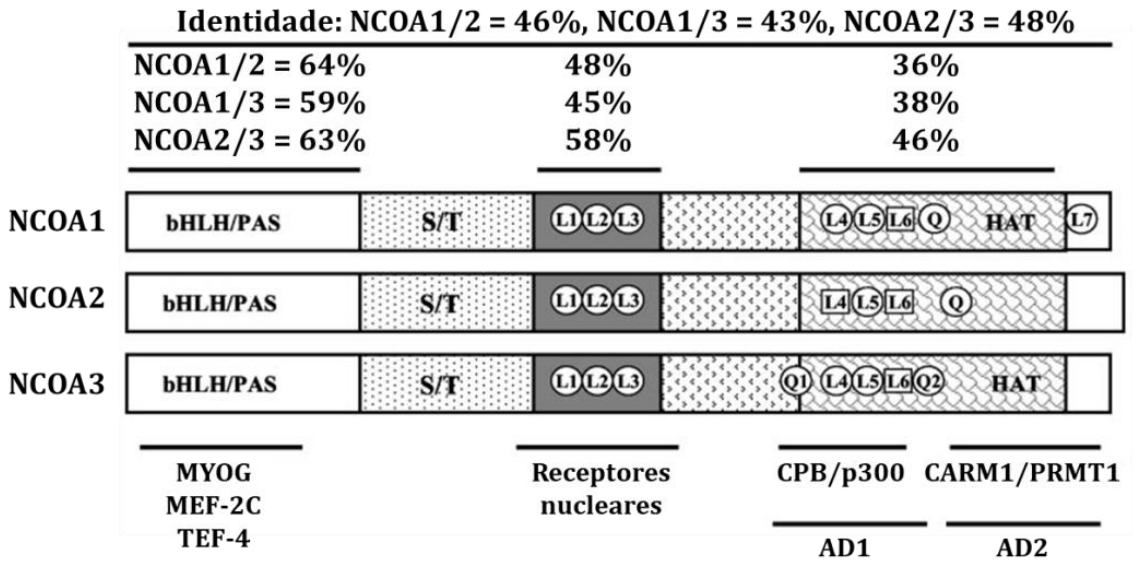


Figura 7 – Domínios funcionais e estruturais dos membros da família SRC em humanos. As similaridades das sequências de aminoácidos para cada região conservada e para as proteínas como um todo estão indicadas acima das barras. As letras dentro de cada barra indicam domínios estruturais. Abaixo das barras estão representados domínios que interagem com diferentes fatores ou que servem como os domínios ativadores AD1 e AD2. bHLH-PAS= *basic Helix-Loop-Helix*-Per/ARNT/Sim, S/T= regiões ricas em serina e treonina, L= motivos LXXLL típicos (indicados em círculo) ou atípicos (indicados em quadrados), Q= regiões ricas em glutamina, HAT= domínios de acetiltransferase de histonas identificadas nas proteínas NCOA1 e NCOA3. Figura modificada de Xu e Li 2003.

As proteínas da família SRC auxiliam nas interações proteicas entre receptores nucleares e outros correguladores e atuam como co-ativadores de receptores nucleares que atuam como reguladores transcricionais (Dasgupta, Lonard e O'Malley, 2014). Os principais papéis destes genes estão relacionados ao desenvolvimento e regulação da reprodução, bem como a regulação do metabolismo, além de haver associações com o desenvolvimento e metástase de câncer (Tabela 7).

Dentre as várias funções associadas ao *NCOA3*, podem ser citadas a regulação do desenvolvimento e da fisiologia reprodutiva (Yuan et *al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Han *et al.* 2006; Wang *et al.*, 2012), a regulação da expressão de pluripotência (Wu *et al.*, 2012), a promoção da adipogênese (Coste *et al.*, 2008), regulação do metabolismo de

neurotransmissores (York *et al.*, 2013), promoção de adipogênese nos tecidos adiposos marrom e branco (Louet *et al.*, 2006), manutenção do ritmo cardíaco (York *et al.*, 2012), promoção de lipólise no fígado (Ma *et al.*, 2011), regulação do metabolismo de ácidos graxos de cadeia longa em músculos esqueléticos (York *et al.*, 2012). Além disto, *NCOA3* tem um papel importante na formação, progressão, metástase e sobrevivência de tumores (Yan *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012), sendo superexpresso e/ou amplificado em uma diversidade de tumores (Zhao *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2005; Mo *et al.*, 2014).

Coativador	Função fisiológica	Referência
	Fígado	
NCOA1	Controla balanço energético por regulação da expressão de genes gliconeogênicos por meio de coativação de C/EBP Mantém a homeostasia de aminoácidos no fígado	Louet *et al.*, 2010 York *et al.*, 2013
NCOA2	Manutenção de euglicemia por regulação da expressão de G6PC Controla a homeostasia do ácido bílico por meio de regulação da expressão de BSEP Mantém a homeostasia metabólica diurna no fígado	Chopra *et al.*, 2008 Chopra *et al.*, 2011 Stashi *et al.*, 2014
NCOA3	Promoção de lipólise Regula a proliferação de hepatócitos e mudanças no código PTM conferem susceptibilidade à tumorigênese hepática induzida por carcinógenos	Ma *et al.*, 2011 York *et al,.* 2010 Xu *et al.*, 2010
	Tecidos adiposos marrom e branco	
NCOA1	Perda confere susceptibilidade à obesidade induzida por dieta de hipercalórica por meio de gasto energético reduzido Perda de NCOA1 e NCOA3 impacta o metabolismo de glicose e sensibilidade à insulina	Picard *et al.*, 2002 Wang *et al.*, 2012
NCOA2	Perda confere proteção contra obesidade induzida por dieta hipercalórica, redução de consumo calórico e aumento de atividade do tecido adiposo marrom	Picard *et al.*, 2002
NCOA3	Perda resulta em prejuízo a diferenciação de adipócitos e proteção contra obesidade induzida por dieta hipercalórica Perda de NCOA1 e NCOA3 impacta o metabolismo de glicose e sensibilidade à insulina	Louet *et al.*, 2006 Wang *et al.*, 2012
	Coração	
NCOA2	Controle da hipertrofia por meio de regulação de genes sarcoméricos	Reineke *et al.*, 2012
NCOA3	Perda resulta em arritmia cardíaca	York *et al.*, 2012

Tabela 7 – Lista de funções desempenhadas pelas proteínas da família SRC. BSEP= Bomba de Exportação de Ácidos Biliares, CACT= Proteína Mitocondrial Carreadora de Carnitina/,C/EBP= *CCAAT-enhancer-binding protein.* CRH= Hormônio Liberador de Corticotrofina, G6PC= Glicose 6-fosfatase, HPA= Hipotálamo-Pituitária-Adrenal, PGC1A= Coativador de 1 Alfa de PPARGC. Tabela modificada de York *et al.* (2013).

Coativador	Função fisiológica	Referência
Músculo esquelético		
NCOA1	Regulação da respiração mitocondrial do músculo esquelético Perda de NCOA1 e NCOA3 impacta o metabolismo de glicose e sensibilidade à insulina	Duteil *et al.*, 2010 Wang *et al.*, 2012
NCOA2	Coordena a expressão de NCOA1 para controlar o metabolismo do músculo esquelético	Duteil *et al.*, 2010
NCOA3	Controla o gasto energético por meio de regulação da atividade de PGC-1a Controla o metabolismo de ácidos graxos de cadeia longa por meio de regulação da expressão de CACT Perda de NCOA1 e NCOA3 impacta o metabolismo de glicose e sensibilidade à insulina	Coste *et al.*, 2008 York *et al.*, 2012 Wang *et al.*, 2012
Cérebro		
NCOA1	Perda resulta em prejuízo ao funcionamento do eixo HPA Perda resulta em prejuízo à função motora via atraso no desenvolvimento das células cerebelares de Purkinje Controla a resposta de CRH a glicocorticoides Regulação do comportamento de alimentação Perda aguda resulta em distúrbio do comportamento reprodutivo	Winnay *et al.*, 2006 Nishihara *et al.*, 2003 Lachize *et al.*, 2009 Zhu *et al.*, 2012 Apostolakis *et al.*, 2002
NCOA2	Perda resulta em insuficiência adrenocortical e desregulação neuroendócrina Necessário para funcionamento adequado do eixo HPA Regulação de ritmo circadiano Perda aguda resulta em distúrbio do comportamento reprodutivo	Patchev *et al.*, 2007 Schmidit *et al.*, 2007 Stashi *et al.*, 2014 Apostolakis *et al.*, 2002
Aparelho reprodutor feminino e/ou masculino		
NCOA1	Perda resulta em resistência parcial à esteróides, acarretando em atraso na puberdade e no crescimento das glândulas mamárias	Xu *et al.*, 1998
NCOA2	Importante para a função adequada das células de Sertoli Perda resulta em degeneração testicular Perda resulta em redução de fertilidade masculina e feminina	Gehin *et al.*, 2002
NCOA3	Perda resulta em atraso na puberdade e no crescimento das glândulas mamárias Perda resulta em redução no nível de estrogênio Perda resulta em redução de fertilidade feminina	Xu *et al.*, 2000 Yuan *et al.*, 2000 Wang *et al.*, 2012
Outras funções		
NCOA1	Perda resulta em resistência parcial aos hormônios da tireóide	Weiss *et al.*, 1999
NCOA2	Perda resulta em hipoplasia da placenta	Gehin *et al.*, 2002
NCOA3	Regulação da pluripotência	Wu *et al.*, 2012

Tabela 7 – Continuação.

Camundongos *knock-out* em relação ao gene *Ncoa3* já existem e foram estudados com vários objetivos diferentes, mas nenhum deles foi estudado especificamente em relação ao sistema auditivo. Entre os fenótipos associados a esse camundongo *knock-out*, podemos citar: retardo no crescimento e baixa implantação da orelha externa (Liu *et al.*, 2008); puberdade atrasada, com pouco desenvolvimento da glândula mamária e função reprodutiva feminina reduzida (Xu *et al.*, 2000); diferenciação em adipócitos prejudicada, levando à redução de peso e de massa de tecido adiposo (Louet *et al.*, 2006), déficit hematológico caracterizado por baixo número de plaquetas, elevado número de linfócitos T e B e desenvolvimento de linfomas (Coste *et al.*, 2006).

Recentemente, quatro diferentes alelos mutados no gene *ncoa3* foram identificados em *zebrafish* pelo *Zebrafish Mutation Project* do *Sanger Institute* (Kettleborough *et al.*, 2013) e os animais são disponíveis de acordo com o banco de dados ZFIN (http://zfin.org/). Contudo, tais linhagens nunca foram estudadas para qualquer propósito. Também vale ressaltar que não há informações em bancos de dados sobre a expressão e nem sobre o papel deste gene na orelha interna, tanto em humanos e como nos modelos animais citados acima.

Com base na revisão apresentada acima, o estudo da expressão e da função do gene *NCOA3* em modelos animais tornou-se um interessante objeto de pesquisa para o laboratório, especialmente para elucidar sua possível contribuição para a origem da deficiência auditiva encontrada na família em estudo.

Objetivos

Uma vez que a variante do gene *NCOA3* é a melhor candidata a explicar a surdez na família estudada anteriormente, tornou-se importante verificar se o padrão de expressão deste gene é coerente com o esperado para um gene relacionado à audição. Logo, este projeto tem como objetivo geral investigar a expressão do gene *NCOA3* em sistemas mecanossensoriais de modelos animais (sistema auditivo e/ou linha lateral), especificamente em camundongo (*Mus musculus*) e em *zebrafish* (*Danio rerio*).

Os objetivos específicos são:

a) Investigar se o RNAm e a proteína do gene *Ncoa3* são expressos na cóclea de camundongo de diferentes idades, utilizando RT-PCR, qRT-PCR e imunofluorescência.

b) Investigar o padrão de expressão do RNAm do gene *ncoa3* em *zebrafish* em diferentes períodos de desenvolvimento da vesícula ótica e da linha lateral, por meio de hibridação *in situ* em animal inteiro.

c) Gerar *zebrafish* com mutação de perda de função no gene *ncoa3*, por meio de edição gênica utilizando o sistema CRISPR/Cas9, de forma a verificar se a falta da expressão de *ncoa3* afeta o desenvolvimento da orelha interna.

Materiais e métodos

1. Animais

Foram utilizados camundongos CBL57/6 (*Mus musculus*) com idades entre 4 dias e 3 meses de idade (P4-P180) fornecidos pelo Biotério do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL) do Instituto de Biociências da USP. Os animais foram produzidos e mantidos em biotério de nível sanitário convencional, Biotério Genoma IB-USP, com área edificada restrita e fundamentalmente dividida em dois ambientes principais: área suja (lavagem, desinfecção e esterilização de matérias de uso em biotério) e área limpa (salas de criação/manutenção animal). Os animais são mantidos em micro-isoladores instalados em estantes ventiladas (Alesco Ind. Com. Ltda).

Zebrafish (*Danio rerio*) em diferentes estágios do desenvolvimento foram utilizados: embriões de 18 horas pós-fertilização (hpf), larvas com idade até 5 dias pós-fertilização (dpf), e peixes juvenis de 5 e 7 semanas pós-fertilização (spf), para a realização de hibridação *in situ* em animal inteiro. Já para a técnica de edição gênica pelo sistema CRISPR/Cas9, foram utilizados zigotos de *zebrafish*. Os peixes utilizados neste estudo foram criados no Laboratório de *zebrafish* do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da USP sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno. Os animais foram produzidos e mantidos em *facility* de nível sanitário convencional, mantida à temperatura constante de 26°C, com ciclos de claro/escuro de 14/10h. Os animais foram mantidos em tanques de 1,1L, 3,5L ou 8L, com a proporção de 5 peixes/L, para evitar estresse do animal. Os tanques estão conectados a uma estante (*Zebtec™ Zebrafish Housing System*, Tecniplast) que mantém constantes as condições micro-ambientais dos tanques a níveis apropriados. Os tanques são supridos com água purificada por osmose reversa, radiação UV, filtro biológico e filtro em forma de tambor, com correção de temperatura, pH e condutividade pelo próprio sistema automatizado da estante, para os níveis desejados. No caso dos embriões, estes foram mantidos em incubadora a 28°C até estagio larval de 5dpf, sendo então transferidos para tanques da estante.

Em ambos os casos, os animais foram mantidos e reproduzidos de acordo com os princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação, com aprovação do

Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Processo número 16.1.668.41.6).

2. RT-PCR e qRT-PCR de cóclea, de órgão de Corti associado à estria vascular e de músculo de camundongo

2.1. Obtenção dos tecidos

Com o objetivo de analisar qualitativamente e quantitativamente a expressão de RNAm do gene *Ncoa3* em camundongo, foram realizadas RT-PCR e qRT-PCR. Em ambas as técnicas foram utilizados cóclea inteira, órgão de Corti (epitélio sensorial da cóclea) associado à estria vascular (epitélio responsável pela manutenção da composição iônica da endolinfa), de camundongos com 4, 10 e 16 dias de idade (P4, P10 e P16), e músculo de camundongo com 3 meses de idade (P180). Este último tecido foi escolhido para estudo por ter a expressão de *Ncoa3* confirmada, de acordo com os bancos de dados de expressão do *EST profile* do *National Human Genome Research Institute* (NCBI). Além disso, foi um tecido facilmente disponibilizado por colaboradores do nosso instituto.

As cócleas e os órgãos de Corti associados à estria vascular foram coletados cirurgicamente de camundongos sacrificados por decapitação. Após a decapitação do animal com tesoura *Metzenbaum*, foi realizada a antissepsia do crânio com álcool a 70%, seguida da incisão longitudinal na linha sagital do crânio e visualização do osso temporal. Esta abordagem permitiu acesso ao bloco labiríntico para retirada da cóclea. O bloco labiríntico foi removido do osso temporal e transferido para placa de *Petri* de 35mm contendo RNAlater® (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A cóclea foi separada ao estéreo-microscópio trinocular (*Discovery* V12, Carl Zeiss, BW, Ostalbkreis, Alemanha), com magnificação de 10 a 20 vezes e dissecada com o uso de micropinças (Dumont #5 e #54, Koch Electron Microscopy). Todo o procedimento cirúrgico foi realizado com o auxílio das doutoras Jeanne Oiticica e Karina Lezirovitz, do Laboratório de Otorrinolaringologia/LIM32 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os tecidos musculares foram obtidos a partir de amostras de gastrocnêmio e de quadríceps de camundongo CBL57/6 com 3 meses de idade, cedidas gentilmente pelo

Laboratório de Proteínas Musculares e Histopatologia Comparada da Prof. Dra. Mariz Vainzof (Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB-USP).

2.2.Extração de RNA e síntese de cDNA

Após o isolamento dos tecidos, o RNA total foi extraído por meio do kit *RNeasy Microarray Tissue Mini Kit* (QIAGEN, Venlo, LI, Países Baixos), seguindo as instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada com o *SuperScript® III First Strand Synthesis* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), utilizando-se 1µg de RNA de cada um dos tecidos e seguindo as instruções do fabricante.

2.3.RT-PCR

As reações de RT-PCR foram realizadas em volume final de 20µL, contendo 2µL de *Buffer* 10x, 0,5µL de $MgCl_2$ (concentração de estoque de 50mM), 2µL de dNTP (concentração de estoque 2mM), 2µL de cDNA (concentração de estoque 100 ng/µL), 1µL de diluição de *primers forward* e *reverse* (concentração de estoque 20µM), 0,3µL de Taq DNA polimerase e 12,2µL de H_2O MiliQ. Uma vez preparadas as reações, estas foram então submetidas à seguinte sequência de ciclos: desnaturação inicial a 95ºC por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação por 40 segundos a 95ºC, hibridação por 40 segundos a 59ºC, extensão por 1 minuto e 30 segundos a 72ºC, e uma extensão final a 72ºC por 10 minutos.

Para esta técnica, utilizamos os três pares de *primers* indicados na tabela 8, desenhados por meio do pacote computacional (http://primer3.ut.ee/). Dois deles amplificam sequências correspondentes aos genes *B2m* (do inglês, *Beta-2 Microglobulin*) e *Actb* (do inglês, *Actin Beta*), controles positivos de expressão gênica por seus padrões de expressão ubíqua. O terceiro par é específico para amplificação de sequência do *Ncoa3*.

Gene	*Primers* para amplificação	Tamanho do fragmento amplificado a partir de cDNA
Ncoa3 (*Nuclear Receptor Coactivator 3*)	*Forward* 5'CGTTTCTCCTTGGCTGATGG3' *Reverse* 5'CGGGATTTGGGTTTGGTCTG3'	148pb
B2m (*Beta-2 Microglobulin*)	*Forward* 5'TCGCGGTCGCTTCAGTCGTC3' *Reverse* 5'TTCTCCGGTGGGTGGCGTGA3'	132pb
Actb (*Actin beta*)	*Forward* 5'GGCTGTATTCCCCTCCATCG3' *Reverse* 5'CCAGTTGGTAACAATGCCATGT3'	154bp

Tabela 8 - Informações sobre os pares de *primers* desenhados para amplificar, a partir de cDNA, o gene candidato e os genes de controle positivo de expressão gênica da técnica de RT-PCR.

2.4.RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)

Para a padronização da técnica utilizando SYBR®Green, foi realizada a curva de dissociação ou de *melting* a fim de verificar se amplificação estava específica e sem dímero de *primer*. No caso de *primers* que se mostraram específicos, foram testadas diferentes combinações de concentrações dos *primers forward* e *reverse* com o objetivo de encontrar a combinação ideal de modo a obter o menor valor do ciclo de limiar (C_t, do inglês, *cicle threshold*), maior ΔRn (variação de fluorescência) e na qual não ocorreu formação de dímeros. Em seguida, foi construída uma curva padrão a partir de diluições seriadas (concentração inicial 12,5ng/µL, com diluições subsequentes em 10x) da amostra positiva de cDNA (gastrocnêmio de camundongo) para verificar se a eficiência de reação com aqueles parâmetros (sequência e concentração dos *primers*, etc) estava entre 95% e 105% com coeficiente de correlação $R^2 \geq 0,99$, inclinação próxima a -3,32, e, portanto, se o ensaio estava adequado para quantificações.

Após a etapa de padronização, as reações de qRT-PCR foram então constituídas por volume final de 20µL, contendo 5µL de cDNA (concentração de estoque 5ng/µL), 0,6µL de diluição de *primers forward* e *reverse* (concentração de estoque 20µM) na proporção 1:1, e 10 µL de PowerUp™SYBR®Green Master Mix (cat.# A25742, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Uma vez preparadas as reações, estas foram submetidas à seguinte sequência de ciclos: o primeiro ciclo a 59°C por 2 minutos seguido de um ciclo a 95°C por 10 minutos, para preparação do cDNA; um ciclo a 95°C por 15 segundos, seguido de um ciclo a 60°C por 1 minuto, repetidos 40x para incorporação e medição da fluorescência do SYBR Green; um ciclo a 95°C por 15

segundos, um ciclo a 60°C por 1 minuto, um ciclo a 95°C por 15 segundos; essa última etapa é importante para criar uma curva de dissociação (ou *melting*) com a finalidade de determinar a especificidade dos alvos da reação de amplificação. As amplificações e as análises das reações de qRT-PCR foram feitas no sistema de detecção *QuantStudio 5 Real-Time PCR System* (ThermoFisher Scientific, , Waltham, MA, USA).

Para esta técnica, utilizamos os três pares de *primers* indicados na tabela 9. Utilizamos como controle positivo de expressão a amplificação da sequência do gene *Actb*, e, para o gene *Ncoa3*, *primers* para a amplificação de duas regiões diferentes, uma correspondendo aos exons 3 a 5 e outra abrangendo os exons 10 e 11. Nas condições citadas acima, foi definido o valor do ciclo de limiar (C_t) e foi verificada a eficiência de cada par de *primers* para a reação de amplificação. Os pares de *primers* utilizados nestas reações apresentaram eficiência entre 95% e 105%.

Gene	***Primers* para amplificação**	**Tamanho do fragmento amplificado a partir de cDNA**
Ncoa3 - Exons 4 a 6 (*Nuclear Receptor Coactivator 3*)	*Forward* 5'ACAGTGAGACAGATACGGCA3' *Reverse* 5'AACCATCCAGTGCCTGTAGT3'	148pb
Ncoa3 - Exons 10 e 11 (*Nuclear Receptor Coactivator 3*)	*Forward* 5' CGTTTCTCCTTGGCTGATGG3' *Reverse* 5' CGGGATTTGGGTTTGGTCTG3'	148pb
Actb (*Actin beta*)	*Forward* 5'GGCTGTATTCCCCTCCATCG3' *Reverse* 5'CCAGTTGGTAACAATGCCATGT3'	154bp

Tabela 9 - Informações sobre os pares de *primers* desenhados para amplificar, a partir de cDNA, o gene candidato e o gene de controle positivo de expressão gênica na técnica de qRT-PCR.

Todos os experimentos de qRT-PCR foram realizados em triplicatas. Para os cálculos de quantificações relativas, foram utilizadas as médias dos valores de Ct das triplicatas, às quais eram aplicadas à fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3. Ensaios de imunofluorescência em cortes histológicos de músculo e de cóclea de camundongo

3.1. Obtenção e preparação de tecidos

Com o objetivo de analisar qualitativamente a expressão da proteína Ncoa3 em camundongo, foram realizados ensaios de imunofluorescência. Para a execução desta técnica, optou-se por analisar a cóclea e o músculo. Este último tecido foi escolhido por ter a expressão de *Ncoa3* confirmada, de acordo com os bancos de dados de expressão do *EST profile* do *National Human Genome Research Institute* (NCBI).

Os tecidos de cóclea foram coletados cirurgicamente de camundongos com 4, 10 e 14 dias de idade (P4, P10 e P14), de maneira similar ao explicado no item 2.1, com a diferença de que o bloco labiríntico era transferido para uma placa de *Petri* de 35mm contendo PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) a 4°C. Após o isolamento das cócleas, estas foram perfuradas no ápice para perfusão de PFA 4%, pH 7,4, a 4°C *overnight*. Em seguida, as cócleas de camundongos P10 e P14 foram submetidas ao processo de descalcificação por meio de incubação com solução de 10% EDTA e 1% paraformaldeído a 4°C por 4 dias (Smeti *et al.*, 2014). Uma vez completada a descalcificação, as cócleas foram colocadas em meio de inclusão *Jung Tissue Freezing Medium* (Leica Microsystems, HE, Wetzlar, Alemanha) para posterior realização de cortes histológicos longitudinais em criostato CM1850 (Leica Microsystems) a -20°C, com espessura do corte fixada em 12µm.

Os tecidos musculares utilizados para esta técnica foram provenientes de cortes histológicos de gastrocnêmio e de quadríceps de camundongo CBL57/6 com 3 meses de idade (P180), cedidos gentilmente pelo Laboratório de Proteínas Musculares e Histopatologia Comparada da Prof. Dra. Mariz Vainzof (Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB-USP).

3.2. Ensaios de imunofluorescência

Uma vez obtidos os cortes histológicos dos tecidos de interesse, estes foram submetidos ao protocolo descrito por Smeti *et al.*(2014). As lâminas histológicas foram simultaneamente permeabilizadas e bloqueadas com triton X-100 0,3% e BSA 4%, diluídos em PBS, por 2h a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram

incubadas com o anticorpo primário anti-NCOA3 (anti-SCR3 *antibody - ChIP Grade, Rabbit* Polyclonal, ab2831, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) diluído na proporção 1:50 em solução de triton X-100 0,1%, BSA 4% (do inglês, *Bovine Serum Albumin*) e PBS, a 4ºC *overnight*, em câmara úmida. Após esta incubação, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo secundário DAR568 (o qual é conjugado com o fluorocromo Alexa568) diluídos na proporção 1:500 em solução de triton X-100 0,1%, BSA 1% e PBS, a temperatura ambiente por 2h. As lâminas foram então montadas com *Prolong Gold Antifade Reagent* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) contendo DAPI (4', 4-diamidina-fenil indol) para identificação do núcleo e seladas com esmalte.

As lâminas histológicas foram observadas em microscópio confocal de fluorescência LSM 780 (Carl Zeiss) ou LSM880 (Carl Zeiss) e as imagens capturadas com o programa *Zen* (Carl Zeiss).

4. Hibridação *in situ* em animal inteiro em *zebrafish*

4.1. Amplificação de sequência do gene *ncoa3* para produção de sonda de RNA

Com o objetivo de analisar qualitativamente a expressão do RNAm do gene *ncoa3*, foram realizados ensaios de hibridação *in situ* em animal inteiro. Para produzirmos a sonda de RNA, selecionamos um trecho de 838pb de sequência de DNA não-repetitivo correspondente ao exon 11 do gene *ncoa3* e o submetemos à ferramenta de alinhamento BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para assegurar a especificidade deste segmento ao gene-alvo. Utilizamos o pacote computacional Primer3 para desenhar um par de *primers* que permitisse a amplificação da região desejada. Adicionamos a sequência do promotor T7 à extremidade 5' do *primer reverse* para permitir que o amplicon resultante pudesse ser posteriormente transcrito *in vitro* pela enzima RNA polimerase T7.

Os *primers forward* (5'GAATACCTTCTCTAGCAGCTCATTG3') e *reverse* (5'taatacgactcactatagggagCTTATTGAGGAGGTAGTGAAGGAGG3') assim desenhados permitiram, a partir de DNA genômico de *zebrafish*, amplificar um fragmento de DNA de 880pb (838pb correspondente ao trecho entre as posições 18535452-18536360 do cromossomo 11 de *D. rerio* e 42pb correspondentes ao

promotor T7) da região do exon 11 do *ncoa3*, para servir de molde para a transcrição *in vitro* da sonda.

As reações de PCR eram constituídas por um volume final de 20µL, contendo 2µL de *Buffer* 10x, 0,5µL de $MgCl_2$ (concentração de estoque 50mM), 2µL de dNTP (concentração de estoque 2mM), 2µL de DNA genômico (concentração de estoque 100 ng/µL), 1µL de mix de *primers forward* e *reverse* (concentração de estoque 20µM), 0,3µL de Taq DNA polimerase e 12,2µL de H_2O MiliQ. Uma vez preparadas as reações, estas foram submetidas à seguinte sequência de ciclos: desnaturação inicial a 95ºC por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação por 40 segundos a 95ºC, hibridação por 40 segundos a 59ºC, extensão por 1 minuto e 30 segundos a 72ºC, e uma extensão final a 72ºC por 10 minutos. Terminada a reação, o fragmento amplificado foi então purificado por meio de protocolo convencional de purificação de DNA com fenol-clorofórmio.

4.2. Transcrição *in vitro*, purificação de sonda de RNA e hibridação *in situ* em *zebrafish*

Após a obtenção do fragmento-molde de DNA por amplificação, prosseguimos com a etapa de obtenção da sonda de RNA para o gene *ncoa3* por meio de transcrição *in vitro*. Esta reação foi realizada em volume total de 20µL, com os seguintes componentes: 2µL de 10x *Buffer* T7 (ThermoFisher Scientific), 1µL de *RNAse OUT Inhibitor* (ThermoFisher Scientific), 1µL de DIG RNA *Labeling Mix* (Roche), 13µL do produto da PCR anterior e 1µL de T7 RNA polimerase (ThermoFisher Scientific). O volume total da reação foi então incubado a 37ºC *overnight* para dar início ao processo de transcrição *in vitro*, seguida de adição de 1µL de TURBO DNAse (ThermoFisher Scientific) e incubação a 37ºC por 15 minutos para digestão do DNA ainda presente no volume total da reação.

Após a transcrição *in vitro* da do DNA-molde, foi realizada a purificação da sonda de RNA marcada com digoxigenina (DIG) através de coluna de purificação *SigmaSpin™ Post-Reaction Clean-Up Columns* (Sigma Aldrich). Posteriormente, a sonda purificada foi utilizada em ensaios de hibridação *in situ* com larvas de *zebrafish* com idades variando de 18hpf a 5dpf, bem como com peixes juvenis com 5 e 7 semanas de idade, seguindo o protocolo adaptado de Thisse e Thisse (2008).

Para esta técnica foram utilizados *zebrafish* previamente fixados em PFA 4% fresco, com pigmentação removida por meio de incubação com solução de 3% H_2O_2 e 0,5% KOH e posteriormente desidratados por meio de diluições seriadas com metanol. O protocolo de hibridação *in situ* utilizado consistiu, resumidamente, nas seguintes etapas: o *zebrafish* foi reidratado, permeabilizado por meio de incubação com proteinase K a 37°C por tempo que variou conforme o estágio do desenvolvimento; posteriormente, foi incubado com solução de hibridação contendo 2µL de sonda de RNA marcada com DIG a 70°C *overnight*; em seguida, após lavagens seriadas com solução de hibridação sem sonda, de PBT (Solução de PBS com 0.1% Tween-20) e de SSC (do inglês, *Sodium Saline Citrate*), o *zebrafish* foi incubado com solução de boqueio por 4h a 4°C, e posteriormente incubado em solução de bloqueio contendo anticorpo anti-DIG, na proporção 1:10000, a 4°C *overnight*. Por fim, após nova série de lavagens com PBT e com solução de coloração, o *zebrafish* foi incubado em solução de coloração contendo NBT (4-nitrozaul de tetrazólio) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato), a 37°C até aparecer o sinal desejado. A reação de coloração foi finalizada com PFA 4% e o *zebrafish* foi armazenado em glicerol 100% a 4°C.

A observação e captura das imagens das larvas foi realizada em microscópio Axiophot (Carl Zeiss), câmera AxioCam MRc (Carl Zeiss) e *software AxioVision* (Carl Zeiss), enquanto que a dos juvenis foi feita em estereomicroscópio Nikon SMZ1500 (Tokyo, TYO, Japão), câmera Axiocam 506 (Carl Zeiss) e *software Zen* (Carl Zeiss).

5. Edição gênica por meio do sistema CRISPR/Cas9

O sistema CRISPR/Cas9 é um mecanismo molecular encontrado em bactérias e que atua como parte do sistema imune adaptativo contra DNAs exógenos, principalmente infecções virais (Sampson e Weiss, 2014). Este sistema foi adaptado para uso artificial em células de mamíferos, em modelos animais, e, recentemente, em embriões humanos, para induzir alterações genéticas como a inativação de genes-alvo e a correção de mutações patogênicas (Chu *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2017).

A técnica de edição gênica por CRISPR/Cas9 consiste no uso de dois componentes principais (Jinek *et al.*, 2012): a proteína Cas9, uma endonuclease de corte-duplo; e o sgRNA (do inglês, *small guide* RNA), uma molécula quimérica com aproximadamente 100 nucleotídeos de extensão, formada pela sequência-guia (~20 nt na extremidade 5'), cuja função é direcionar a região genômica a ser clivada pela Cas9, e pela sequência

universal (~80 nt restantes na extremidade 3'), cuja função é interagir com a Cas9 (Figura 8).

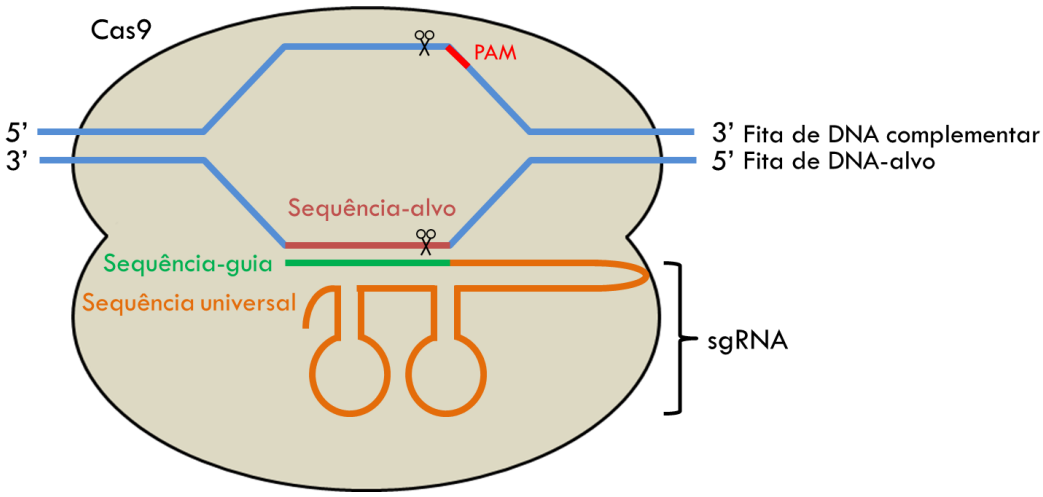


Figura 8 – Esquema do complexo Cas9/sgRNA ligado ao DNA-alvo. O sgRNA é formado pela sequência-guia (verde) e pela sequência universal (laranja). Ao se parear com o DNA-alvo (rosa escuro), o sgRNA direciona aonde a Cas9 (cinza) deve gerar a dupla-quebra no DNA. Um motivo PAM (do inglês, *Protospacer Adjacent Motif*, em vermelho) de 3 nucleotídeos (sequência NGG) adjacente à região-alvo na outra fita de DNA deve estra presente para que haja a ancoragem do complexo Cas9/sgRNA aos sítios de clivagem (representado pelas tesouras). Figura modificada de Pereira (2016).

A quebra na dupla-fita de DNA genômico é prejudicial para a célula, sendo rapidamente reparada pelo sistema de reparo de DNA (Figura 9). Conforme revisado por Pereira (2016), caso as pontas geradas pela clivagem não sejam complementares entre si, o reparo por junção de pontas não-homólogas é ativado. Este sistema é propenso a erros e frequentemente gera mutações do tipo inserção ou deleção (*indels*) na região de reparo. Mutações do tipo *indel* na região codificante do gene geralmente levam a mudanças no quadro de leitura e, consequentemente, à formação de códons de parada prematuros, acarretando *knock-out* do gene. Caso as pontas geradas pela clivagem apresentem homologia entre si, o reparo por junção de pontas homólogas é ativado. Neste caso, o sistema utiliza a cromátide-irmã ou um DNA doador para realizar o reparo, tornando possível a realização de *knock-in* por meio de DNA exógeno contendo a mutação de interesse ou mesmo realizar substituição alélica.

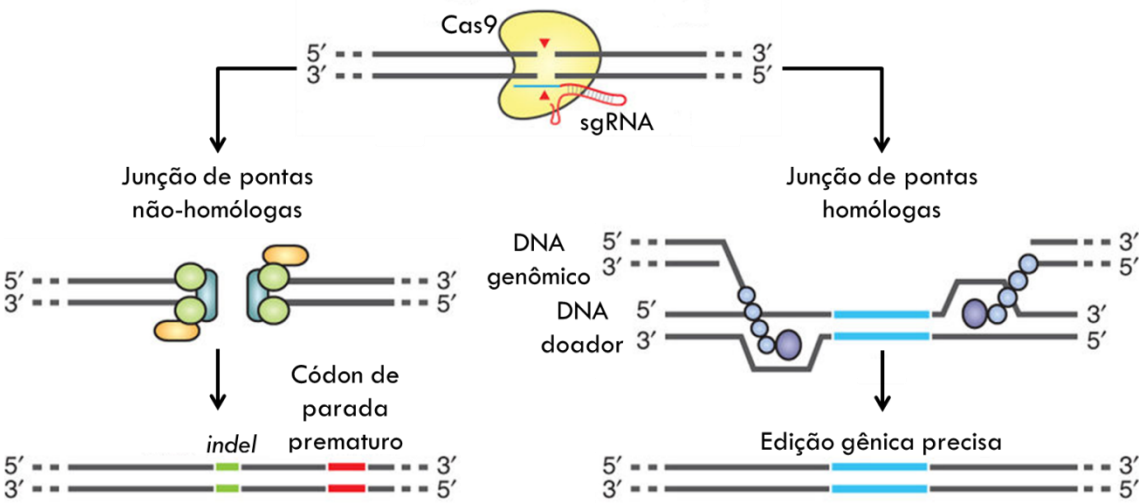


Figura 9 – Sistemas de reparo de quebra na dupla-fita de DNA. No caso de junção de pontas não-homólogas, o processo é feito por um mecanismo endógeno de reparo de DNA que frequentemente causa mutações do tipo *indel* no sítio de reparo do DNA. Mutações do tipo *indel* na região codificante podem resultar em mudanças no quadro de leitura, criando um códon de parada prematuro e acarretando *knock-out* do gene. Já no caso do reparo por junções homólogas, a cromátide-irmã ou um DNA doador é utilizado como molde para correção do problema. Caso um DNA doador seja utilizado, este acaba sendo integrado ao genoma, acarretando *knock-in* do gene. Figura adaptada de Ran *et al.* (2013).

No nosso estudo, a estratégia foi utilizar um sgRNA sintético para formar um complexo com a nuclease Cas9. O sgRNA foi transcrito *in vitro* a partir de um oligonucleotídeo contendo a sequência do promotor T7 na ponta 5'. O transcrito resultante foi então injetado em embriões de *zebrafish* juntamente com RNAm da enzima Cas9 (transcrito *in vitro*, a partir de um plasmídeo linearizado) ou com a própria enzima Cas9 (obtida comercialmente). As larvas injetadas foram analisadas após 1 ou 3 dias de injeção para verificação de eficiência do sistema.

Detalhes de como o sistema foi utilizado neste estudo serão apresentados nos itens a seguir.

5.1.Seleção de alvos dos sgRNA e desenho de oligonucleotídeos

As sequências-alvo para ação do sistema CRISPR/Cas9 sobre o gene *ncoa3* foram selecionadas utilizando as sequências dos exons do *ncoa3* disponíveis no banco de dados ENSEMBL (http://www.ensembl.org/index.html). A análise computacional para previsão de alvos para o sistema CRISPR/Cas9 foi feita por dois métodos: por meio do pacote computacional *Zifit Targeter version 4.2* (disponível no *site* http://zifit.partners.org/ZiFiT/CSquare9Nuclease.aspx) e por meio do *browser*

extensible data (BED) track ZebrafishGenomics do *UCSC Genome Browser* (https://genome.ucsc.edu/). As sequências complementares e reversas de 7 regiões indicadas como alvo pelos pacotes computacionais foram inseridas no meio de sequências características do sgRNA (Tabela 10). Os oligonucleotídeos-molde assim planejados foram sintetizados pela empresa Exxtend Ltda. (Campinas, SP, Brasil).

Alvos no *ncoa3*	**Sequência-alvo**	**Oligonucleotídeos-molde de sgRNA**
Alvo 1 – Exon5 (sgRNA 1)	5'GTTTGTGGTGAGCCGTGA3'	5'AAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC**TCACGGCTCACCACAAAC**CTATAGTGAGTCGTATTACGC3'
Alvo 2 – Exon 5 (sgRNA 2)	5'GCAGGATGTTGTAGATGC3'	5'AAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC**GCATCTACAACATCCTGCC**CTATAGTGAGTCGTATTACGC3'
Alvo 3 – Exon 10 (sgRNA 3)	5'GGCATCGGGACTGCGACTAG3'	5'AAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC**CTAGTCGCAGTCCCGATGCC**CTATAGTGAGTCGTATTACGC3'
Alvo 4 – Exon 10 (sgRNA 4)	5'GGGGTCTCCGCGGATACGA3'	5'AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC**TCGTATCCGCGGAGACCCC**CTATAGTGAGTCGTATTACGC3'
Alvo 5 – Exon 10 (sgRNA 5)	5'GGAAGTCCGGGAATGAATCC3'	5'AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC**GGATTCATTCCCGGACTTCC**CTATAGTGAGTCGTATTACGC3'
Alvo 6 – Exon 11 (sgRNA 6)	5'GGATCTGACCCGAAGGAGAC3'	5'AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC**GTCTCCTTCGGGTCAGATCC**CTATAGTGAGTCGTATTACGC3'
Alvo 7 – Exon 11 (sgRNA 7)	5'GGTCGTGCGTCCACTCCGAT3'	5'AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC**ATCGGAGTGGACGCACGACC**CTATAGTGAGTCGTATTACGC3'

Tabela 10 – Informações sobre os alvos selecionados para atuação do sistema CRISPR/Cas9 no *ncoa3*, e os oligonucleotídeos-molde planejados para transcrição *in vitro* dos sgRNAs correspondentes a estes alvos. Em negrito está destacada a sequência complementar e reversa à sequência de DNA-alvo, a qual foi inserida no meio do molde de DNA padrão para a transcrição *in vitro* de sgRNA.

5.2. Transcrição *in vitro* de sgRNA e de RNAm da Cas9

Cada sgRNA foi obtido por transcrição *in vitro* a partir dos oligonucleotídeos-molde de DNA usando o kit *MEGAshortscript™ Kit* (Ambion, Waltham, MA, USA) e foram purificados por extração com fenol-clorofórmio, segundo as instruções do fabricante. Alíquotas dos sgRNA antes e depois da adição de DNAse, bem como depois da purificação, foram coletadas para posterior verificação de qualidade por meio de eletroforese em gel de agarose 1% e para quantificação no espectrofotômetro Nanodrop (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA).

Para a síntese de RNAm da enzima Cas9, foi realizada a transcrição *in vitro* de plasmídeo contendo sequência de Cas9 e promotor sp6. Primeiramente foi feita a linearização do plasmídeo pCS2-Cas9 (Addgene, #47332) por meio de digestão com a

enzima de restrição *NotI*, de forma a possibilitar a sua transcrição *in vitro* pelo kit *mMESSAGE mMACHINE® Kit* (Ambion). A transcrição e posterior purificação com fenol-clorofórmio foram realizadas segundo as instruções do fabricante. Alíquotas dos RNAm antes e depois da adição de DNAse, assim como depois da purificação foram coletadas para posterior verificação de qualidade por meio de eletroforese em gel de agarose 1% e para quantificação no espectrofotômetro Nanodrop (ThermoFischer Scientific).

5.3. Microinjeção e extração de DNA

Zigotos de *zebrafish* foram injetados com quantidades variáveis de sgRNA e de RNAm de Cas9. Em alguns casos, houve utilização da enzima Cas9 (New England BioLabs Inc, Ipswich, MA, USA) ao invés do RNAm correspondente. Os sgRNA foram testados isoladamente ou em combinações.

Para as injeções, foram utilizados o microinjetor *Pneumatic PicoPump PV820* (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA), microagulhas de vidro preparadas com o *Micropipette Puller PUL-1000* (World Precision Instruments), de acordo com o protocolo de Westerfield (2007). Os volumes de solução de RNAm de Cas9 e de sgRNA a serem injetadas foram calculados com o CRISPR-CALC (programa para cálculo de microinjeção de sgRNA e Cas9, disponível no site do NCBI - http://research.nhgri.nih.gov/), sendo adicionados a 1µL de *phenol red* (um marcador vermelho, Sigma Aldrich) e água *RNAse free* até completar 10µL de solução de injeção. Cada zigoto era injetado com 1pL da solução de injeção. No caso dos experimentos com proteína Cas9, foi utilizado 1µL da enzima. Neste caso, foi necessário aquecer a solução de injeção a 37°C por 10 minutos antes da injeção, para a formação apropriada do complexo CRISPR/Cas9. Os embriões injetados foram então incubados a aproximadamente 25°C até atingirem os estágios do desenvolvimento 24dpf ou 72dpf, quando foram então sacrificados para extração de DNA.

O DNA foi extraído de *pools* de embriões não-injetados e de embriões injetados (número de *pools* e de embriões por *pool* variaram de acordo com a taxa de sobrevivência dos embriões após a microinjeção, sendo a média de 3 *pools* com 10 embriões cada) com o kit *NucleoSpin® Tissue* (Macherey-Nagel, Düren, NRW, Alemanha). No caso de peixes jovens e adultos, o DNA era extraído a partir de uma

amostra tecidual obtida por meio de corte da nadadeira caudal, seguindo o protocolo de Meeker *et al.* (2007).

5.4. Desenho de *primers* para amplificação dos segmentos-alvo da edição gênica e PCR fluorescente

Pares de *primers* foram desenhados por meio do pacote computacional Primer3 para amplificar fragmentos de 350-400pb de modo a incluir as sequências-alvo do sistema CRISPR/Cas9 no gene *ncoa3*. Inicialmente desenhamos *primers* com os adaptadores M13 (5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3') e *Pigtail* (5'-GTGTCTT-3') nas sequências *forward* e *reverse*, respectivamente. Em resumo, o adaptador M13 permite a utilização de um terceiro *primer* fluorescente na reação de amplificação, permitindo a adição de fluorescência aos produtos da PCR (Schuelke, 2000), enquanto que o adaptador *Pigtail* serve para garantir a fidelidade do tamanho dos amplicons, evitando a adição de nucleotídeos extras (não pertencentes ao DNA-molde) ao produto da PCR (Brownstein *et al.*, 1996). Contudo, resolvemos depois adotar o uso de *primers forward* com fluoróforo 6-FAM, previamente adicionado pelo fabricante (Tabela 11). Todos os *primers* foram sintetizados pela empresa Exxtend Ltda. (Campinas, SP, Brasil)

No caso das reações com par de *primers* contendo os adaptadores M13 e Pigtail, foi utilizada uma solução contendo o *primer forward* com M13, o *reverse* com Pigtail e um *primer forward* apenas com sequência M13 ligada ao fluoróforo FAM na proporção 1:3:1. O fragmento foi amplificado por meio de PCR, através da seguinte sequência de ciclos: desnaturação inicial a 95ºC por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação por 40 segundos a 95ºC, hibridação por 40 segundos a 60ºC, extensão por 40 segundos a 72ºC, e uma extensão final a 72ºC por 10 minutos. Com relação às reações com os outros pares de *primers* com marcação fluorescente prévia, a reação se deu com soluções de *primers* com razão equimolar, seguindo a mesma sequência de ciclos descrita acima.

Alvos no *ncoa3*	*Primers* de verificação	Tamanho do fragmento amplificado
Alvo 1 – Exon5 Alvo 2 – Exon 5	M13-FAM *forward* 5´TGTAAAACGACGGCCAGT3´ *Forward* 5'tgtaaaacgacggccagtTTGGTGCTCG GATAGTGTCTT3' *Reverse* 5'gtgtcttTTGGAATCTCTGAGCATTT GG3'	355pb
Alvo 3 – Exon 10	*Forward* 5'GATGGAAAAGGCCACAAGAA3' *Reverse* 5'CTAGGACAAGCAGTGGACGA3'	248pb
Alvo 4 – Exon 10 Alvo 5 – Exon 10	*Forward* 5'CGGGAAACAGGATGAATCAG3' *Reverse* 5'CTGCATTTCACAAGATTGCAC3'	401pb
Alvo 6 – Exon 11 Alvo 7 – Exon 11	*Forward* 5'CGGAGAACACAGACAAACCA3' *Reverse* 5'GTCATCGGGTGTGTTTCCAT3'	407pb

Tabela 11 – Informações sobre os pares de *primers* desenhados para amplificar os respectivos alvos selecionados para atuação do sistema CRISPR/Cas9 no *ncoa3*. Os *primers* específicos para a amplificação dos alvos 1 e 2 apresentam adaptadores M13 e Pigtail (representados em letras minúsculas), enquanto que os primers *forward* para os alvos 3 a 7 apresentavam fluoróforo 6-FAM já adicionados pelo fabricante.

5.5. Separação de fragmentos por eletroforese capilar e análise de atividade do sistema CRISPR/Cas9

Os amplicons resultantes da PCR com *primers* marcados com fluorescência foram diluídos em água na proporção 1:15, sendo adicionados 9µL de solução *GeneScan™ 500 ROX™ dye Size Standard* (Applied Biosystems) e formamida *Hi-Di* (Applied Biosystems) na proporção 1:120 a 1µL de PCR diluída. As amostras foram então enviadas para o Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, onde as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e depois aplicadas para eletroforese capilar no sequenciador ABI3730, 48 capilares (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os resultados foram analisados por meio do programa *GeneMarker V2.6.3*, o qual gera gráficos que indicam o tamanho e a quantidade dos fragmentos amplificados pela PCR com fluorescência.

O objetivo desta análise é comparar os amplicons dos embriões injetados com os dos não-injetados. Caso o sistema CRISPR/Cas9 seja bem sucedido em induzir mutações no gene, são esperados, além do pico referente ao comprimento do fragmento selvagem que contém o alvo, vários picos indicando fragmentos de tamanhos diferentes nos peixes injetados. Este resultado evidenciaria que os embriões em questão

apresentam mosaicismo com relação a mutações no gene-alvo, pois apresentariam tanto células com o genótipo selvagem quanto células contendo pequenas deleções e/ou inserções no gene-alvo, como esquematizado na Figura 10.

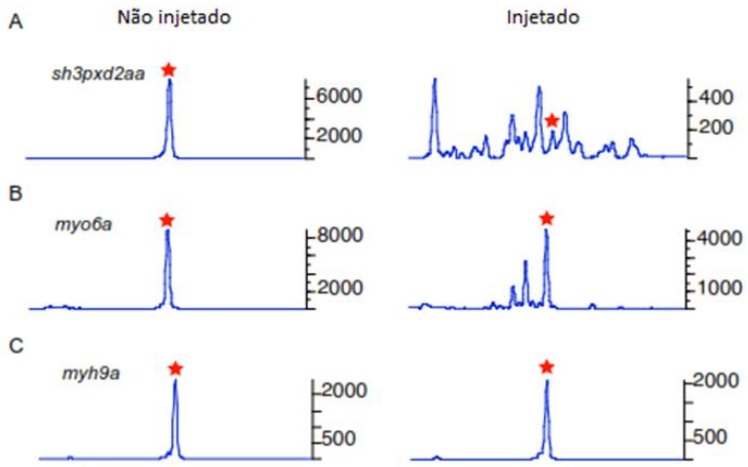


Figura 10 – Resultados esperados de picos de PCR fluorescente para sgRNAs com atividade do sistema CRISPR/Cas9 mediana (A), baixa (B) e inexistente (C). O eixo x mostra o tamanho dos fragmentos amplificados, com as estrelas indicando os picos correspondentes ao gene selvagem, enquanto que o eixo y mostra a altura dos picos, indicando a quantidade destes fragmentos. Figura adaptada de Carrington *et al.* 2015.

Resultados

1. Análise da expressão de RNAm de *Ncoa3* na cóclea de camundongo

1.1. RT-PCR de cóclea, de órgão de Corti associado à estria vascular e de músculo de camundongo

Como havia a possibilidade do gene candidato ser pouco expresso na cóclea e em virtude do órgão de Corti associado à estria vascular ser um órgão extremamente pequeno, optou-se por fazer a extração de RNA total a partir de um *pool* de 12 cócleas inteiras e de 12 órgãos de Corti. Em contraste, utilizamos apenas uma amostra de músculo de um único indivíduo para a extração de RNA total, com base na informação de que o *Ncoa3* é altamente expresso neste tecido. Em todos os casos, a extração de RNA total foi extremamente bem-sucedida, conforme podemos ver na tabela 12.

Tecido	Concentração de RNA (ng/µL)	Razão A260/A280	Razão A260/A230
Cóclea P4	1476,9	2,10	2,25
Cóclea P10	1676,7	2,06	2,20
Cóclea P16	1160,0	2,09	2,21
Órgão de Corti associada à estria vascular P10	105,0	2,09	1,15
Órgão de Corti associada à estria vascular P4	190,2	2,11	2,03
Órgão de Corti associada à estria vascular P16	164,5	2,11	1,18

Tabela 12 – Resultados da extração de RNA de *pool* de cócleas e de órgãos de Corti associados à estria vascular, nas diferentes idades.

Não foi verificada amplificação tanto nas reações de controle negativo da reação de síntese de cDNA (sem transcriptase reversa) quanto na de controle negativo da reação de RT-PCR (sem DNA), evidenciando ausência de contaminação nas amostras por RNA ou DNA genômico em ambas as reações. Observamos a amplificação do cDNA correspondente aos dois genes usados como controle-positivo de expressão (*Actb* e *B2m*) em todos tecidos estudados, mostrando que a RT-PCR foi bem-sucedida. Finalmente, evidenciamos a expressão do *Ncoa3* em todos os tecidos escolhidos (músculo, cóclea inteira e órgão de Corti associado à estria vascular) e em todas as

idades estudadas (P4, P10 e P16), sendo esta a primeira evidência da expressão do RNAm do gene candidato na cóclea, e, mais especificamente, no órgão de Corti e na estria vascular de camundongo. Estes resultados estão apresentados na Figura 11.

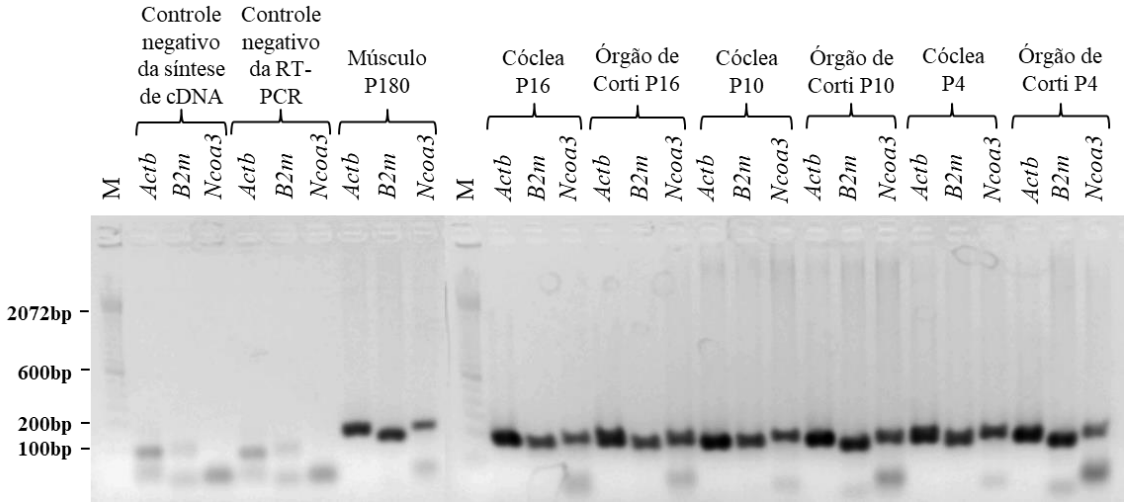


Figura 11 – Resultados da eletroforese em géis de agarose 2% para verificação de resultado de reações de RT-PCR nos controles negativos de síntese de cDNA, nos controles negativos de RT-PCR, nas amostras de músculo de camundongo P180 (controle positivo) e nas amostras de cóclea e de órgão de Corti associado à estria vascular de camundongos P4, P10 e P16. M corresponde ao marcador de peso molecular *100bp* (Invitrogen).

1.2. qRT-PCR de cóclea, de órgão de Corti associado à estria vascular, e de músculo de camundongo

A reação de qRT-PCR foi realizada com o intuito de se avaliar quantitativamente a expressão do RNAm do gene candidato comparando-se os mesmos tecidos e estágios do desenvolvimento utilizados na RT-PCR.

Assim como na RT-PCR, as reações de qRT-PCR também foram bem-sucedidas. Somente algumas reações de controle-negativo apresentaram formação de dímeros de *primer* (Figura 13). Não houve amplificação inespecífica por meio dos pares de *primer* utilizados e a amplificação na maioria das reações de controle negativo da qRT-PCR, conforme podemos observar nas figuras 12 e 13, respectivamente. Além disso, houve amplificação do cDNA tanto do gene usado como controle-positivo de expressão, *Actb*, quanto do gene *Ncoa3* em todos tecidos estudados (Figura 13).

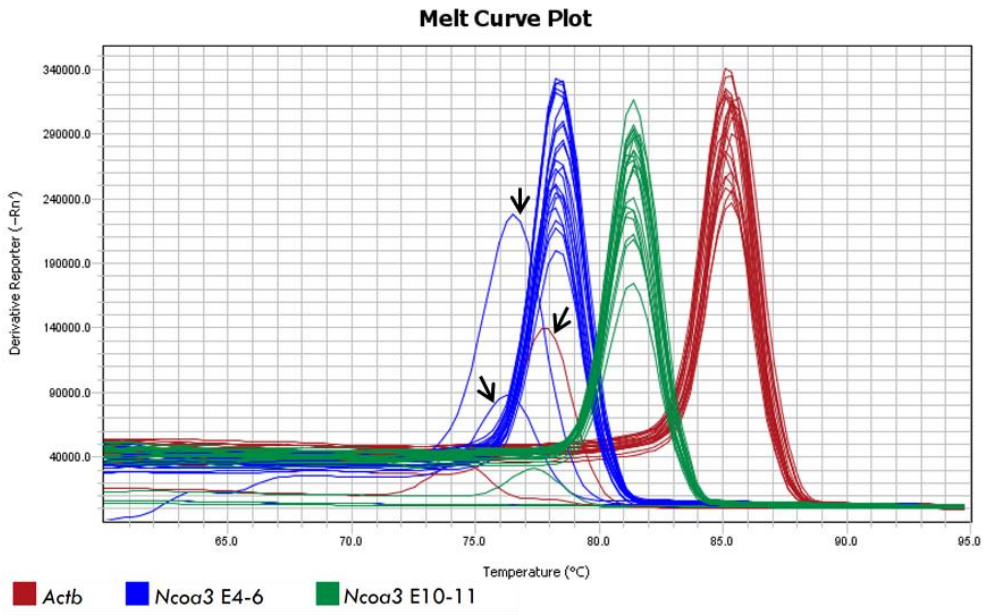


Figura 12 - Curva de *melting* dos três pares de *primers* utilizados nas reações de qRT-PCR. Todos os tecidos estudados (músculo, cóclea e órgão de Corti associado à estria vascular) amplificaram os mesmos fragmentos para estes conjuntos de *primers*, mostrando que não houve amplificação inespecífica nestes experimentos. As setas pretas apontam a formação de dímeros de *primer* em reações de controle negativo

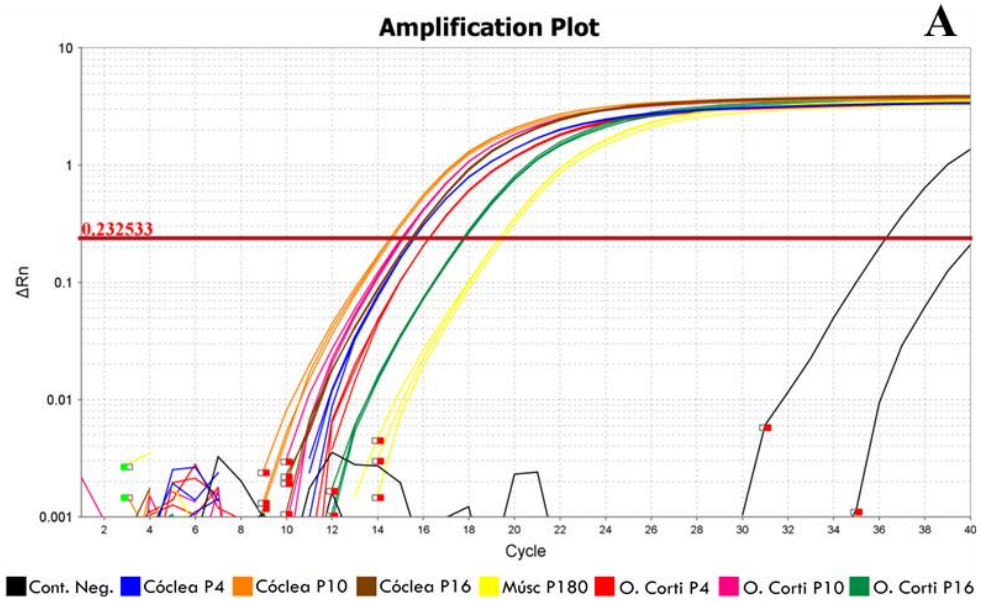
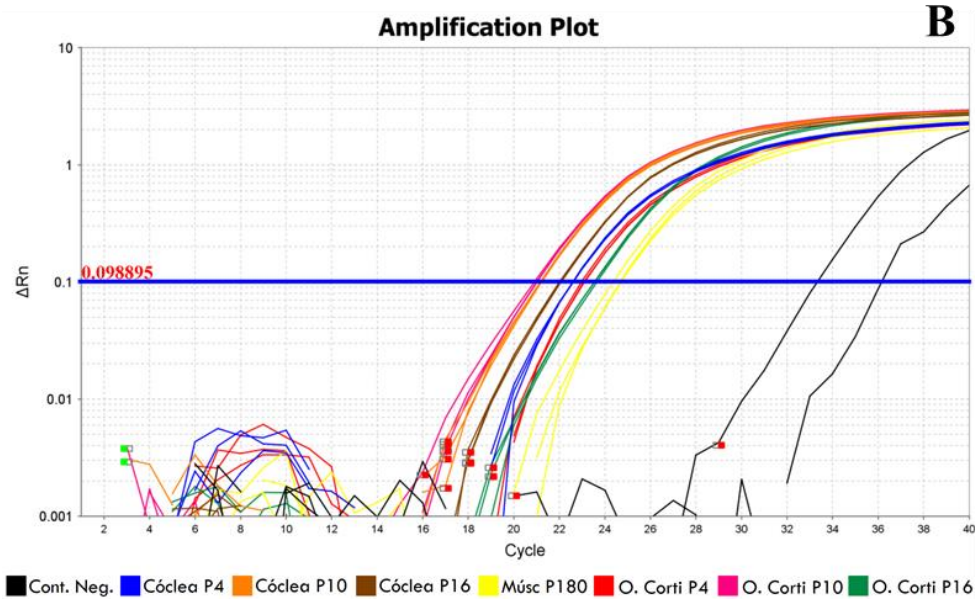


Figura 13 - Curvas de amplificação para os pares de *primers* que amplificam o cDNA dos genes *Actb* (A) e *Ncoa3* (B-exons 4 a 6 e C-exons 10 e 11) nas reações de qRT-PCR contendo cDNA das amostras de todos os tecidos estudados.



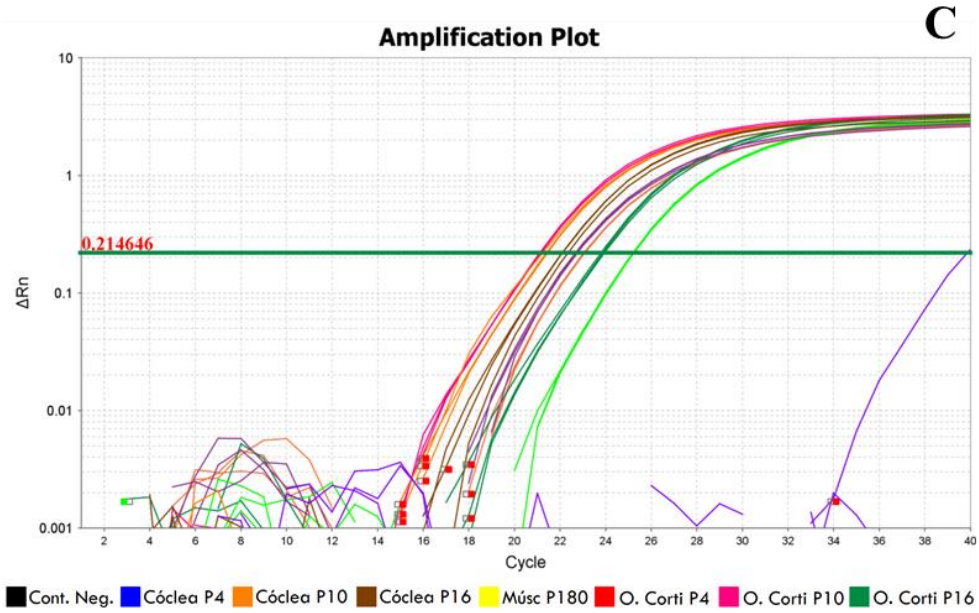


Figura 13 - Continuação

Pudemos observar um aumento na expressão relativa de *Ncoa3* nos estágios P10 e P16 em relação ao estágio P4. Estes resultados foram observados tanto na cóclea inteira como também quando apenas o órgão de Corti associado à estria vascular foi analisado (Figura 14 A). É interessante notar que o aumento da expressão relativa do *Ncoa3* foi maior quando foi analisado apenas o órgão de Corti associado à estria vascular, com aumento relativo na expressão gênica de até 87% em relação ao mesmo tecido em estágio P4 (Figura 14 B). No caso da cóclea inteira, observou-se aumento relativo na expressão gênica de até 37% em relação à cóclea em P4. Concluímos que o aumento de expressão de *Ncoa3* é mais notável no órgão de Corti do que na cóclea inteira.

Realizamos também os cálculos de expressão relativa do gene *Ncoa3* no órgão de Corti associado à estria vascular, comparando com a cóclea inteira da mesma idade. Observamos em todas as idades maior expressão do gene candidato no órgão de Corti associado à estria vascular quando comparado à cóclea inteira (Figura 15), sendo que este aumento relativo na expressão gênica chega a valores de até 64%. Estes dados sugerem que uma parcela significativa da expressão de *Ncoa3* da cóclea de camundongo está concentrada no órgão de Corti e na estria vascular.

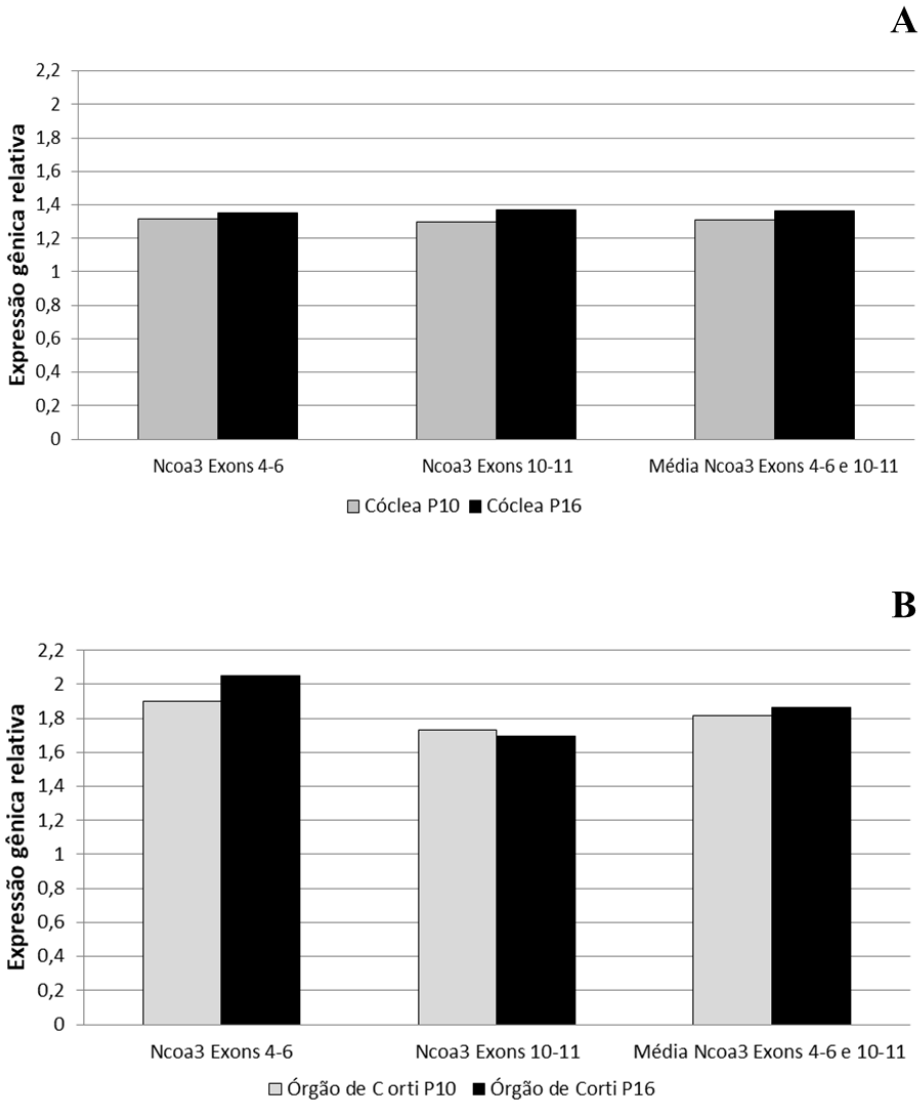


Figura 14 – Níveis de expressão relativa do gene *Ncoa3* obtidos após reações de qRT-PCR com amostras de cóclea (A) e de órgão de Corti associado a estria vascular (B). Os valores de expressão relativa calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ levam em consideração o valor de ΔC_t obtido para cada tecido em relação ao ΔC_t obtido para o mesmo tecido em estágio P4. É importante notar que, independentemente do par de *primer* utilizado para a amplificação do cDNA do gene candidato, nota-se um aumento na expressão do gene *Ncoa3* em estágios mais maduros (P10 e P16) do sistema auditivo de camundongo quando comparado ao estágio P4.

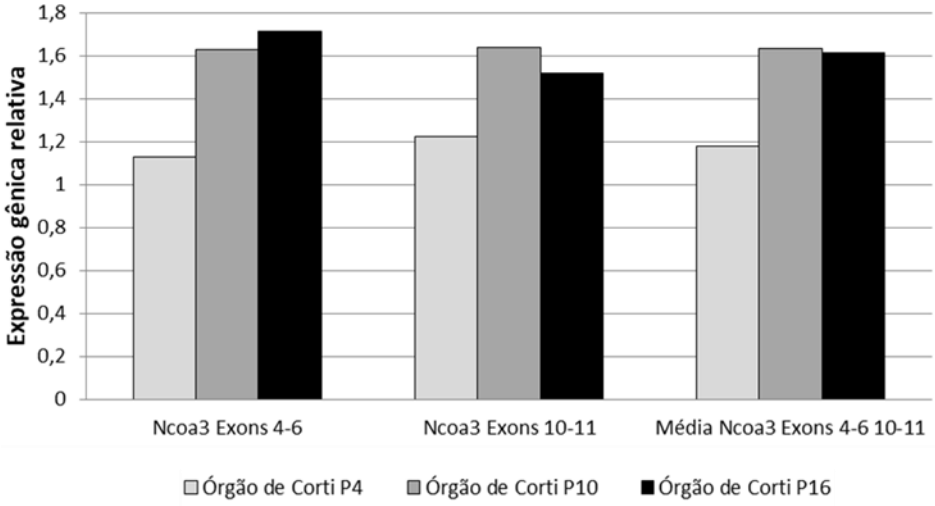


Figura 15 – Níveis de expressão relativa do gene *Ncoa3* obtidos após reações de qRT-PCR. Os valores de expressão relativa calculados com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ levam em consideração o valor de ΔC_t obtido para o órgão de Corti de determinada idade em relação ao ΔC_t obtido para a cóclea de mesma idade. É importante notar que, independentemente do par de *primers* utilizado para a amplificação do cDNA do gene candidato, o órgão de Corti associado à estria vascular sempre apresenta maior nível de expressão de gene *Ncoa3* em relação à cóclea inteira na mesma idade.

Contudo, é importante ressaltar que, em virtude do enorme número de cócleas necessário para estes experimentos, não foi possível repeti-los para que uma análise estatística fosse executada.

2. Expressão da proteína NCOA3 na cóclea de camundongo por meio de ensaio de imunofluorescência

Os experimentos de imunofluorescência foram padronizados inicialmente em músculo. Os ensaios de imunofluorescência revelaram alta expressão da proteína NCOA3 no músculo (Figura 16), tendo sido observada em elevado número de localizações no citoplasma e em alguns esparsos eventos de localização no núcleo (Figura 17 A), conforme o esperado.

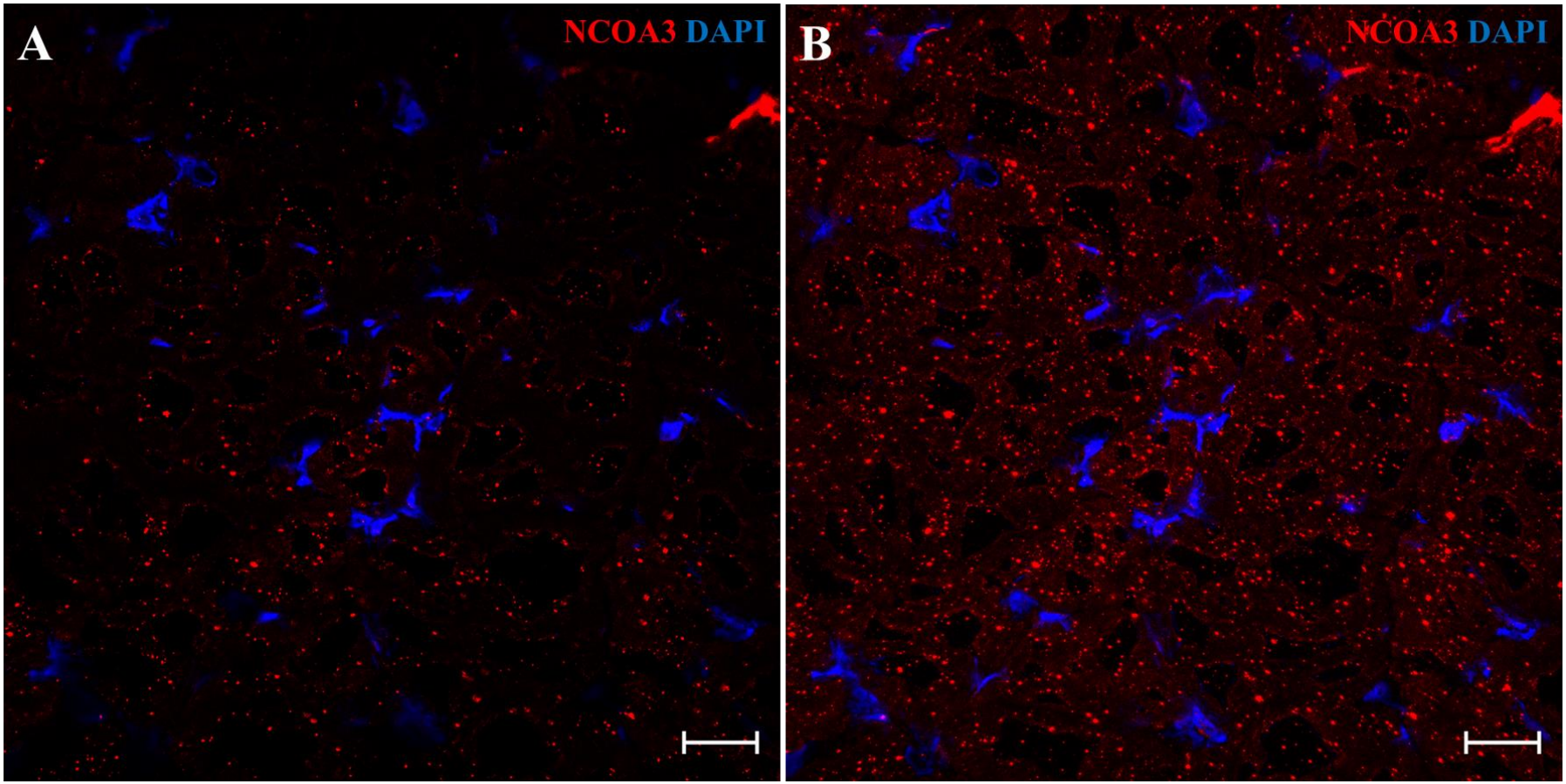


Figura 16 - Imunofluorescência em corte histológico transversal de músculo de camundongo P180. A proteína NCOA3 está marcada com o anticorpo anti-NCOA3 (vermelho), com núcleos marcados em azul por DAPI. A – Seção z 7 de 16 do ensaio de imunofluorescência em corte histológico de músculo de camundongo P180. B - Projeção de máxima intensidade do ensaio de imunofluorescência em corte histológico de músculo de camundongo P180. A imagem foi capturada com aumento de 40x com óleo de imersão. Barra de escala: 20µm.

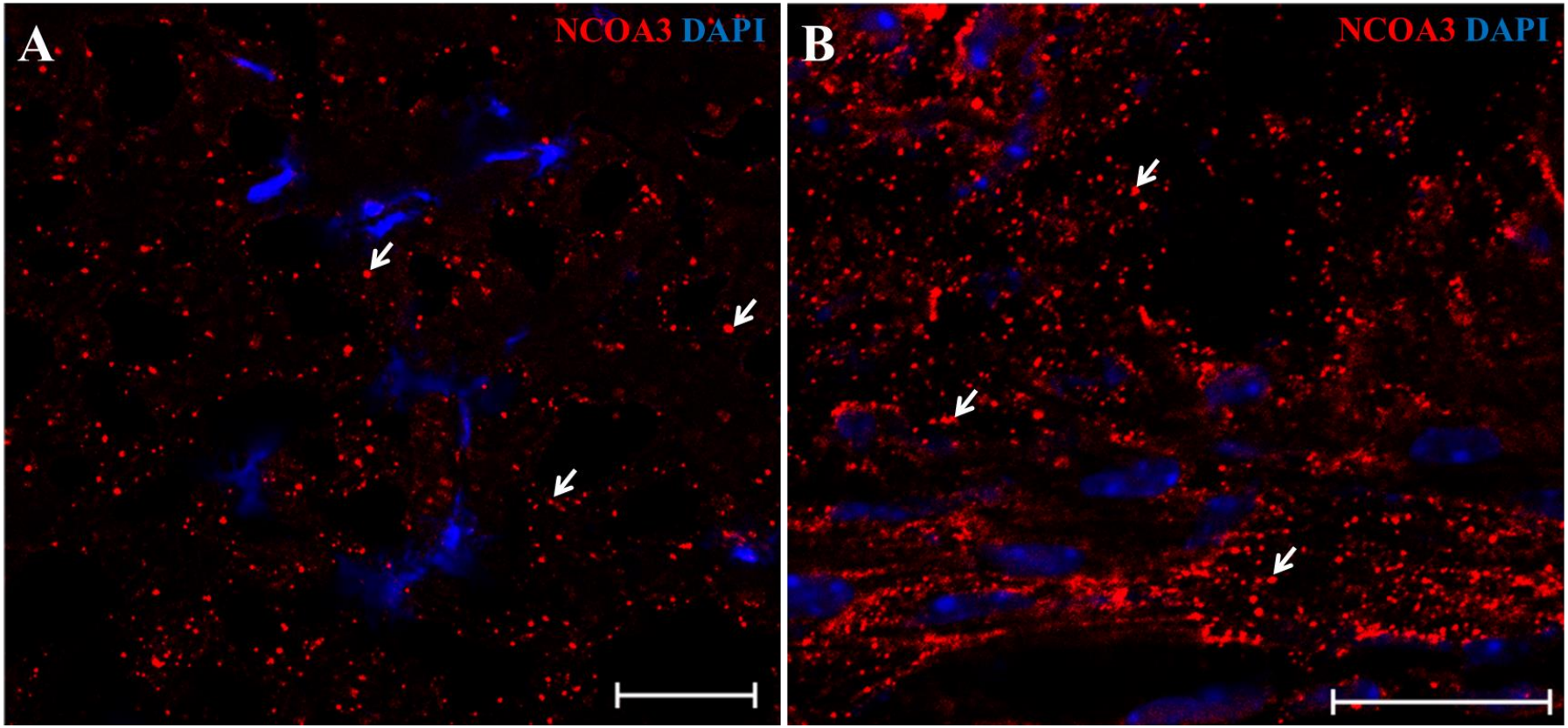


Figura 17 - Imunofluorescência em corte histológico transversal de músculo de camundongo P180 (A) e em corte histológico de cóclea de camundongo P14 (B). A proteína NCOA3 está marcada com o anticorpo anti-NCOA3 (vermelho), com núcleos marcados em azul por DAPI. A imagem foi capturada com aumento de 40x com óleo de imersão e ampliada. Em ambos os tecidos o padrão de expressão da proteína é predominantemente citoplasmático, conforme apontado pelas setas em branco. Barras de escala: 20µm.

Com relação à cóclea, o padrão de expressão observado desta proteína foi amplo e diversificado, com elevado número de sinais de presença de anticorpo fluorescente anti-NCOA3 em várias estruturas, entre elas: a membrana basilar, a membrana de Reissner, o órgão de Corti, a estria vascular, o limbo espiral e o gânglio espiral. Estas estruturas se encontram esquematizadas na figura 18, enquanto que os resultados estão mostrados nas figuras de A a I. O padrão de localização celular da proteína na cóclea segue o mesmo padrão observado no músculo, ou seja, predominantemente citoplasmático (Figura 17 B). Este padrão de expressão da proteína foi observado em todas as idades estudadas: P4 (Figuras 19-21), P10 (Figuras 22-24) e P14 (Figuras 25-27), o que sugere um papel importante desta proteína no desenvolvimento do sistema auditivo de camundongo.

Com estes resultados, somados aos dados obtidos por meio da RT-PCR e da qRT-PCR, conseguimos demonstrar pela primeira vez a expressão do *Ncoa3* na orelha interna de camundongo, tanto a nível do RNAm quanto a nível da proteína.

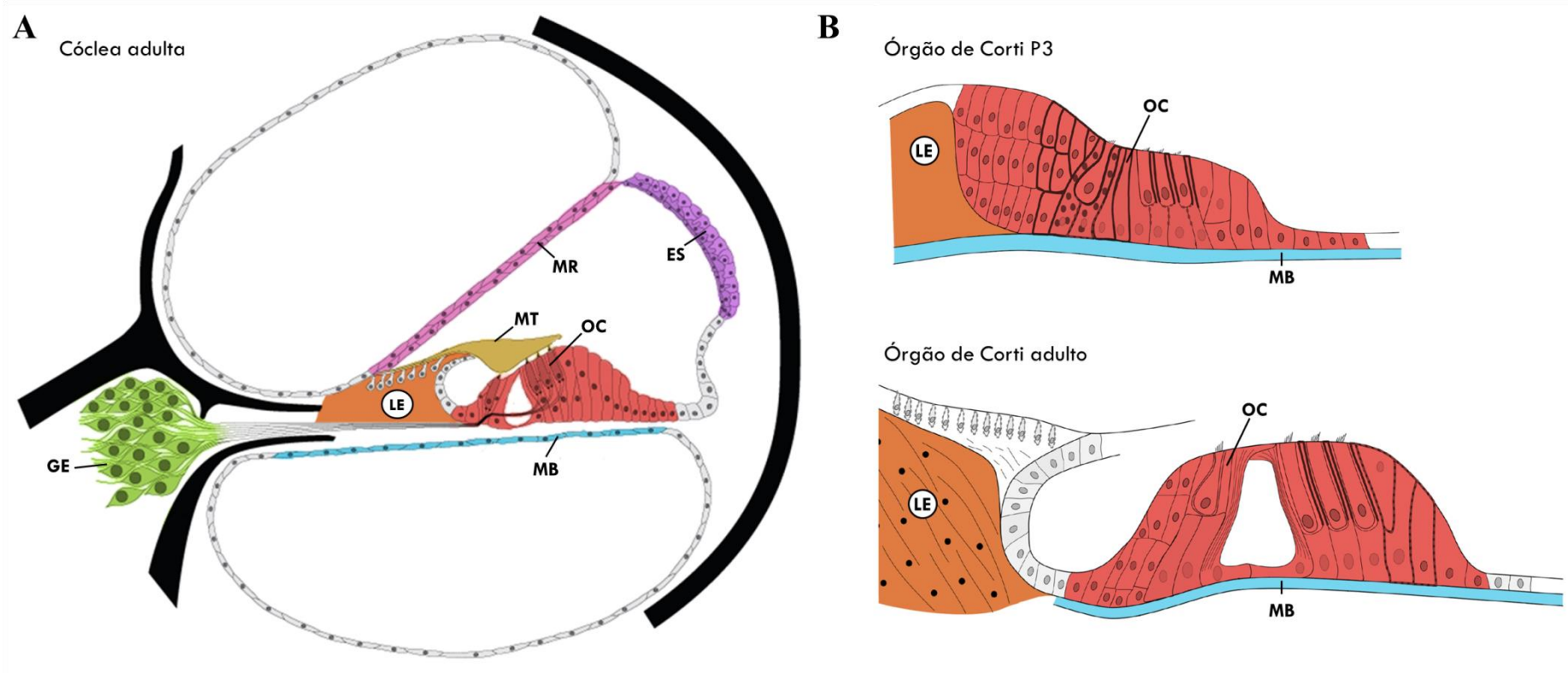


Figura 18 - Esquema de corte histológico de cóclea de camundongo adulto (A) e do órgão de Corti de camundongo em idade P3 e adulto (B). As estruturas de interesse estão indicadas com as siglas e com cores diferentes. GE= Gânglio espiral, LE= Limbo espiral, MB= Membrana basilar, MT= Membrana tectória, OC= Órgão de Corti.Figuras modificadas de hereditaryhearingloss.org e de Smeti *et al* (2012), respectivamente.

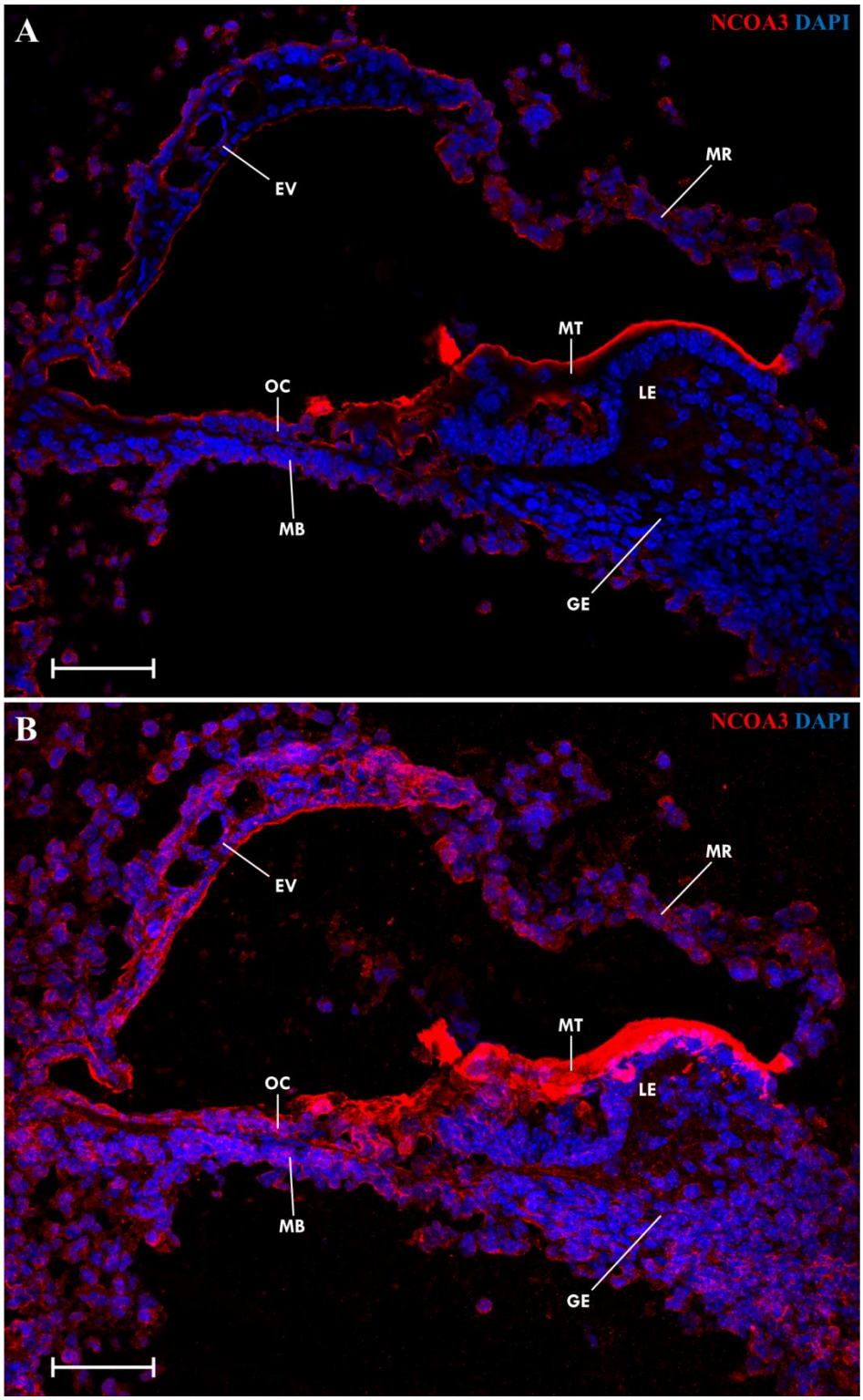


Figura 19 - Imunofluorescência em corte histológico de cóclea de camundongo P4. A proteína NCOA3 foi marcada com o anticorpo anti-NCOA3 (vermelho) e os núcleos foram marcados em azul por DAPI. A - Seção z 11 de 15 do ensaio de imunofluorescência. B - Projeção de máxima intensidade do ensaio de imunofluorescência do mesmo corte mostrado em A. A imagem foi capturada com aumento de 40x com óleo de imersão, com montagem de 4 campos de visão. Legenda: ES= Estria vascular, GE= Gânglio espiral, LE= Limbo espiral, MB= Membrana basilar, MR= Membrana de Reissner, MT= Membrana tectória, OC= Órgão de Corti. Barras de escala: 20µm.

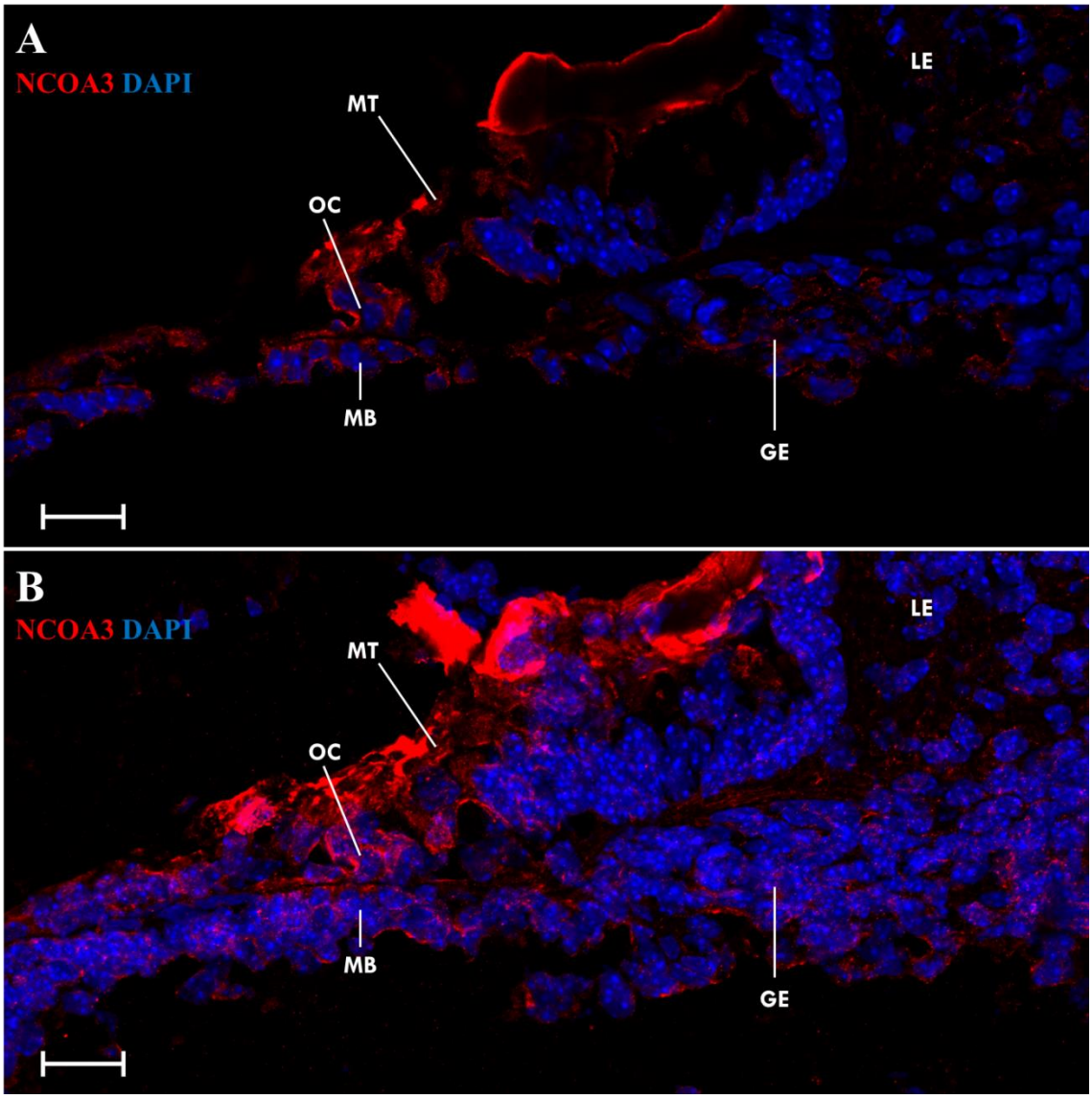


Figura 20 - Imunofluorescência em corte histológico de cóclea de camundongo P4, com enfoque no órgão de Corti e no gânglio espiral. A proteína NCOA3 foi marcada com o anticorpo anti-NCOA3 (vermelho) e os núcleos foram marcados em azul por DAPI. A - Seção z 10 de 20 do ensaio imunofluorescência. B - Projeção de máxima intensidade do ensaio de imunofluorescência do mesmo corte mostrado em A. As imagens foram capturadas com aumento de 63x com óleo de imersão, com montagem de 2 campos de visão. Legenda: GE= Gânglio espiral, LE= Limbo espiral, MB= Membrana basilar, MT= Membrana tectória, OC= Órgão de Corti. Barras de escala: 20µm.

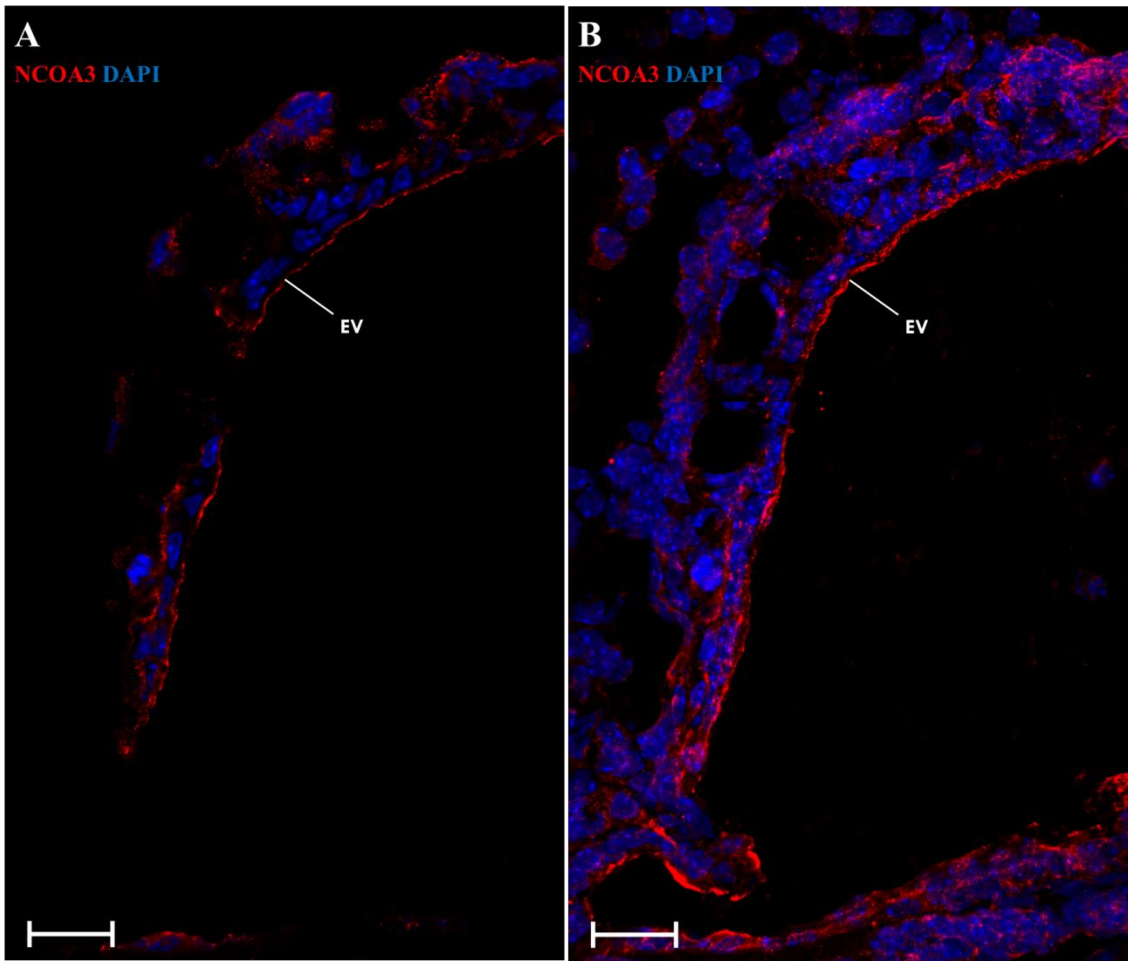


Figura 21 - Imunofluorescência em corte histológico de cóclea de camundongo P4, com enfoque na estria vascular. A proteína NCOA3 foi marcada com o anticorpo anti-NCOA3 (vermelho) e os núcleos foram marcados em azul por DAPI. A - Seção z 9 de 20 do ensaio de imunofluorescência. B - Projeção de máxima intensidade do ensaio de imunofluorescência do mesmo corte mostrado em A. As imagens foram capturadas com aumento de 63x com óleo de imersão e com montagem de 2 campos de visão. Legenda: EV= Estria vascular. Barras de escala: 20µm.

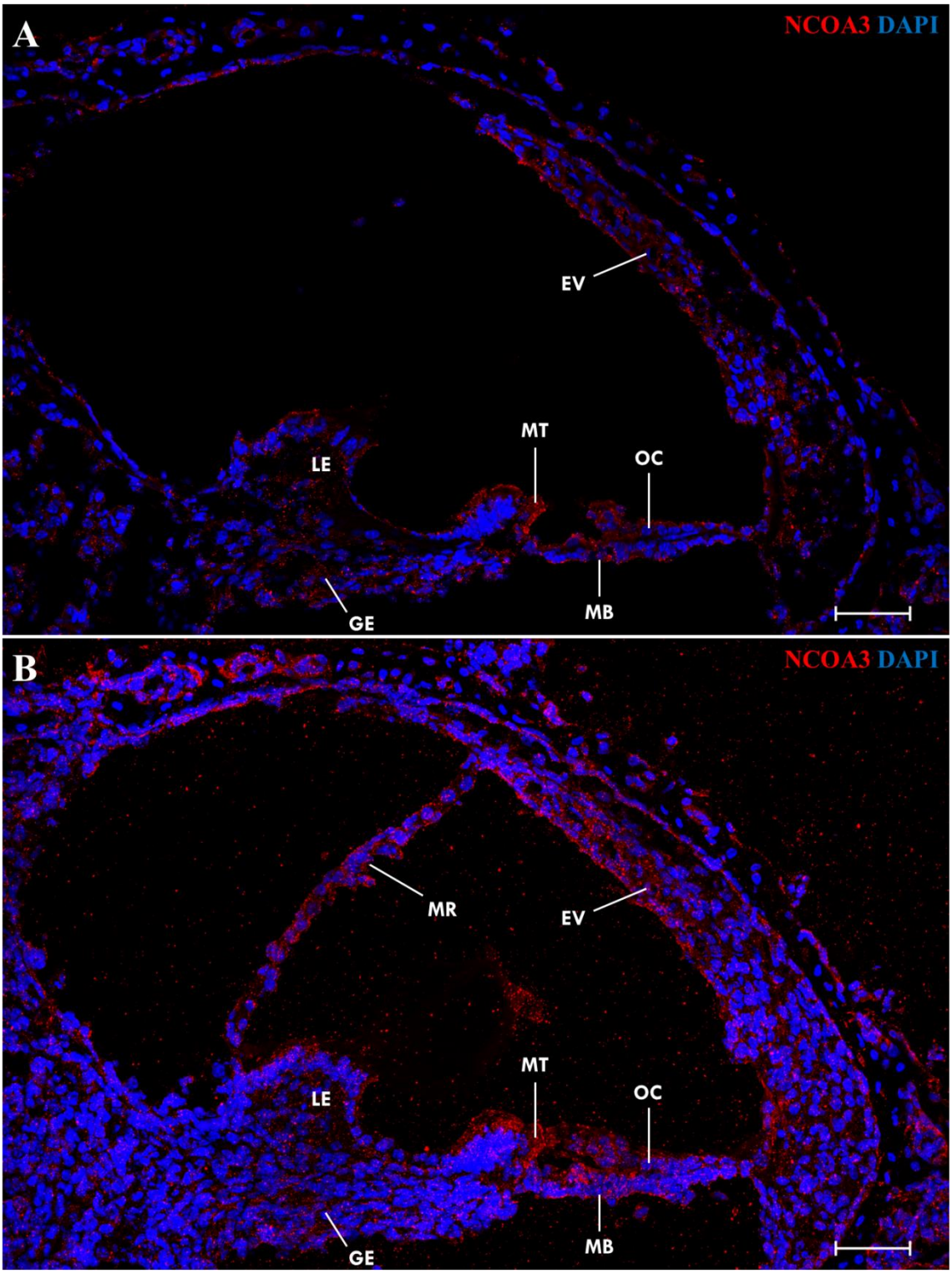


Figura 22 - Imunofluorescência em corte histológico de cóclea de camundongo P10. A proteína NCOA3 foi marcada com o anticorpo anti-NCOA3 (vermelho) e os núcleos foram marcados em azul por DAPI. A - Seção z 6 de 15 do ensaio de imunofluorescência. B - Projeção de máxima intensidade do ensaio de imunofluorescência do mesmo corte mostrado em A. A imagem foi capturada com aumento de 40x com óleo de imersão, com montagem de 4 campos de visão. Legenda: ES= Estria vascular, GE= Gânglio espiral, LE= Limbo espiral, MB= Membrana basilar, MR= Membrana de Reissner, MT= Membrana tectória, OC= Órgão de Corti. Barras de escala: 20µm.

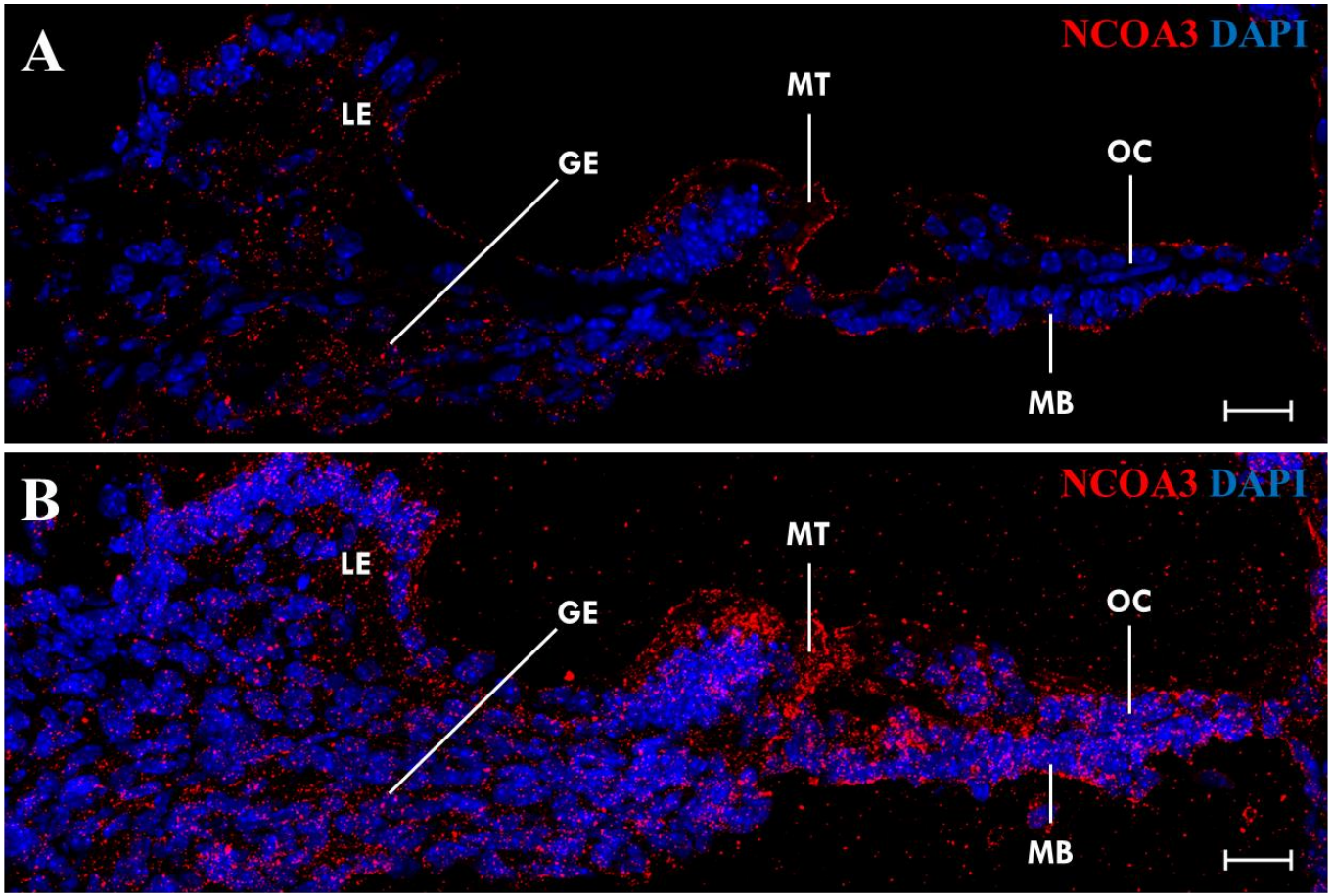


Figura 23 - Imunofluorescência em corte histológico de cóclea de camundongo P10, com enfoque no órgão de Corti e no gânglio espiral. A proteína NCOA3 foi marcada com o anticorpo anti-NCOA3 (vermelho) e os núcleos foram marcados em azul por DAPI. A - Seção z 9 de 20 do ensaio de imunofluorescência. B - Projeção de máxima intensidade do ensaio de imunofluorescência do mesmo corte mostrado em A. As imagens foram capturadas com aumento de 63x com óleo de imersão, com montagem de 3 campos de visão. Legenda: GE= Gânglio espiral, LE= Limbo espiral, MB= Membrana basilar, MT= Membrana tectória, OC= Órgão de Corti. Barras de escala: 20µm.

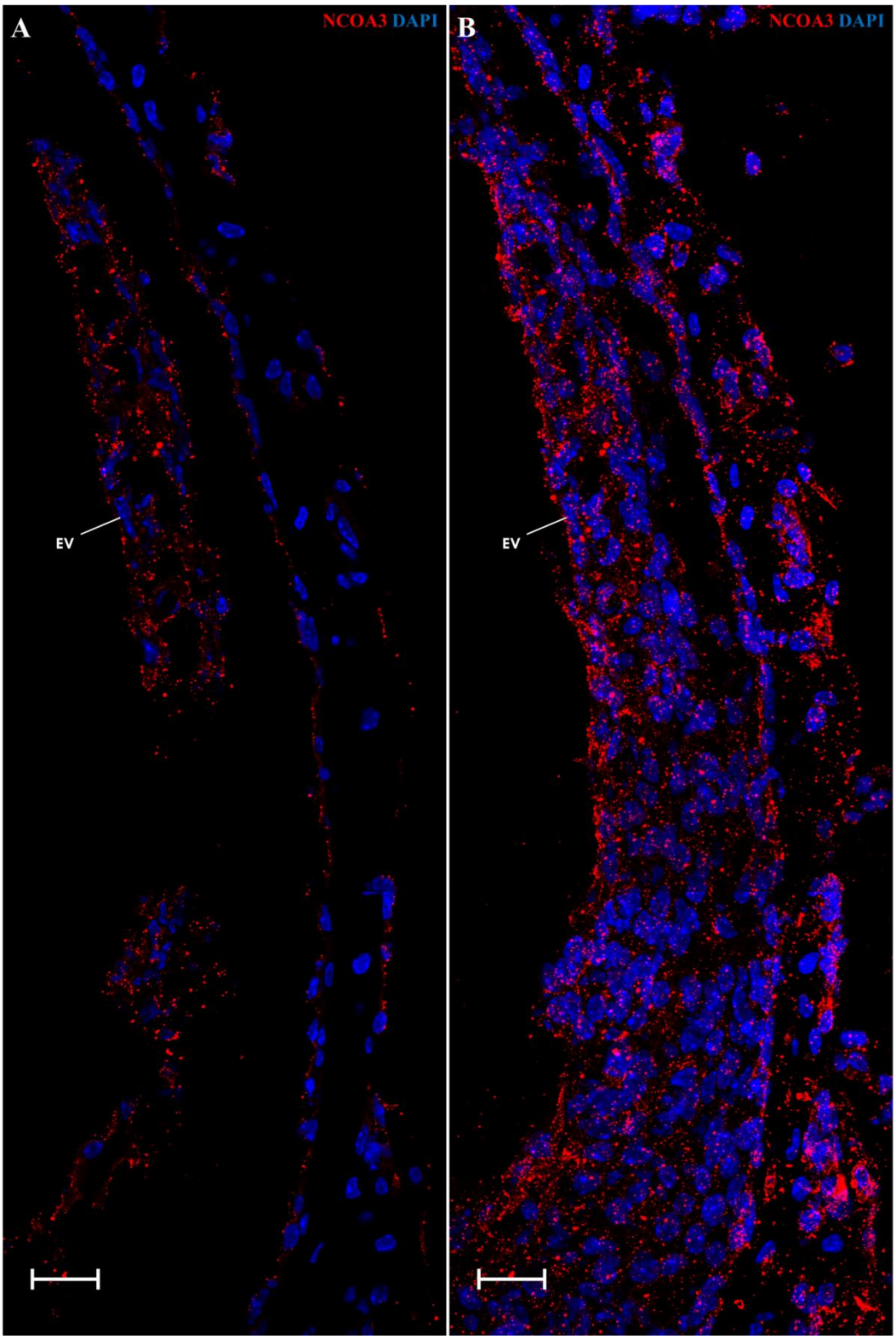


Figura 24 - Imunofluorescência em corte histológico de cóclea de camundongo P10, com enfoque na estria vascular. A proteína NCOA3 foi marcada com o anticorpo anti-NCOA3 (vermelho) e os núcleos foram marcados em azul por DAPI. A - Seção z 11 de 20 do ensaio de imunofluorescência. B - Projeção de máxima intensidade do ensaio de imunofluorescência do mesmo corte mostrado em A. As imagens foram capturadas com aumento de 63x com óleo de imersão e com montagem de 3 campos de visão. Legenda: EV= Estria vascular. Barras de escala: 20µm.

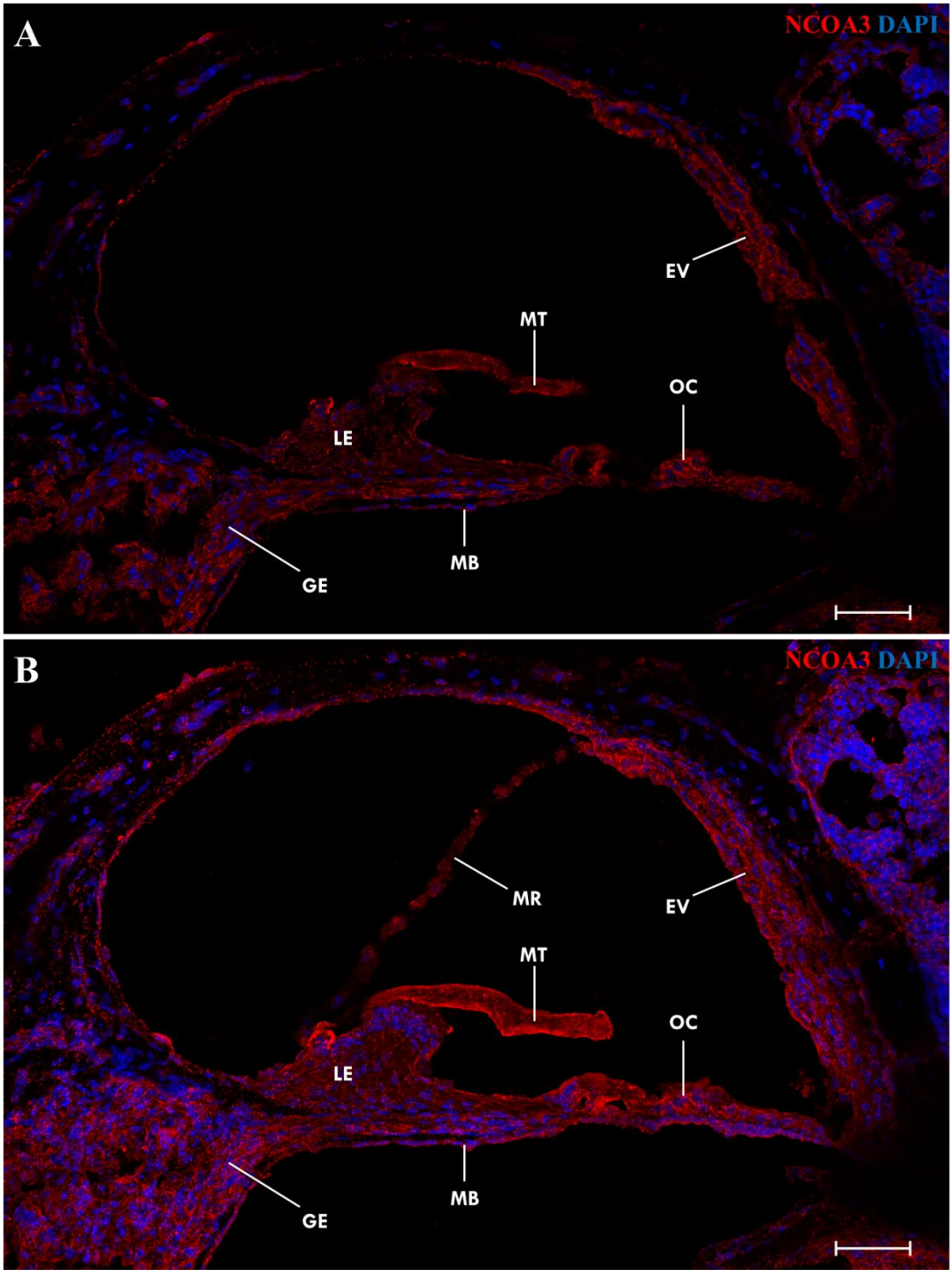


Figura 25 - Imunofluorescência em corte histológico de cóclea de camundongo P14. A proteína NCOA3 foi marcada com o anticorpo anti-NCOA3 (vermelho) e os núcleos foram marcados em azul por DAPI. A - Seção z 7 de 15 do ensaio de imunofluorescência. B - Projeção de máxima intensidade do ensaio de imunofluorescência do mesmo corte mostrado em A. A imagem foi capturada com aumento de 40x com óleo de imersão, com montagem de 6 campos de visão. Legenda: ES= Estria vascular, GE= Gânglio espiral, LE= Limbo espiral, MB= Membrana basilar, MR= Membrana de Reissner, MT= Membrana tectória, OC= Órgão de Corti. Barras de escala: 50µm.

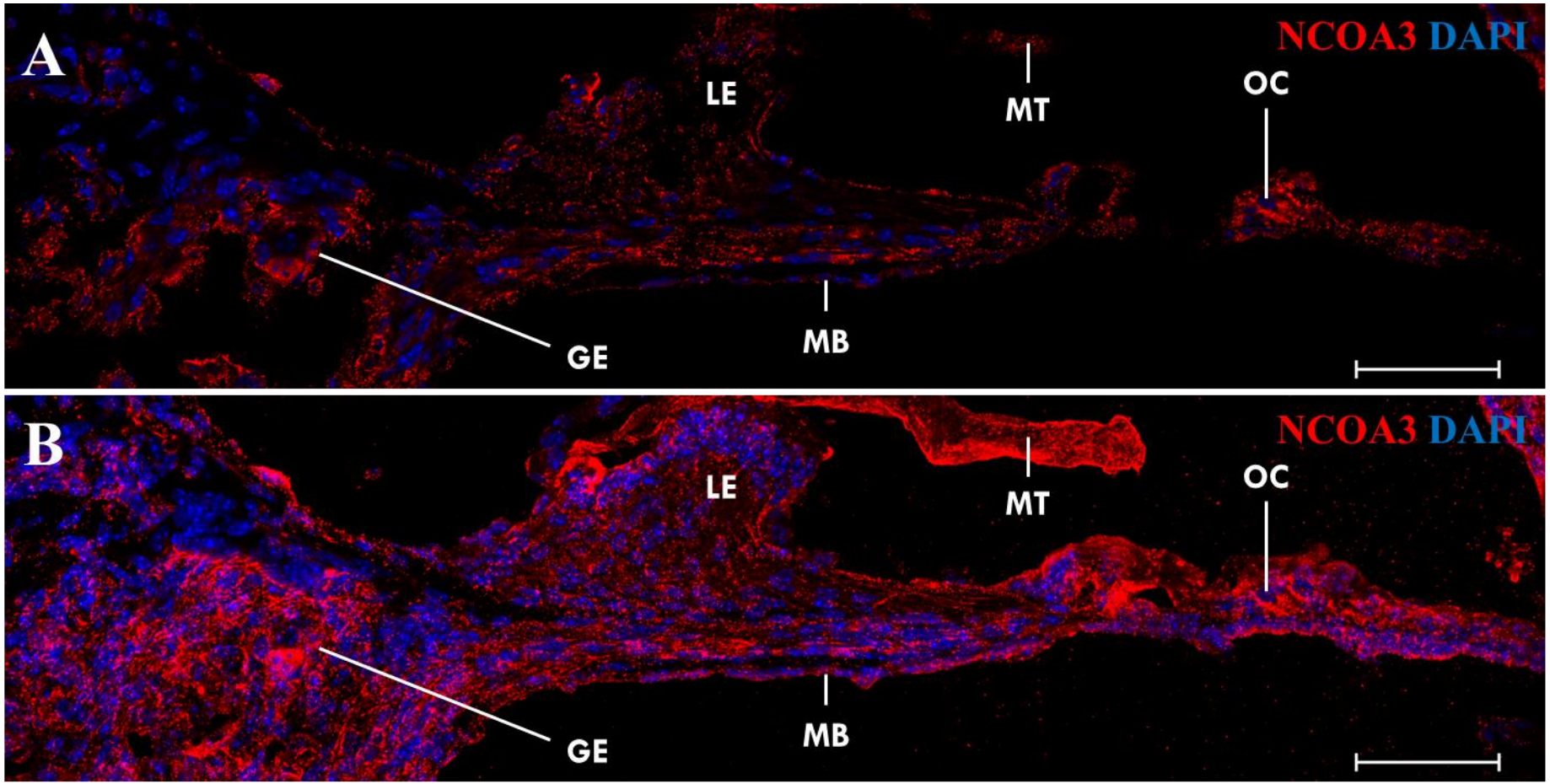


Figura 26 - Imunofluorescência em corte histológico de cóclea de camundongo P14, com enfoque no órgão de Corti e no gânglio espiral. A proteína NCOA3 foi marcada com o anticorpo anti-NCOA3 (vermelho) e os núcleos foram marcados em azul por DAPI. A - Seção z 6 de 20 do ensaio de imunofluorescência. B - Projeção de máxima intensidade do ensaio de imunofluorescência do mesmo corte mostrado em A. As imagens foram capturadas com aumento de 63x com óleo de imersão, com montagem de 4 campos de visão. Legenda: GE= Gânglio espiral, LE= Limbo espiral, MB= Membrana basilar, MT= Membrana tectória, OC= Órgão de Corti. Barras de escala: 50µm.

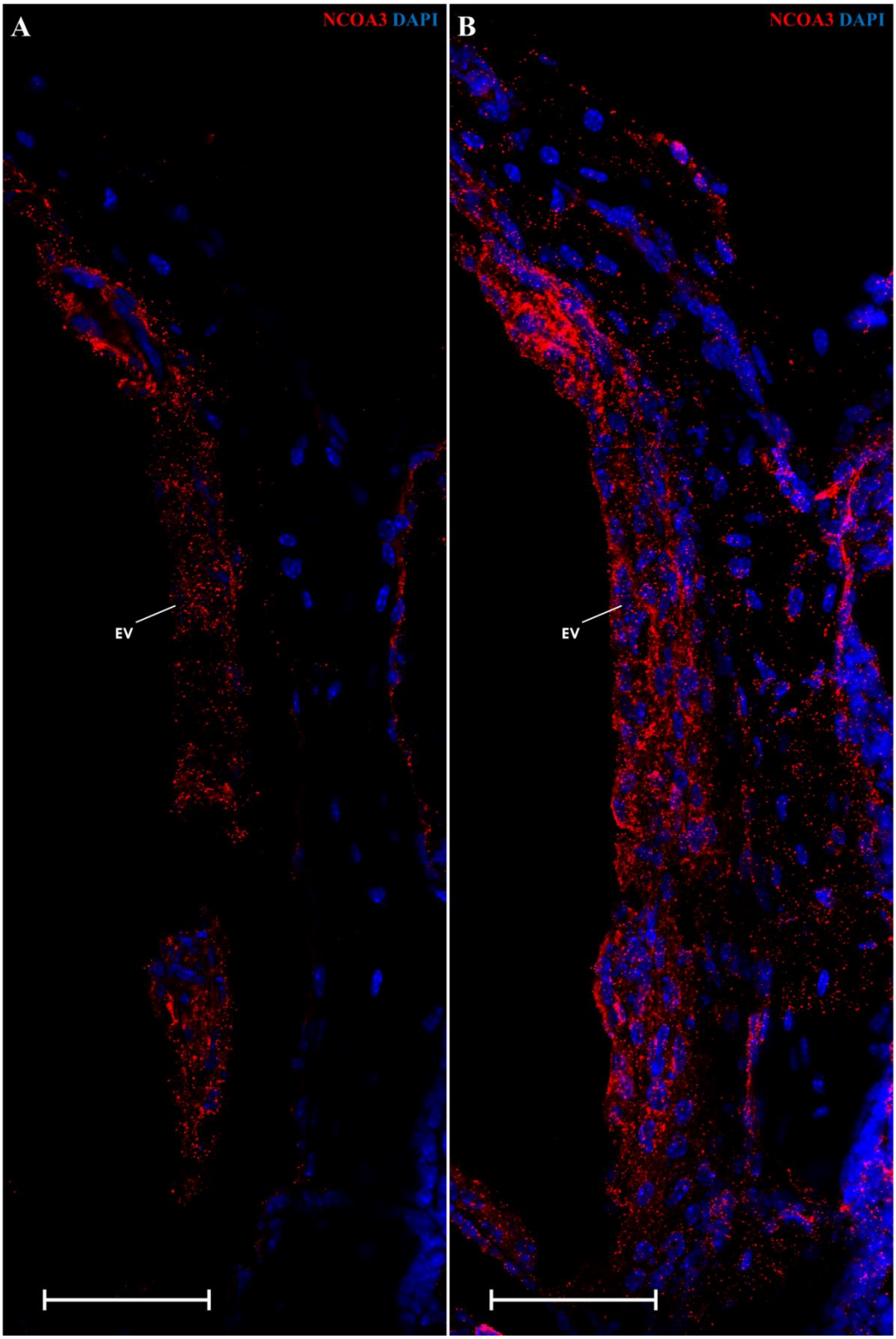


Figura 27 - Imunofluorescência em corte histológico de cóclea de camundongo P14, com enfoque na estria vascular. A proteína NCOA3 foi marcada com o anticorpo anti-NCOA3 (vermelho) e os núcleos foram marcados em azul por DAPI. A - Seção z 14 de 20 do ensaio de imunofluorescência. B - Projeção de máxima intensidade do ensaio de imunofluorescência do mesmo corte mostrado em A. As imagens foram capturadas com aumento de 63x com óleo de imersão e com montagem de 3 campos de visão. Legenda: EV= Estria vascular. Barras de escala: 50µm.

3. Análise da expressão de RNAm de *ncoa3* em *zebrafish* por meio de hibridação *in situ* em animal inteiro

A orelha interna de *zebrafish* começa a se desenvolver a partir de 16hpf e no estágio 18hpf a formação do primórdio da orelha interna, conhecida como vesícula ótica, está completa (Bever e Fekete, 2002). Podemos observar na figura 28 que não foi detectada a expressão do RNAm do gene *ncoa3* neste estágio inicial do desenvolvimento (18hpf) da orelha interna, nem no estágio 1dpf (Figura 29). Contudo, observamos que o gene candidato está expresso na vesícula ótica, posteriormente, nos estágios 3dpf e 5dpf (Figuras 30 e 31, respectivamente). Estes resultados sugerem que o gene *ncoa3* deve ter um papel no desenvolvimento do sistema auditivo do *zebrafish*, principalmente a partir do estágio 3dpf.

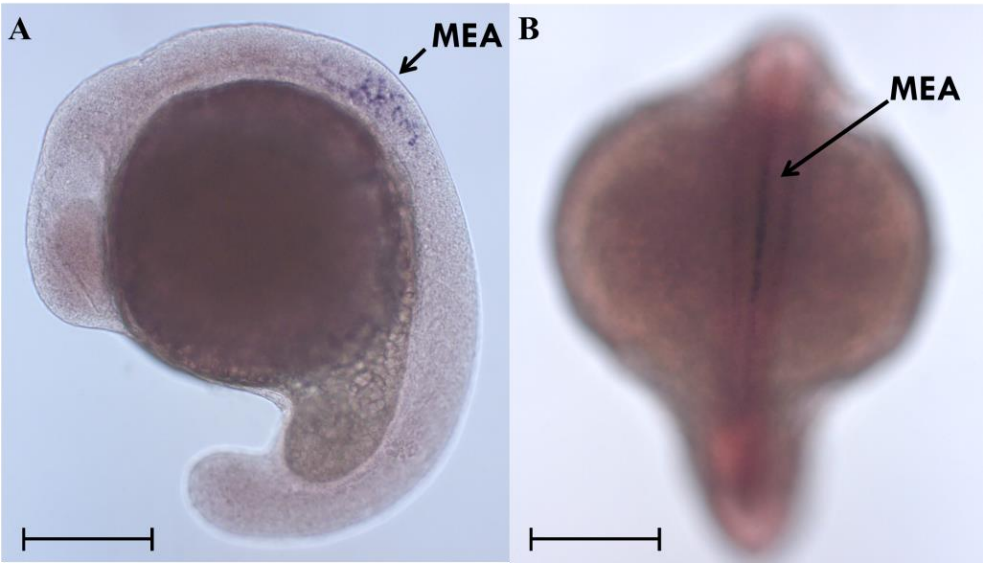


Figura 28 – Hibridação *in situ* com sonda de RNA para o exon 11 do gene *ncoa3* em larvas selvagens de *zebrafish* 18hpf, mostrando expressão do gene apenas na porção anterior da medula espinhal. A- Visão lateral do embrião. B- Visão dorsal do embrião. MEA= Medula espinhal (porção anterior). Barras de escala: 200µm.

Figura 29 – Hibridação *in situ* com sonda de RNA para o exon 11 do gene *ncoa3* em larvas selvagens de *zebrafish* 1dpf, mostrando expressão do gene apenas na porção anterior da medula espinhal e na fronteira entre mesencéfalo e rombencéfalo. A- Visão lateral do embrião. B- Visão dorsal do embrião, com focalização no rombencéfalo. C - Visão dorsal do embrião, com focalização na porção anterior da medula espinhal. FMR= Fronteira entre mesencéfalo e rombencéfalo, MEA= Medula espinhal (porção anterior). Barras de escala: 200µm.

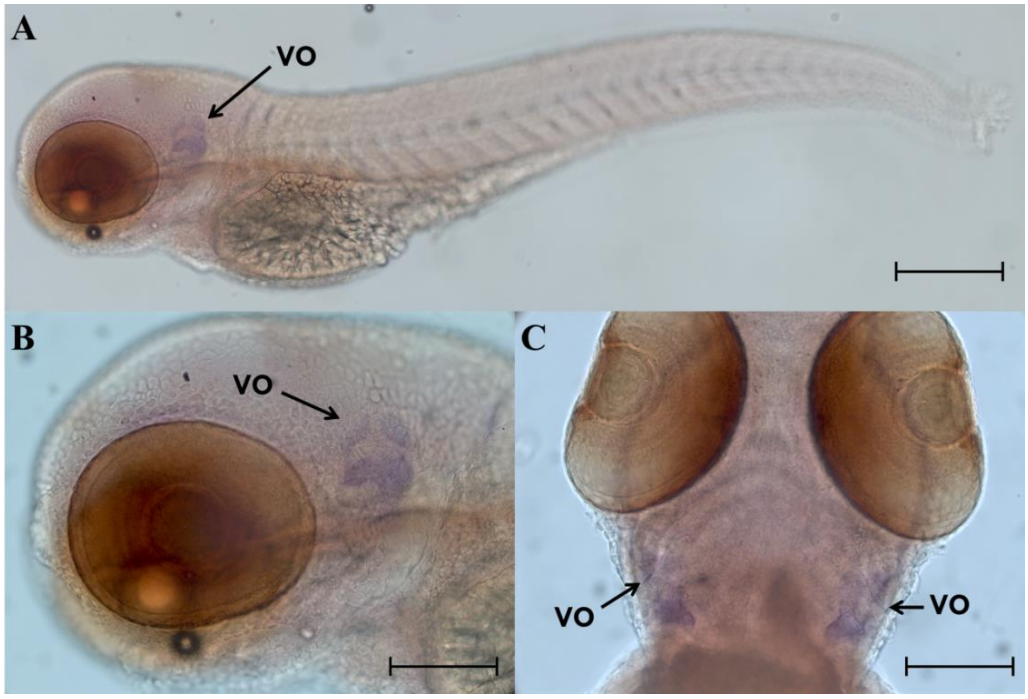


Figura 30 – Hibridação *in situ* com sonda de RNA para o exon 11 do gene *ncoa3* em larvas selvagens de *zebrafish* 3dpf, mostrando expressão do gene na vesícula ótica. A- Visão lateral do embrião. B- Visão dorsal do embrião, com focalização na cabeça. C - Visão dorsal do embrião, com focalização na cabeça. VO= Vesícula ótica. Barras de escala: 200µm (A) e 100µm (B e C).

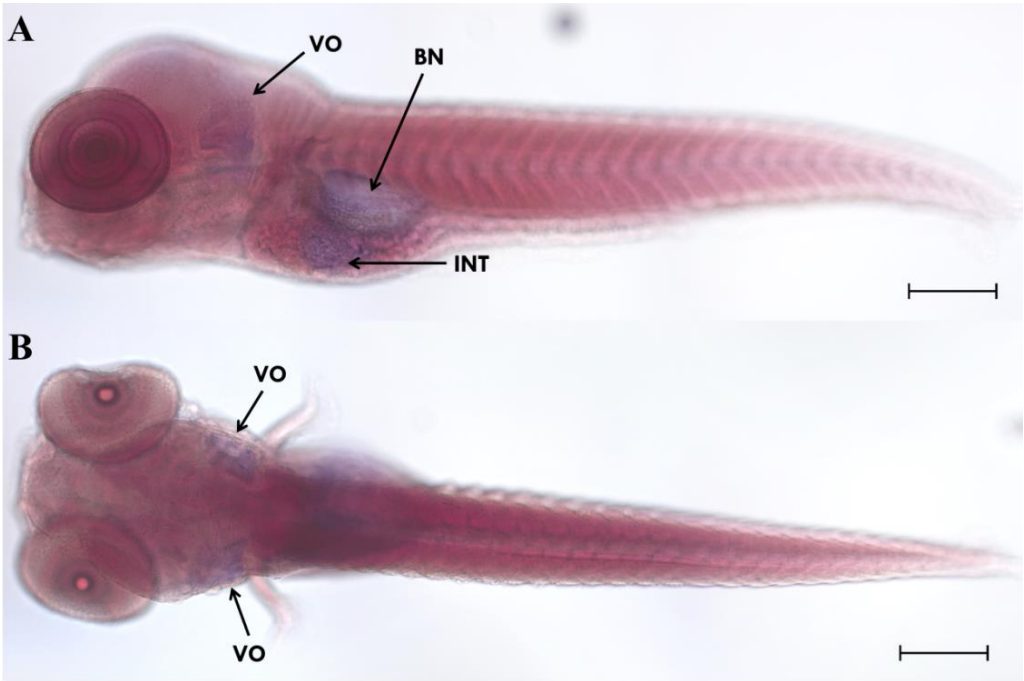


Figura 31 – Hibridação *in situ* com sonda de RNA para o exon 11 do gene *ncoa3* em larvas selvagens de *zebrafish* 5dpf, mostrando expressão do gene na vesícula ótica, na bexiga natatória e no intestino. A- Visão lateral do embrião. B- Visão dorsal do embrião. BN= Bexiga natatória, INT= Intestino, VO= Vesícula ótica. Barras de escala: 200µm.

No mesmo estudo, Bever e Fekete (2002) descreveram que a orelha interna de *zebrafish* está plenamente formada no estágio 20dpf. Curiosamente, em juvenis com 5 e 7 semanas de idade, também foi observada a expressão de *ncoa3* na orelha interna, já completamente desenvolvida (Figuras 32 e 33, respectivamente), o que indica um possível papel deste gene na fisiologia do sistema auditivo do juvenil de *zebrafish*.

Em nenhum dos estágios estudados foi detectada a expressão do RNAm do gene candidato nos neuromastos.

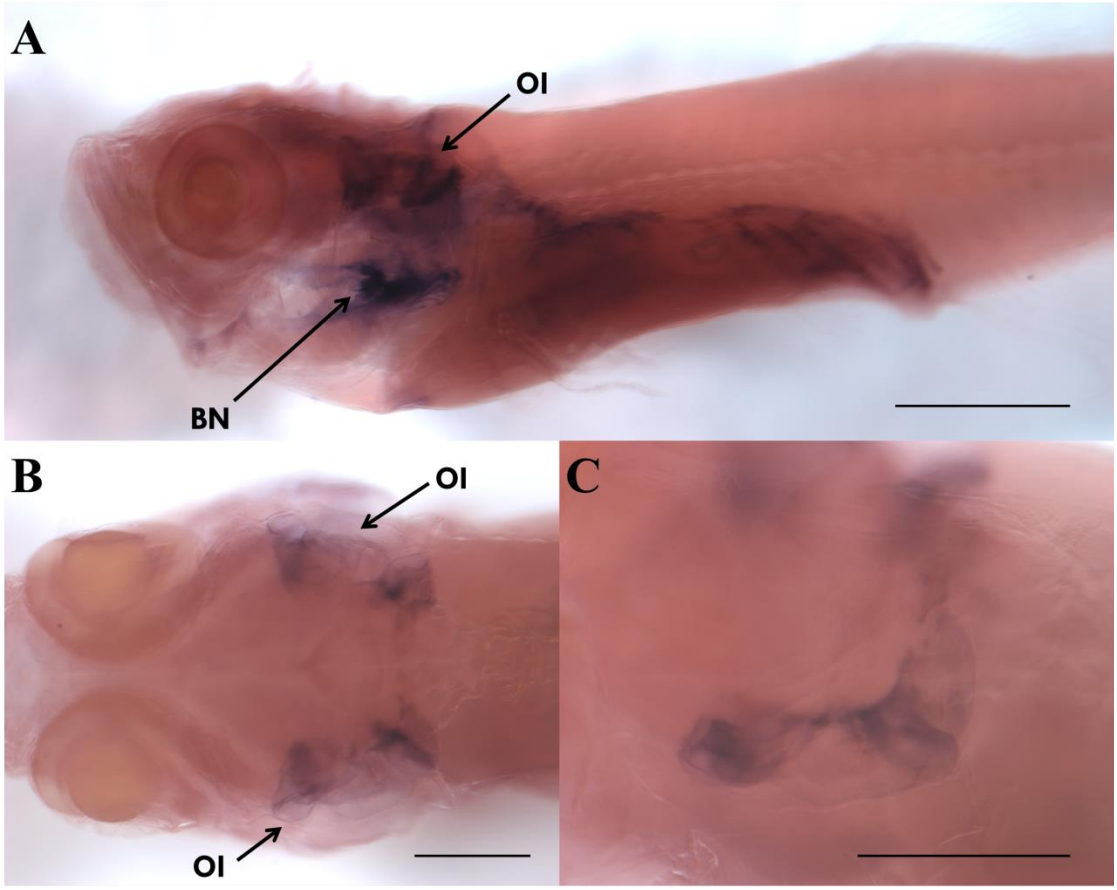


Figura 32 - Hibridação *in situ* com sonda de RNA para o gene *ncoa3* em *zebrafish* juvenil com 5 semanas de idade. A- Expressão de *ncoa3* na orelha interna e na bexiga natatória. B- Visão dorsal do mesmo espécime, com focalização na cabeça. C- Região da orelha interna do *zebrafish*, mostrando em maior detalhe a marcação do *ncoa3*. OI= Orelha interna, BN= Bexiga natatória. Barras de escala: 1mm (A) e 500µm (B e C).

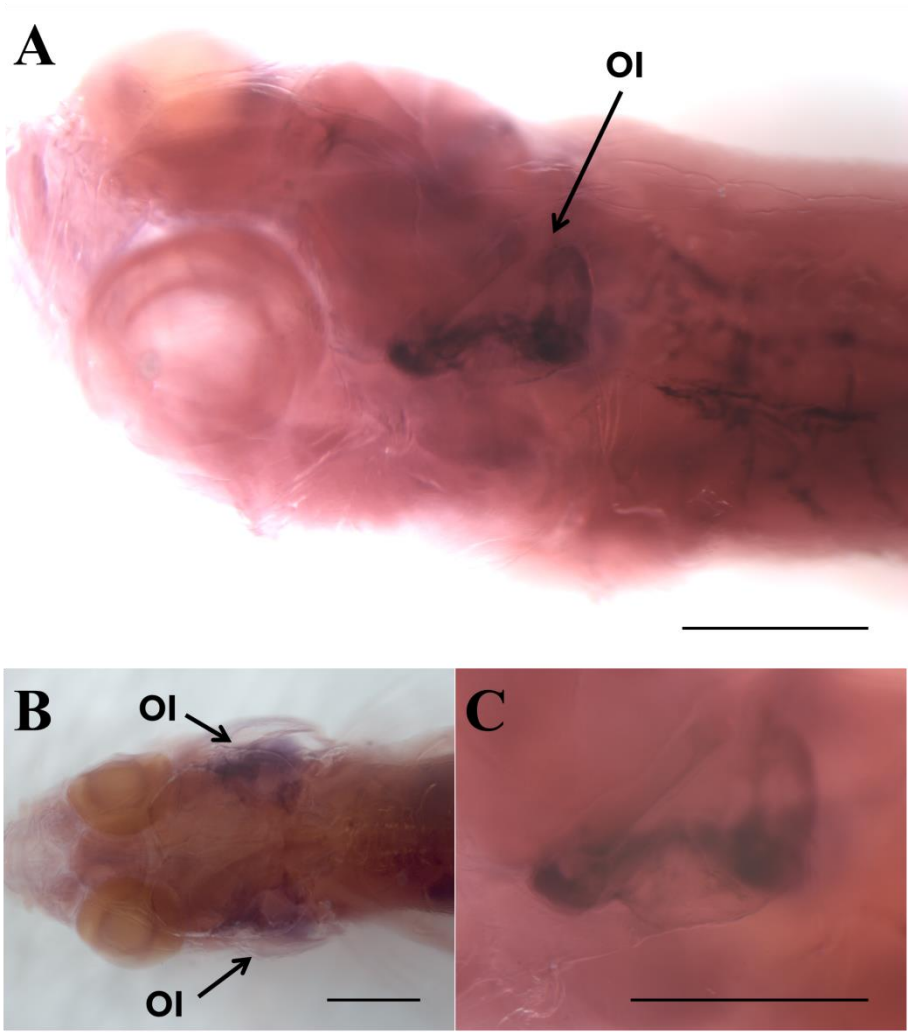


Figura 33 - Hibridação *in situ* com sonda de RNA para o gene *ncoa3* em *zebrafish* juvenil com 7 semanas de idade. A- Expressão de *ncoa3* na orelha interna. B- Visão dorsal do mesmo espécime, com focalização na cabeça. C- Região da orelha interna do *zebrafish*, mostrando em maior detalhe a marcação do *ncoa3*. OI= Orelha interna. Barras de escala: 500µm.

4. Edição gênica do gene *ncoa3* pelo sistema CRISPR/Cas9 em *zebrafish*

Os experimentos de edição do gene *ncoa3* tiveram o propósito de produzir um animal *knock-out*, para evidenciar os potenciais efeitos da ausência do gene no desenvolvimento da orelha interna de *zebrafish*.

As análises realizadas por meio do pacote computacional *Zifit Targeter version 4.2* indicaram dois alvos potenciais para ação do sistema CRISPR/Cas9 no exon 5, sem alvos colaterais (ou seja, sem outras sequências de DNA de *D. rerio* no qual o sistema CRISP/Cas9 poderia atuar, além do alvo desejado): os sgRNAs 1 e 2 .

Após a transcrição *in vitro* e purificação bem-sucedidas do RNAm da Cas9 e dos sgRNAs 1 e 2, realizamos três experimentos de injeção (Tabela 13). Em seguida, foi realizada a amplificação por PCR fluorescente do DNA extraído de *pools* de embriões com idades entre 1 e 3 dpf dos diferentes experimentos, seguida da separação dos fragmentos por eletroforese capilar. Contudo, como podemos ver na figura 34, observou-se um pico apenas, evidenciando que não houve indução de mutação pelo sistema CRISPR/Cas9.

	Experimento 1		**Experimento 2**		**Experimento 3**	
	sgRNA 1	**sgRNA 2**	**sgRNA 1**	**sgRNA 2**	**sgRNA 1**	**sgRNA 2**
RNAm de Cas9 (pg)	210	210	140	140	105	105
sgRNA (pg)	420	420	17,5	17,5	35	35
Ovos injetados	160	375	50	110	59	57
Total de embriões testados	20	30	15	30	30	15

Tabela 13 – Resumo dos experimentos de injeção de CRISPR/Cas9 realizados para cada um dos dois primeiros sgRNAs desenhados, sgRNA 1 e 2.

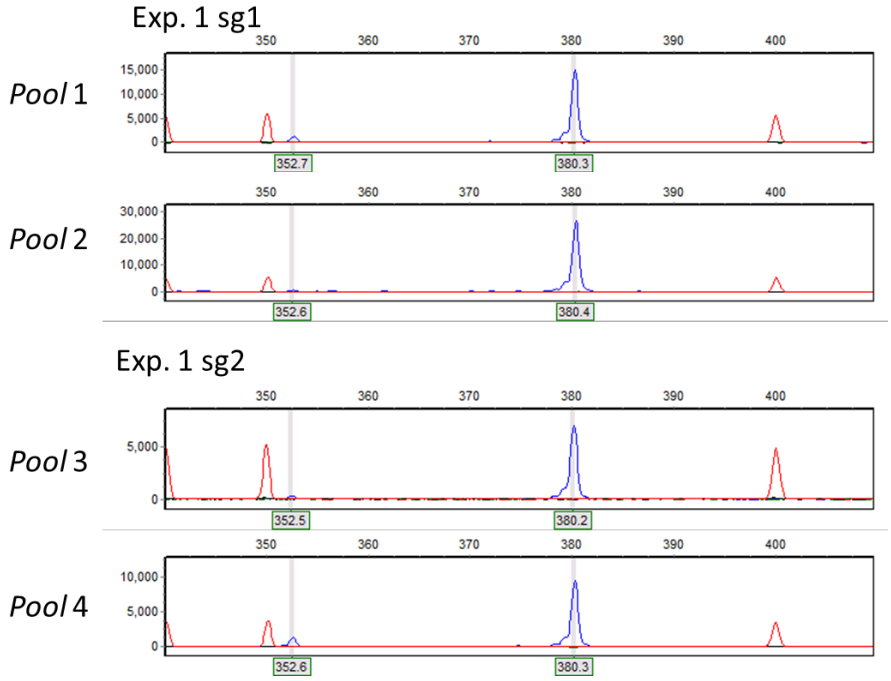


Figura 34 – Resultados dos análise de atividade do CRISPR de 4 *pools* de embriões, correspondentes ao experimento de injeção 1 para os sgRNAs 1 e 2, após análise com o programa *GeneMarker*. Nota-se que existe apenas um pico correspondente ao fragmento amplificado selvagem, mostrando que estas condições de injeção não foram efetivas para a indução de mutações no gene *ncoa3*. Todos os demais *polls* de embriões testados apresentaram resultado semelhante.

Após o insucesso dos primeiros experimentos, foi decidido modificar a estratégia de seleção de sgRNAs. No trabalho de Varshney *et al.* (2015) foi demonstrado

empiricamente que o CRISPR apresenta maior eficiência com sgRNAs que possuem a sequência GG ou GA na ponta 5'. Os autores disponibilizaram uma *BED* no *UCSC Genome Browser* que permite prever bons alvos de 20bp contendo GG ou GA na ponta 5' para o genoma de referência do *zebrafish*. Passamos então a selecionar as sequências alvo com GG na ponta 5' do sgRNA (o que permite o oligonucleotídeo-molde possa ser transcrito com RNA polimerase T7) com maior pontuação (indicação de eficiência do CRISPR sobre este alvo).

Em posse destas novas informações, desenhamos um novo sgRNA - sgRNA 3 – com alvo no exon 10 do *ncoa3.* Transcrevemos e purificamos o novo sgRNA e realizamos novas injeções. Nos sete experimentos realizados com o sgRNA 3 (Tabela 14), separamos uma parte dos embriões injetados para a análise de tamanho de fragmentos do *ncoa3*. Não obtivemos evidência de que havia indivíduos mutados. Deixamos parte dos embriões atingirem a fase adulta (cerca de 10 indivíduos) e repetimos a análise. Nos experimentos de injeção 2 e 3 (Tabela 14) tivemos indicação de que o CRISPR atuou de fato sobre o alvo (Figura 35), com alguns dos peixes adultos mostrando mais de um pico correspondente à sequência. Cruzamos os peixes da geração P questão com peixes selvagens e os embriões da geração F1 foram sacrificados para realização do mesmo procedimento de avaliação de atividade do CRISPR. Os resultados, entretanto, não mostraram dois picos (Figura 35), o que seria esperado para embriões heterozigotos portadores de alguma mutação no *ncoa3.* Observamos um pico único correspondente ao tamanho de fragmento esperado para um peixe homozigoto selvagem para o *ncoa3*. Com isto, concluímos que as mutações nos peixes dos experimentos 2 e 3 provavelmente não foram transmitidas para a geração seguinte.

Experimento	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
RNAm de Cas9 (pg)	300	300	300	300	600	750	750
sgRNA 3 (pg)	50	75	100	125	50	75	100
Ovos injetados	150	227	150	150	250	538	315
Total de embriões testados	12	12	12	12	25	55	35

Tabela 14 – Resumo dos experimentos de injeções de CRISPR/Cas9 realizadas com sgRNA 3. Em cinza estão destacadas as injeções que geraram peixes com indicação de mutações no gene *noca3*.

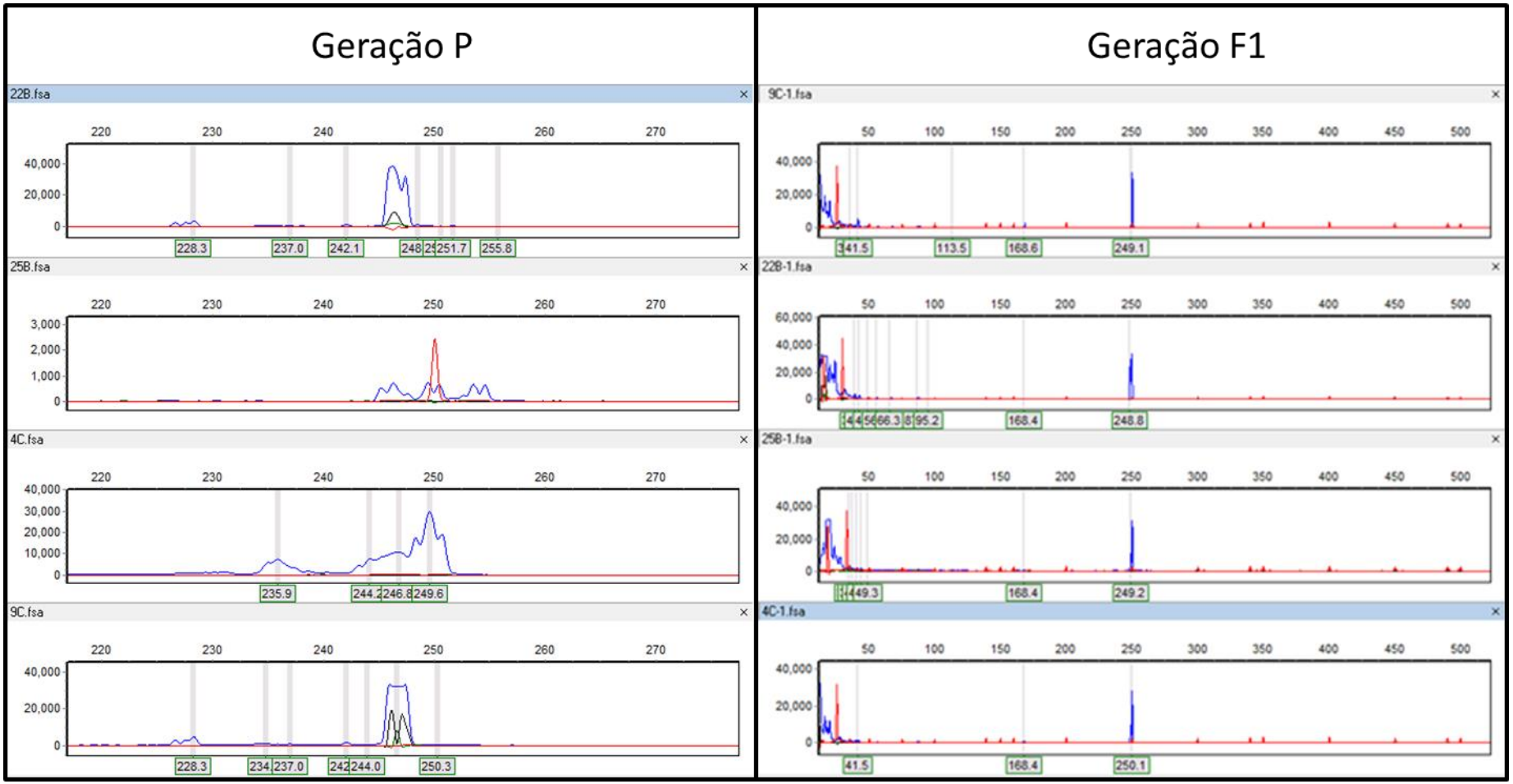


Figura 35 – Resultados da análise de atividade do CRISPR de 4 indivíduos do experimento de injeção 2 (indicados como 22B e 25B) e 3 (indicados como 4C e 9C) com o sgRNA3 (quadro esquerdo) e de sua prole F_1com peixes selvagens (quadro direito). Nos resultados dos indivíduos da geração P injetados observamos mais de um pico perto do pico selvagem esperado, indicando possível ação do CRISPR nestes indivíduos. Já os resultados dos indivíduos correspondentes à prole F_1 (quadro direito), não foram detectadas mutações.

Em todas os demais experimentos (1, 4, 5, 6 e 7 na Tabela 14), os fragmentos analisados apresentavam apenas um único pico, ou apresentavam algum outro pico próximo que também estava presente no resultado dos peixes não-injetados. Como não conseguimos obter outros resultados que indicassem a atividade do CRISPR, mesmo com diferentes alterações nas quantidades de RNAm de Cas9 e de sgRNA 3, concluímos que o sgRNA3 não era eficiente e decidimos desenhar outros sgRNAs.

Foram desenhados mais quatro sgRNAs diferentes, sgRNAs 4, 5, 6 e 7, sendo que os dois primeiros possuem alvos próximos entre si no exon 10, enquanto que os dois últimos possuem alvos próximos entre si no exon 11. Ao todo foram realizados 56 experimentos de injeção (Tabela 15), variando: a quantidade de Cas9 injetada (de 300 a 1200pg); a quantidade de sgRNA injetado (de 50 a 500pg); o número de sgRNAs diferentes a serem injetados num único embrião (apenas 1 sgRNA, 2 sgRNAs de alvos próximos, ou os 4 sgRNAs em questão). Entretanto, todos os testes deram resultado negativo, isto é, os peixes injetados apresentavam fragmentos de apenas um tamanho, similar ao observado nos peixes não-injetados.

Experimento	mRNA de Ca9 (pg) (P: ng de proteína)	sgRNA 4 (pg)	sgRNA 5 (pg)	sgRNA 6 (pg)	sgRNA 7 (pg)	Experimento	RNAm de Ca9 (pg) (P: ng de proteína)	sgRNA 4 (ng)	sgRNA 5 (ng)	sgRNA 6 (ng)	sgRNA 7 (ng)
1	300	50				**29**	300			50	50
2	300		50			**30**	1000	150	150	150	150
3	300	50	50			**31**	1000	300	300	300	300
4	1200	100				**32**	1000	500	500	500	500
5	1200		100			**33**	300	30			
6	1000	100	100			**34**	300		30		
7	1000	50				**35**	300			30	
8	1000		50			**36**	300				30
9	1000	50	50			**37**	300	50			
10	1200	50	50			**38**	300		50		
11	1200			50	50	**39**	300			50	
12	1200	75	75			**40**	300				50
13	1200			75	75	**41**	150	25			
14	159 (P)	50	50	50	50	**42**	150		25		
15	600	50	50	50	50	**43**	150			25	
16	600	75	75	75	75	**44**	150				25
17	1000	50	50	50	50	**45**	150	100			
18	159 (P)	50	50	50	50	**46**	150		100		
19	159 (P)	75	75	75	75	**47**	150			100	
20	750	50	50	50	50	**48**	150				100
21	750	100	100	100	100	**49**	400	25	25		
22	750	50	50			**50**	400			25	25
23	750			50	50	**51**	400	50	50		
24	750	100	100			**52**	400			50	50
25	750			100	100	**53**	400	100	100		
26	300	50	50	50	50	**54**	400			100	100
27	300	100	100	100	100	**55**	400	150	150		
28	300	50	50			**56**	400			150	150

Tabela 15 – Resumo dos experimentos de injeção de CRISPR/Cas9 realizados com os sgRNAs 4,5,6 e 7.

Discussão

Em 2013, Dantas identificou uma variante de sentido trocado (c.C2195G: p.S732C) no gene *NCOA3* como principal candidata a explicar o quadro de surdez autossômica dominante em uma família de São Paulo. Contudo, não havia informações detalhadas sobre a expressão ou sobre o papel deste gene na orelha interna na literatura.

Dado este panorama, tornou-se importante investigar se o gene candidato era expresso no sistema auditivo de modelos animais (no nosso caso, camundongo e *zebrafish*), etapa preliminar fundamental para delinear futuros experimentos funcionais que venham a elucidar o papel deste gene e da mutação correspondente no desenvolvimento e na fisiologia do sistema auditivo. A primeira hipótese que foi testada neste estudo é a de que o gene *NCOA3* é expresso nos sistemas mecanossensoriais (sistema auditivo e/ou linha lateral) de camundongo e de *zebrafish*. A segunda hipótese a ser testada era a de que a falta de expressão de *ncoa3* em *zebrafish* altera o desenvolvimento da orelha interna no animal, hipótese que requer a obtenção do animal *knock-out* para ser verificada.

1. Caracterização da expressão do RNAm e da proteína do gene *Ncoa3* no sistema auditivo de camundongo

Para investigar a expressão deste gene no sistema auditivo de camundongos, realizamos inicialmente RT-PCR a partir de RNA total extraído de *pools* de amostras de cóclea inteira e de órgão de Corti associado à estria vascular, provenientes de camundongos com diferentes idades (P4, P10 e P16). Estes experimentos mostraram que o RNAm do gene candidato é expresso na cóclea inteira e, mais especificamente, no órgão de Corti associado à estria vascular. Também foi possível observar que este gene é expresso no sistema auditivo de camundongo tanto durante as etapas de maturação (P4 e P10), quanto após a maturação completa do sistema auditivo (P16), indicando um possível papel importante deste gene no desenvolvimento e na fisiologia do sistema auditivo.

Prosseguimos a investigação com avaliação quantitativa da expressão do RNAm de *Ncoa3* na a cóclea inteira e no órgão de Corti associado à estria vascular. Para isto realizamos experimentos de qRT-PCR. Apesar de não ter sido possível repetir estes experimentos para a aplicação de testes estatísticos, os resultados sugeriram não só que

a expressão relativa do gene candidato é maior nos estágios P10 e P16 em relação ao estágio P4, como também que uma parcela significativa da expressão gênica está concentrada no órgão de Corti associada à estria vascular, quando comparada à da cóclea inteira.

Em 2015, Scheffer *et al.* realizaram análises de transcriptoma, por meio de RNAseq, de órgão de Corti e de utrículo de camundongos transgênicos da linhagem C57BL/6, com idades E16 (16 dias de desenvolvimento embrionário), P0, P4 e P7. Os autores foram capazes de separar as células ciliadas das células de suporte com base na expressão de GFP por parte das células ciliadas, permitindo que pudesse ser analisada a transcrição global destes dois tipos celulares ao longo do desenvolvimento. Dentre os vários genes identificados e analisados (dados disponíveis na *Shared Harvard Inner Ear Laboratory Database*, SHIELD, https://shield.hms.harvard.edu) estão todos os integrantes da família SRC. No que diz respeito ao gene *Ncoa3* no órgão de Corti, observou-se maior expressão nas células de suporte no estágio P0. Globalmente, notou-se que a expressão de *Ncoa3* é maior nos estágios P0, P4 e P7 em relação a E16. Nossos dados de RT-PCR validam a expressão deste gene na cóclea de camundongo P4 e complementam o estudo acima descrito pois indicam expressão também em P10 e P16, idades mais próximas àquela em que o camundongo começa a ouvir (P14). Outro estudo de transcriptoma de células ciliadas internas e externas de cóclea de camundongo da linhagem CBA/J com idade P25-P30, realizado por Liu *et al.* (2014), mostra que existe expressão de *Ncoa3* nestes tipos celulares, sugerindo que este gene é importante para a sua fisiologia.

Uma vez confirmada a expressão de *Ncoa3* a nível de RNAm, prosseguimos para a a caracterização do padrão de expressão da proteína correspondente na cóclea de camundongo. Para este fim, empregamos a técnica de imunofluorescência em cortes histológicos de cóclea de camundongos P4, P10 e P14. Os ensaios de imunofluorescência confirmaram os resultados obtidos nos experimentos de RT-PCR e qRT-PCR, com expressão da proteína NCOA3 na cóclea dos camundongos de todas as idades estudadas. Além disso, estes experimentos também revelaram um padrão de expressão predominantemente citoplasmático e marcação em diversas estruturas da cóclea: a membrana basilar, a membrana de Reissner, o órgão de Corti, a estria vascular, o limbo espiral e o gânglio espiral. Este conjunto de dados de RT-PCR, de qRT-PCR e

de imunofluorescência mostra que o gene *Ncoa3* deve ter um papel importante no desenvolvimento do sistema auditivo de camundongo.

Em 2016, Hickox *et al.* realizaram uma análise global de expressão protéica de células ciliadas internas, empregando espectrometria de massa em *tandem* em amostras de orelha interna, de órgão de Corti e de células ciliadas de camundongos transgênicos da linhagem C57BL/6, com idade entre P4 e P7. Com esta metodologia, os autores visaram caracterizar o proteoma de células ciliadas, com destaque dado às proteínas exclusivas de células ciliadas ou significativamente enriquecidas neste tipo celular em relação ao restante do órgão de Corti e à orelha interna. Entre as 934 proteínas identificadas como exclusivas ou extremamente mais abundantes em células ciliadas, apenas um integrante da família SRC foi identificado: a proteína NCOA1. Estes dados indicaram que, se a proteína NCOA3 é expressa em células ciliadas, ela deve ser expressa igualmente nos outros tipos celulares do órgão de Corti, pois não foi detectada entre as proteínas diferencialmente enriquecidas ou exclusivas de células ciliadas. Os ensaios de imunofluorescência por nós realizados em cortes histológicos de cóclea de camundongo P4 mostram que a proteína NCOA3 é expressa em grande quantidade no órgão de Corti e em outras estruturas da cóclea.

O nosso achado de maior expressão de *Ncoa3* no órgão de Corti, em relação à cóclea inteira, é muito interessante e deveria ser replicado em outros experimentos de qRT-PCR para permitir uma análise estatística mais refinada. Também seria interessante, nestes estudos, incluir camundongos adultos (como, por exemplo, P30 ou mesmo P60) aos estágios analisados, para verificar se há manutenção da expressão a expressão de *Ncoa3* na cóclea completamente desenvolvida do camundongo adulto. A inclusão de camundongos em estágios mais avançados poderia ajudar a esclarecer a relação entre *NCOA3* e a perda auditiva pós-lingual apresentada pela família estudada por Dantas (2013). Além disto, também seria interessante realizar ensaios de imunofluorescência utilizando anti-NCOA3 e um segundo anticorpo específico para células como células ciliadas ou de suporte, permitindo assim distinguir melhor quais tipos celulares da cóclea expressam este gene.

É necessário destacar que muitos dos resultados que obtivemos são inéditos na literatura e, globalmente, estão de acordo com a hipótese de que *NCOA3* pode ter um papel relevante na audição.

2. Caracterização da expressão do RNAm do gene *ncoa3* nos sistemas mecanossensoriais de *zebrafish*

Conforme apresentado anteriormente, analisamos a expressão de *Ncoa3* na cóclea de camundongos em alguns estágios pós-natais. No entanto, esta análise seria obviamente interessante também em estágios embrionários, com o objetivo de verificar se este gene seria importante nas primeiras etapas do desenvolvimento do sistema auditivo. Contudo, realizar este procedimento em camundongos não seria possível, dada a elevada dificuldade em isolar a vesícula ótica de embriões de camundongo na dissecção e a necessidade de uma grande quantidade de vesículas óticas para a obtenção de uma quantidade razoável de RNAm. Devido a estes problemas, a opção de utilizar um segundo modelo animal, o *zebrafish*, para este propósito, pareceu adequada. Uma vez que este animal apresenta fecundação externa, rápido desenvolvimento e transparência dos embriões e das larvas, torna-se fácil acompanhar o desenvolvimento da orelha interna desde o seu início.

Para investigar a expressão deste gene no sistema auditivo e na linha lateral de *zebrafish*, realizamos a técnica de hibridação *in situ* em animal inteiro com peixes de diferentes idades (18hpf, 1dpf, 3dpf, 5dpf, 5spf e 7spf). Nesta série de experimentos não foi detectada a expressão do RNAm deste gene na vesícula ótica do embrião de *zebrafish* com 18hpf e 1dpf. Só foi observada marcação na vesícula ótica a partir do estágio 3dpf, durante o desenvolvimento da orelha interna. A expressão deste gene continuou presente na orelha interna completamente desenvolvida de *zebrafish* juvenis (5spf e 7 spf), com marcação em toda a estrutura. Estes resultados são inéditos na literatura e sugerem um papel importante de *ncoa3* tanto no desenvolvimento quanto na fisiologia do sistema auditivo deste modelo animal. A expressão de *Ncoa3* no sistemas auditivo tanto de *zebrafish* quanto em camundongo sugerem conservação, do ponto de vista evolutivo, da sua função no desenvolvimento do sistema auditivo.

Em 2007, McDermott *et al.* realizaram análise do transcriptoma de células ciliadas da mácula lagenar de *zebrafish* adulto da linhagem Tübingen. Dos 6472 transcritos investigados, apenas um integrante da família SRC foi identificado: NCOA2. Portanto, apesar dos nossos ensaios de hibridação *in situ* mostrarem presença do transcrito de *ncoa3* na orelha interna inteira, a expressão deste gene deve ser, aparentemente, muito baixa ou inexistente em células ciliadas de *zebrafish* adulto.

Conforme mencionado, *zebrafish* apresentam um segundo sistema mecanossensorial denominado linha lateral. Formada por neuromastos, estas unidades da linha lateral são constituídas por tipos celulares similares aos encontrados na orelha interna, como células ciliadas e células de suporte. Também há a expressão de genes em comum entre estes dois sistemas, como, por exemplo *atoh1a* (Haddon *et al.*, 1998, Itoh e Chitnis, 2001) e *ngn1* (Andermann *et al.*, 2002), genes relacionados com o processo de diferenciação de células ciliadas e de suporte e com a formação de neurônios sensoriais, respectivamente. Não foi detectada a expressão de *ncoa3* nos neuromastos de *zebrafish* em nenhum estágio do desenvolvimento estudado, sugerindo que este gene, aparentemente, não tem papel importante no desenvolvimento ou fisiologia de neuromastos.

3. Utilização do sistema CRISPR/Cas9 para edição gênica de *ncoa3* em *zebrafish*

O conjunto de resultados discutidos até agora indica um papel importante, e conservado evolutivamente, do gene *NCOA3* no sistema auditivo. Acreditamos que a falta de expressão tem potencial para alterar o desenvolvimento do sistema auditivo e, para testar esta hipótese, empregamos a estratégia de edição gênica por sistema CRISPR/Cas9 para gerar *zebrafish knock-out* para o gene *ncoa3*.

Desenhamos inicialmente dois sgRNAs (sgRNAs 1 e 2) que tinham como alvo o exon 5 do gene *ncoa3*, com o auxílio do pacote computacional *Zifit Targeter version 4.2*. Contudo, não houve indução de mutação pelo sistema de CRISPR/Cas9. Em seguida, mudamos os parâmetros de seleção de sgRNA, selecionando sgRNAs que apresentam GG ou GA na ponta 5', uma vez que foi demonstrado empiricamente que esta característica está positivamente correlacionada com maior eficiência do sgRNA em induzir de mutações (Varshney *et al.*, 2015). Selecionamos um novo sgRNA (sgRNA 3) que tinha como alvo o exon 10, por meio do *browser extensible data (BED) track ZebrafishGenomics* do *UCSC Genome Browser*.

Realizamos experimentos de co-injeção de RNAm com o sgRNA 3 e, em dois testes diferentes, obtivemos sucesso na obtenção de peixes que apresentavam mosaicismo com relação a mutações no gene *ncoa3*. Entretanto, após cruzamento destes peixes contendo a mutação com peixes selvagens, foi constatado que a geração F_1 não apresentava indivíduos heterozigotos portadores de mutação no gene *ncoa3*, indicando que a

mutação não foi passada para a geração seguinte. Geralmente, zigotos injetados com o sistema CRISPR/Cas9 dão origem a organismo com mosaicismo em relação a mutações no gene-alvo, uma vez que o processo de indução de mutações normalmente ocorre no estágio de 2 células em diante (Yen *et al.*, 2014). Se a indução de mutações no gene-alvo não ocorrer nas células germinativas, as mutações obtidas não podem ser transmitidas para as gerações seguintes. Tal fato pode ter acontecido com os peixes injetados com o sgRNA 3 e que apresentavam mosaicismo.

Uma vez que não conseguimos obter novos peixes com mutações no gene *ncoa3*, mesmo com alterações nas quantidades de RNAm de Cas9 e de sgRNA 3, concluímos que este sgRNA não era eficiente. Desenhamos novos sgRNAs (sgRNA 4 a 7), também usando o *BED track ZebrafishGenomics* do *UCSC Genome Browser*, tendo como alvos os exons 10 e 11. Contudo, não obtivemos peixes com mutações em nenhum dos testes realizados, indicando que estes sgRNAs também não eram eficientes.

A tecnologia de CRISPR/Cas9 é relativamente nova e está sendo melhorada constantemente. O principal enfoque têm sido em determinar as características que um sgRNA deve apresentar para ser eficiente. Em 2014, análises em larga escala foram feitas por Gagnon *et al.* nas sequências de sgRNAs considerados eficientes na indução de mutações em *zebrafish*. Verificou-se, por exemplo, que sgRNAs com alta eficiência apresentavam: conteúdo guanina/citosina acima de 50%; guanina adjacente ao motivo PAM da região-alvo, característica também observada quando o sistema CRISPR/Cas9 foi aplicado em culturas celulares murinas (Doench *et al.*, 2014); e a sequência GG ou GA na ponta 5'. Contudo, Varshney *et al.* (2015) realizaram análises similares e observaram que apenas sgRNAs com sequência GG ou GA na ponta 5' são eficientes, não havendo correlação positiva entre eficiência do sgRNA e as demais características indicadas por Gagnon *et al.* (2014) e Doench *et al.* (2014). No estudo conduzido posteriormente por Moreno-Mateos *et al.* (2015), foi observado que sgRNAs eficientes apresentavam elevado conteúdo de guanina e baixo conteúdo de adenina na sequência, bem como guanina na posição 20. Com base nestes estudos, somente o sgRNA 3 desenhado por nós é o que abrange a maior parte das características indicadoras de eficiência mencionadas acima, oferecendo assim uma explicação para o insucesso na nossa aplicação da técnica de CRISPR/Cas9 com os demais sgRNAs desenhados e o fato de que somente no experimento com sgRNA 3 tivemos indícios de que mutações poderiam ter sido induzidas.

Em 2016, Thyme *et al.* demonstraram que parte da ineficiência de sgRNAs pode ser decorrente de pareamentos intramoleculares fortes no sgRNA, com formação de grampos com a região que se pareia especificamente com a região-alvo. De fato, quando houve troca de certas bases em regiões especificas da sequência do sgRNA na qual era prevista a formação de grampos, a eficiência do sgRNA aumentava drasticamente. Assim, tem-se uma possível explicação sobre o porquê do sgRNA 3 não induzir mutações no gene *ncoa3* nas taxas esperadas para um sgRNA, apesar de suas características indicadoras de alta eficiência.

Outro fator que pode afetar a taxa de sucesso do sistema CRISPR/Cas9 é a Cas9 em si. Idealmente, para averiguar se as dificuldades com a aplicação do sistema são decorrentes de do sgRNA ou da atividade da Cas9, a mesma Cas9 deve ser testada em experimentos de indução de mutação em genes que já foram comprovadamente editados por meio do sistema. Isto daria uma pista sobre a eficiência da Cas9, mas seria muito dispendioso em termos de tempo e de recursos, nas nossas condições.

Além de fatores relacionados ao sgRNA e à Cas9, a eficiência do sistema CRISPR/Cas9 também pode ser afetada por características da região do genoma no qual se pretende induzir mutações. Thy *et al.* (2016), por exemplo, sugerem que interações de alta afinidade entre complexos proteicos e a região-alvo do sgRNA no genoma podem bloquear o acesso do complexo da Cas9 com sgRNA à região-alvo, impedindo o processo de clivagem. Portanto, é bem provável que aspectos relacionados à estrutura da cromatina tenham importância para o sucesso do experimento.

Por fim, ainda há certos parâmetros importantes desta técnica de edição gênica para os quais ainda não há um consenso, como, por exemplo, a quantidade ideal de RNAm de Cas9 e de sgRNA a ser injetado em zigotos de *zebrafish* para a obtenção de mutantes. Brocal *et al.* (2016) injetaram 200pg de RNAm de Cas9 e 10pg de sgRNA; já Varshney *et al.* (2015) injetaram tanto 300pg de RNAm de Cas9 e 50pg de sgRNA quanto 150pg de RNAm de Cas9 e 50pg de sgRNA; Shah *et al.* (2015), por sua vez injetaram 1200pg de RNAm de Cas9 e 100pg de sgRNA. Logo, quando a injeção de alguma quantidade específica destes componentes não gera mutantes, torna-se necessário testar diferentes concentrações de cada sgRNAm e de Cas9 (na forma de RNAm ou de proteína) a fim de verificar o problema por trás da ineficiência do sistema: as quantidades dos componentes do sistema CRISPR/Cas9 que são injetadas ou a eficiência do sgRNA em questão.

Portanto, considerando os avanços recentes sobre edição gênica por sistema CRISPR/Cas9, nós acreditamos que os experimentos deveriam ser repetidos conforme a sugestão de Li *et al.* (2016) de que novos sgRNAs devem ser escolhidos com base em mais de um pacote computacional (como, por exemplo, CHOP-CHOP e CRISPR-Scan), uma vez que estes programas são independentes entre si e o algoritmo utilizado para a classificação de sgRNAs eficientes pode não ser o mesmo para todos os programas de predição de sgRNAs. Devem ser selecionados aqueles que aparecem como altamente eficientes em ambos os pacotes computacionais. Desta maneira, aumenta-se significativamente as chances de obtenção de *zebrafish knock-out* para o gene *ncoa3*.

4. Os possíveis papéis de *NCOA3* no sistema auditivo

Confirmamos neste trabalho a expressão do gene *NCOA3* em diferentes estágios do desenvolvimento do sistema auditivo de camundongo e de *zebrafish*, mostrando que este gene pode ter uma função importante no desenvolvimento e na fisiologia do sistema auditivo e que esta função deve ser conservada nestas duas espécies. Embora na literatura atual não haja dados que permitam estabelecer uma conexão direta de *NCOA3* com a audição, apresentamos a seguir uma discussão sobre possíveis papéis deste gene no sistema auditivo, com base nas informações existentes.

4.1. Regulação das estruturas e propriedades mecânicas da cóclea

Alterações ósseas e de cartilagem podem acarretar surdez, a exemplo dos casos de otosclerose (OMIM# 166800), síndrome de Stickler (OMIM# 108300), osteogênese imperfeita tardia (OMIM # 166200), fibrocondrogênese (OMIM# 228520), displasia cleidocraniana (OMIM # 119600) (Visosky *et al.*, 2003; Cureoglu *et al.*, 2010; Baker *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012; Tompson *et al.*, 2010).

Em 2014, uma meta análise de estudos de associação por varredura genômica (GWAS, do inglês, *Genomic Wide Association Studies*), realizada por Evangelou *et al.*, revelou uma variante no gene *NCOA3* que confere aumento de 30% no risco de desenvolvimento de osteoartrite de quadril. Além disto, os autores mostraram uma redução significativa de expressão de *NCOA3*, na presença de uma variante de sentido trocado no gene *NCOA3* (c.G47466905A: p.R218C), em amostras de cartilagem articular afetadas por osteoartrite. Em um estudo funcional conduzido por Gee *et al.* (2015), foi observado que os níveis de expressão de alguns genes relacionados com hipertrofia/catabolismo de cartilagem estavam diminuídos em cultura primária de

condrócitos provenientes de cartilagem articular. Entre estes genes está o *RUNX2* (do inglês, *Runt Related Transcription Factor 2*), o qual codifica um fator de transcrição responsável por regular o desenvolvimento das células responsáveis pela síntese da matriz óssea, os osteoblastos (Stein *et al.*, 2004).

Camundongos *knock-out* para *RUNX2* apresentam, entre vários sintomas característicos de displasia cleidocraniana, perda auditiva (Chang *et al.*, 2010). Avaliações audiológicas e exames de imagem nestes camundongos revelaram que a perda auditiva não era decorrente de problemas no sistema nervoso central, na orelha externa, na orelha média ou em estruturas neurossensoriais da cóclea. Curiosamente, foi mostrada uma correlação significativa entre a perda auditiva e a mineralização diminuída no labirinto ósseo, embora não se saiba ao certo como essa mudança nas propriedades da matriz óssea possa causa surdez.

Uma vez que o processo de mineralização é dependente da regulação da atividade de osteoblastos e de osteoclastos (Mohammad *et al.*,2009) e que uma variante de sentido trocado no gene *NCOA3* é capaz de diminuir a expressão de um dos genes reguladores do desenvolvimento de osteoblastos, o gene *RUNX2*, tem-se aqui um mecanismo pelo qual o gene *NCOA3* poderia causar surdez.

Entretanto, é válido notar que ressonâncias magnéticas de crânio e tomografias computadorizadas dos ossos temporais, realizadas em três indivíduos afetados da família estudada por Dantas (2013), não indicaram quaisquer sinais de alteração no labirinto ósseo ou qualquer outra estrutura da cóclea ou no aparelho vestibular. Com relação ao sistema auditivo de camundongos *knock-out* para *Ncoa3*, a única alteração observada no sistema auditivo foi um posicionamento rebaixado de uma das orelhas em 10% dos camundongos estudados (Wang *et al.*, 2000). Contudo, não há menção neste estudo a qualquer investigação sobre a estrutura da orelha interna dos camundongos.

No estudo de Gee *et al.* (2015), foi também observado, em decorrência da mutação no gene *NCOA3*, um aumento na expressão de *COL2A1* (do inglês, *Collagen Type 2 Alpha-1*), cujo produto é um dos principais colágenos produzidos por condrócitos (Deng *et al.*, 2016). A expressão de *COL2A1* já foi investigada na cóclea de fetos humanos (Khetarpal *et al.*, 1994), tendo sido detectada a expressão da proteína correspondente na cápsula ótica, na membrana basilar, na membrana tectorial, no limbo espiral, na estria vascular, entre outras estruturas.

Mutações no gene *COL2A1* são responsáveis por uma série de síndromes que apresentam surdez com um dos sinais clínicos, como a síndrome de Stickler e a Displasia Espongiloepifiseal Congênita (OMIM # 183900). Ainda não há uma explicação sobre o mecanismo molecular por trás do fenótipo de surdez decorrente destas mutações. Entretanto, dada a expressão abrangente deste gene na cóclea, é possível que alterações na expressão de *COL2A1* possam prejudicar a formação e/ou as propriedades de diferentes componentes da cóclea, causando surdez. Por exemplo, em Masaki *et al.* (2009), concluíram que a surdez apresentada por camundongos *knock-out* para o gene *Col11a2* é decorrente de alterações nas propriedades mecânicas da membrana tectória.

Assim, também seria possível especular que mutações no gene *NCOA3* causariam surdez por meio da alteração na expressão de *COL2A1*, com alteração na estrutura e nas propriedades de vários componentes importantes da cóclea.

4.2. Regulação do efeito protetor dos receptores de estrógeno (ERs)

A família dos receptores de estrógeno (ERs, do inglês *Estrogen Receptor*) é composta por dois integrantes, ERα e ERβ, os quais, em conjunto com o hormônio estrógeno, são classicamente conhecidos por regular o desenvolvimento e função do aparelho reprodutor masculino e feminino.

Dentre as vias de ativação de ERs está a via independente de ligante (Figura 36), na qual a ativação de ERs ocorre por intermédio de mensageiros celulares secundários (Charitidi *et al.*, 2009). Neste caso, a ligação de fatores de crescimento aos seus respectivos receptores leva à ativação de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs, do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase*), acarretando fosforilação e ativação de ERs (Kato *et al.*, 1995). Outra maneira de ativar ERs por esta via é por meio da ativação de receptores acoplados à proteína G (GPCR, do inglês *G-Protein Coupled Receptor*), o que leva à produção do mensageiro celular secundário monofosfato cíclico de adenosina (AMPc, do inglês *Cyclic Adenosin Monophosphate*), ativando a proteína cinase A (PKA, do inglês, *Protein Kinase A*) e, por fim, fosforilando e ativando os ERs (Coleman e Smith, 2001). Uma vez ativados, os receptores de estrógeno são translocados até o núcleo, onde regulam a expressão de diferentes genes.

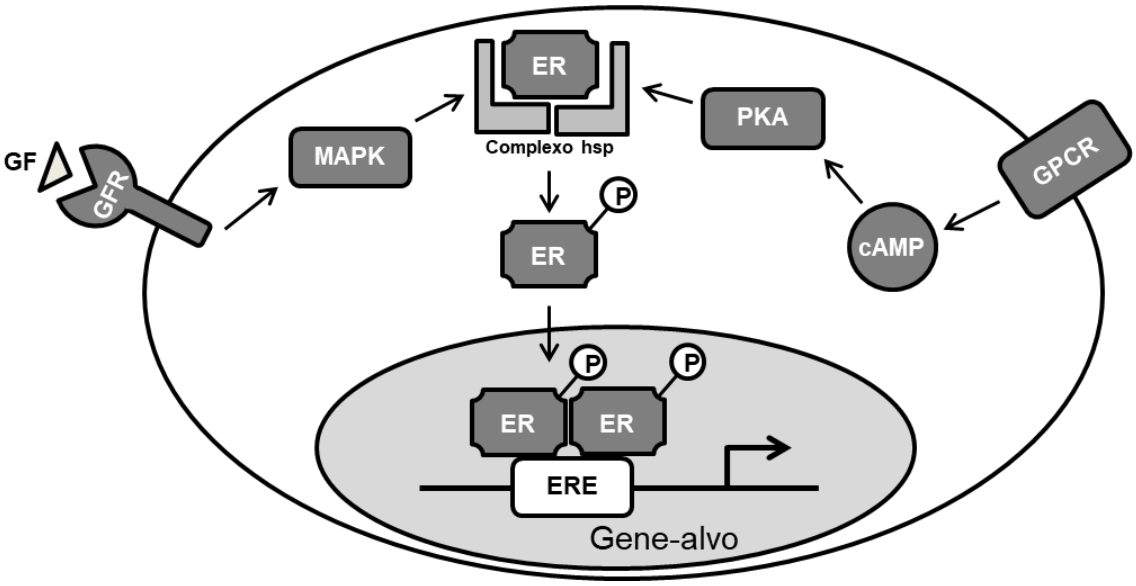


Figura 36 – Mecanismo molecular da ativação de receptor de estrógeno (ER) sem a presença de seu ligante. Fatores de crescimento (GFs) se ligam aos seus receptores (GFRs) e ativam as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Estas por sua vez levam à fosforilação e ativação das ERs, as quais, em seu estado inativo, estão associadas a um complexo de proteínas *heat-shock* (complexo hsp). Uma vez ativadas e fosforiladas, as ERs formam homodímeros e são translocadas para o núcleo, onde se ligam a elementos responsivos a estrogênio (ERE) de genes-alvo para ativar a transcrição gênica. Este processo de ativação também pode ser mediada por receptores acoplados à proteína G (GPCR), os quais, quando ativados, geram aumento nos níveis de AMP cíclico (cAMP). Este mensageiro celular secundário, por sua vez, ativa a proteína cinase A (PKA), a qual também é capaz de fosforilar e ativar ERs.

Em 2000, Mora e Brown demonstraram, em diferentes linhagens celulares, que as MAPKs são capazes de fosforilar o domínio de ativação AD1 da proteína NCOA3, levando à sua ativação. Esta ativação, por sua vez, leva ao recrutamento de proteínas com atividade de acetiltransferase de histonas (como as proteínas CBP e p300), as quais atuam no processo de ativação transcricional. Estes autores então sugerem que as MAPKs seriam capazes de aumentar a transcrição mediada por ERs por meio da ativação do domínio AD1 de NCOA3, conforme mostrado na figura 37.

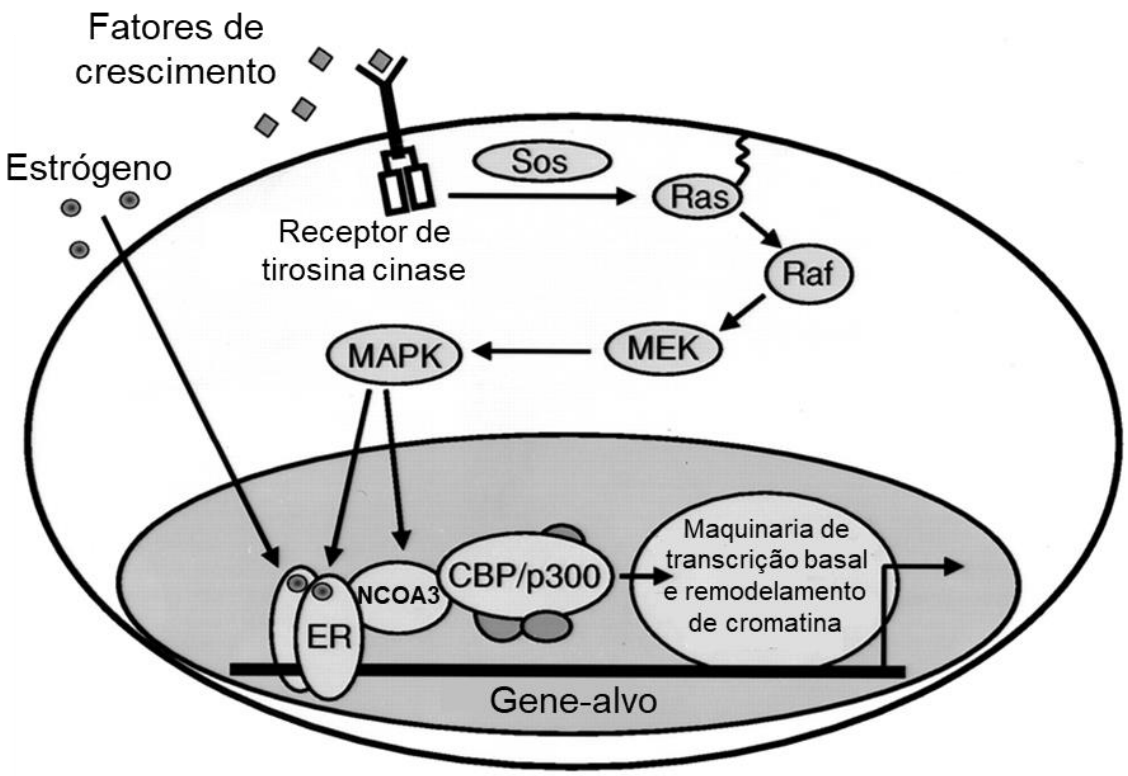


Figura 37 – Regulação do complexo transcricional de receptor de estrógeno (ER) por meio da ativação de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). A ligação de fatores de crescimento à receptores de tirosina cinase leva à ativação da cascata Ras-MPK. Com a ativação de MAPK, ocorre a fosforilação de alvos como ERs e NCOA3, modulando a transcrição gênica em resposta a fatores de crescimento e/ou estimulação por estrógeno. Figura modificada de Mora e Brown, 2000.

Também é interessante mencionar que o padrão de expressão de *Ncoa3* observado por nós em cortes histológicos de camundongo é similar ao observado por Stenberg *et al.* (1999) para os receptores ERα e ERβ. Dentre os principais resultados obtidos a partir de ensaios de imunohistoquímica em cortes histológicos de cóclea de camundongo (idades entre 2 e 6 meses), estão a expressão de ERs na via auditiva, com marcação nas células ciliadas internas e externas, assim como no núcleo de células ganglionares do tipo 1 do gânglio espiral, e em regiões relacionadas à manutenção do equilíbrio iônico da endolinfa como a membrana de Reissner e a estria vascular. Ensaios de imunohistoquímica também revelaram expressão de ERα e de ERβ nos cortes histológicos de cóclea de humanos adultos, especificamente no gânglio espiral e na estria vascular (Stenberg *et al.*, 2001). Com padrões de expressão de NCOA3 e de ERs similares, é altamente sugestivo que estas proteínas estejam atuando em conjunto no sistema auditivo.

É antiga a observação de que a frequência de perda auditiva é mais elevada entre mulheres com síndrome de Turner quando comparado à população em geral (Hultcrantz *et al.*, 1994). Com a detecção da expressão dos ERs na cóclea de humanos adultos, Hultcrantz (2003) sugere que baixa produção de estrógenos pode ter um papel na perda auditiva apresentada por pacientes com síndrome de Turner. Um fenômeno similar foi observado por Hederstierna *et al*. (2010), os quais reportaram um declínio rápido na audição de alta frequência em mulheres pós-menopausa. Contudo, a relação entre os níveis de estrógenos e a perda auditiva em mulheres na menopausa foi analisada em outros estudos e não foi considerada significativa (Oghan e Coksuer, 2012; Svedbrant *et al.*, 2015).

O conjunto de dados sobre expressão de ERs sugere a possibilidade do estrógeno e seus receptores terem algum papel sobre o sistema auditivo. De fato, já foi observado que camundongos *knock-out* para ERβ eram mais suscetíveis a trauma acústico do que camundongos selvagens (Meltser *et al.*, 2008), apresentando degeneração progressiva de células ciliadas e de células ganglionares do gânglio espiral (Simonoska *et al.*, 2009). Acredita-se que este receptor de estrógeno seja capaz de proteger o sistema auditivo contra traumas acústicos por meio de regulação da proteína BDNF (do inglês, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), a qual é capaz de proteger células ciliadas e células do gânglio espiral contra trauma acústico e contra substâncias ototóxicas (Meltser *et al.*, 2008). Logo, é possível que a proteína NCOA3, em conjunto com o receptor do estrógeno, possa influenciar a regulação da transcrição do gene BDNF, cujo produto é, aparentemente, protetor do sistema auditivo.

4.3. Regulação da diferenciação de células ciliadas e de suporte

A via Notch é um sistema de sinalização celular altamente conservado durante a evolução e é responsável por regular diferentes etapas do processo de diferenciação de vários tipos celulares (Anderson *et al.*, 2011).

Em vertebrados, os componentes principais que formam esta via de sinalização são: os receptores transmembrânicos Notch e os ligantes transmembrânicos Delta e Serrate, também conhecidos como Jagged em mamíferos (Bray, 2006). De acordo com o modelo canônico (Figura 38), quando um dos receptores Notch interage com um de seus ligantes, é desencadeada uma série de clivagens proteolíticas, levando à liberação do domínio intracelular do Notch (NCID, do inglês *Notch Intracellular Domain*). O

NCID é então translocado até o núcleo, onde, em conjunto com CSL (do inglês *CBF1/Suppressor of Hairless/LAG-1*, uma proteína de ligação ao DNA), com proteínas da família MAML (do inglês, *Mastermind-like*, uma família de co-ativadores transcricionais), e com outras proteínas co-ativadoras ou co-inibidoras, regulam a transcrição de diferentes genes-alvo (Anderson *et al.*, 2011; Guruharsha *et al.*, 2012).

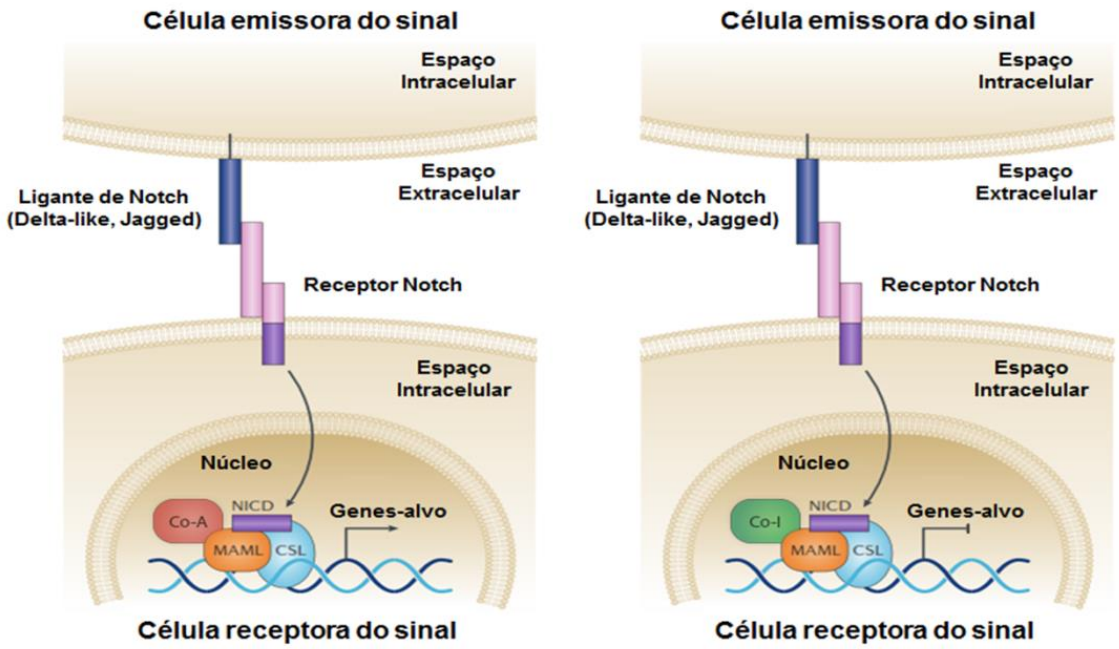


Figura 38 – Ilustração representando a via de sinalização celular Notch. CSL= complexo proteico CBF1/*Supressor of Hairless*/Lag-1; Co-A= Proteínas Co-Ativadoras; Co-I= proteínas Co-Inibidoras; MAML= proteína *Mastermind-like*, NECD= Domínio Extracelular de Notch, NCID= Domínio Intracelular de Notch. Figura modificada de Andersson e Lendahl, 2014.

No que concerne especificamente ao desenvolvimento da orelha interna de mamíferos, há a participação do receptor de Notch JAG1 na determinação do domínio prosensorial do otocisto (Riccomagno *et al.*, 2002; Kiernan *et al.*, 2005; Kiernan *et al.*, 2006) e na regulação da determinação das células ciliadas e de suporte. Neste último caso, sabe-se que via Notch tem o papel de inibir a diferenciação das células progenitoras prosensoriais em células ciliadas por meio da inibição de ATOH1, um fator de transcrição pertencente à família bHLH (do inglês, *basic-Helix-Loop-Helix*) considerado uma peça-chave na indução da diferenciação de células ciliadas (Bermingham *et al.*, 1999; Lanford *et al.*, 2000). Já em 1995, Kelley *et al.* obtiveram indícios de um mecanismo de inibição lateral que impedia que células vizinhas às células ciliadas se tornassem novas células ciliadas. Hoje, sabe-se que tal mecanismo de inibição lateral conta com a participação de genes-alvo da via Notch, como *Hey2* e

Hes1, que atuam de forma a inibir a expressão de *Atoh1* (Zheng *et al.*, 2000; Doetzlhofer *et al.*, 2009), conforme mostrado na Figura 39.

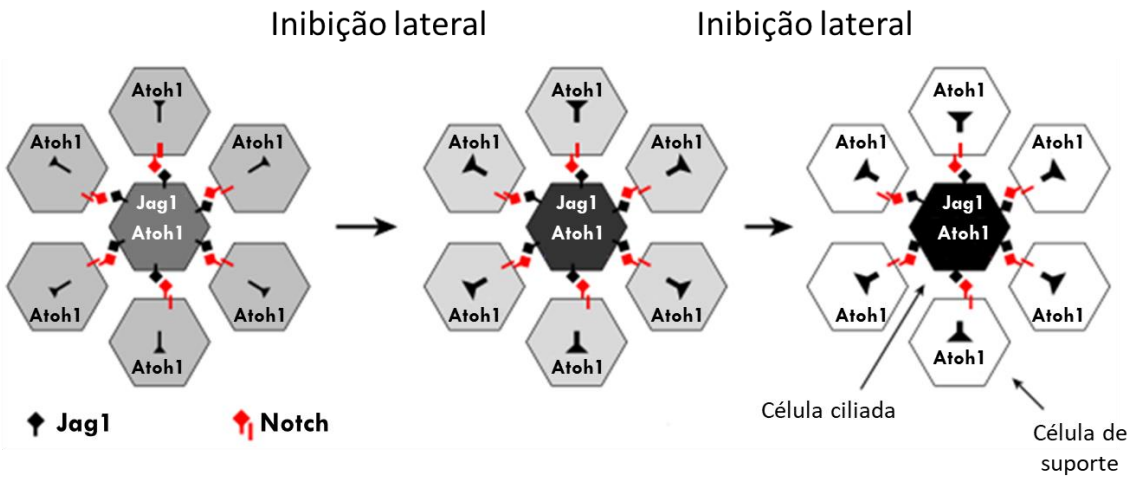


Figura 39 – Ilustração representando o mecanismo de inibição lateral dada pela via de sinalização celular Notch. Delta e Notch são, respectivamente, o ligante e o receptor da via de sinalização Notch. Atoh 1 é um fator de transcrição importante para a diferenciação em células ciliadas. Figura modificada de Moody, 2007.

Em um trabalho realizado por Mo *et al.* (2015), em células humanas de câncer colorretal, foi demonstrado que a proteína NCOA3 é capaz de formar um complexo com MAML1, se ligando ao promotor do gene *HES1* e promovendo a sua transcrição. A presença de HES1, por sua vez, leva à inibição do gene *ATOH1* e, consequentemente, à estimulação da diferenciação de células progenitoras prosensoriais em células suporte, ao invés de células ciliadas. Desta maneira, tem-se um mecanismo molecular pelo qual a falta ou o excesso de atividade do produto do gene *NCOA3* seriam capazes de influenciar a diferenciação de células ciliadas e de suporte.

Por este mecanismo, uma mutação que leve à perda de função do produto do gene *NCOA3* (com haploinsuficiência) ou uma mutação que leve ao efeito dominante negativo acarretariam aumento da produção de células ciliadas; por outro lado, uma mutação de ganho de função neste produto poderia resultar em redução do número de células ciliadas.

Para investigar estas hipóteses, o ideal seria investigar detalhadamente a audição e a estrutura histológica da cóclea do camundongo *knock-out* para este gene. O banco de dados da IMPC (do inglês, *International Mouse Phenotyping Consortium*, http://www.mousephenotype.org/) apresenta resultados de exame PEATE (Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico) conduzido em um único animal *knock-out*

para o gene *Ncoa3*, mostrando que este camundongo apresenta audição normal. Além disto, não há detalhes sobre idade em que o animal foi testado. Considerando que a surdez apresentada pela família em questão é de caráter pós-lingual, resta a possibilidade de camundongo *knock-out* apresentar surdez em idade mais avançada do que a testada.

Perspectivas futuras

Neste estudo foi demonstrado que o gene *NCOA3* é expresso na orelha interna de modelos animais, com potencial papel no desenvolvimento e na fisiologia do sistema auditivo. O estudo de Dantas (2013) indicou uma variante de sentido trocado (c.C2195G: p.S732C) no gene *NCOA3* como principal candidato a causar surdez hereditária em uma família brasileira e nossos resultados estão de acordo com esta hipótese. Uma vez confirmada a expressão de *NCOA3* no sistema auditivo, resta agora realizar experimentos que forneçam mais detalhes sobre o efeito da mutação encontrada na família e o mecanismo molecular por trás do fenótipo de surdez.

A mutação identificada no gene *NCOA3* está em uma região conservada apenas em primatas e afeta uma região sem domínio caracterizado na proteína. Análises *in silico*, empregando pacotes computacionais como o SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/) foram realizadas em nosso laboratório com o intuito de predizer o efeito da mutação sobre a estrutura da proteína NCOA3. Contudo, não obtivemos resultados devido à escassez de informações sobre a estrutura da proteína em bancos de dados de proteínas (como, por exemplo, Uniprot e *Protein Data Bank*), especialmente na região da mutação. Outra análise *in silico* realizada por meio do pacote computacional NetPhos 2.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-2.0/) mostrou que o aminoácido serina substituído na mutação tem 60% de chance de ser fosforilado *in vivo*, sugerindo uma possível alteração no processo de sinalização desta proteína e no seu transporte entre citoplasma e núcleo.

Obviamente, a análise cuidadosa dos modelos animais nocauteados é fundamental, e seria um desdobramento natural deste estudo. Entramos em contato com o pesquisador que desenvolveu o camundongo knock-out para estudo, porém, o pesquisador não mostrou interesse em estudo colaborativo. A Dra. Erika Kague, co-orientadora deste projeto, está empreendendo esforços em tentativa de nocautear o gene *ncoa3* em *zebrafish*, na *School of Physiology, Pharmacology and Neuroscience* (*University of Bristol*), com resultados preliminares promissores. Caso o *knock-out* seja obtido, poderiam ser realizados o exame de PEATE e testes comportamentais (como o teste de resposta ao susto) para avaliar a audição destes animais. O estudo detalhado das possíveis alterações morfológicas na orelha interna também é fundamental.

Em virtude da região mutada estar presente apenas em primatas, não é possível induzir a mesma mutação em *zebrafish*. Contudo, seria viável, injetar embriões selvagens de *zebrafish* com RNAm humano de *NCOA3* contendo a mutação. Esta estratégia foi utilizada por Han *et al.* (2011) para estudar o efeito da mutação no gene *HOMER2* encontrada em uma família europeia, com obtenção de resultados conclusivos sobre o efeito da mutação no sistema auditivo e de linha lateral de *zebrafish*. Também poderia ser considerada a possibilidade de trabalhar com linhagens celulares humanas contendo a mutação, selecionando e analisando alguns genes-alvo para verificação de efeitos sobre a expressão gênica. Neste quesito, a análise crítica da literatura apresentada na discussão permitiu apontar alguns genes e vias de sinalização celular que poderiam ser preferencialmente investigados para desvendar o mecanismo molecular por trás do fenótipo de surdez presente na família.

Conclusões

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

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

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

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

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

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

Referências bibliográficas

Abecasis, G. R., Cherny, S. S., Cookson, W. O., & Cardon, L. R. (2002). Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nature genetics*, *30*(1), 97-101.

Ablain, J., Durand, E. M., Yang, S., Zhou, Y., & Zon, L. I. (2015). A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish. *Developmental cell*, *32*(6), 756-764.

Ahmed, Z. M., Morell, R. J., Riazuddin, S., Gropman, A., Shaukat, S., Ahmad, M. M., ... & Khan, S. N. (2003). Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37. *The American Journal of Human Genetics*, *72*(5), 1315-1322.

Andermann, P., Ungos, J., & Raible, D. W. (2002). Neurogenin1 defines zebrafish cranial sensory ganglia precursors. *Developmental biology*, *251*(1), 45-58.

Andersson, E. R., Sandberg, R., & Lendahl, U. (2011). Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*, *138*(17), 3593-3612.

Andersson, E. R., & Lendahl, U. (2014). Therapeutic modulation of Notch signalling--are we there yet?. *Nature reviews. Drug discovery*, *13*(5), 357.

Anniko, M. (1985). Histochemical, microchemical (microprobe) and organ culture approaches to the study of auditory development. *Acta Oto-Laryngologica*, *99*(sup421), 10-18.

Apostolakis, E. M., Ramamurphy, M., Zhou, D., Oñate, S., & O'malley, B. W. (2002). Acute disruption of select steroid receptor coactivators prevents reproductive behavior in rats and unmasks genetic adaptation in knockout mice. *Molecular Endocrinology*, *16*(7), 1511-1523.

Avraham, K. B., Hasson, T., Steel, K. P., Kingsley, D. M., Russell, L. B., Mooseker, M. S., ... & Jenkins, N. A. (1995). The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nature genetics*, *11*(4), 369-375.

Azaiez, H., Decker, A. R., Booth, K. T., Simpson, A. C., Shearer, A. E., Huygen, P. L., ... & Turner, A. (2015). HOMER2, a stereociliary scaffolding protein, is essential for normal hearing in humans and mice. *PLoS genetics*, *11*(3), e1005137.

Baker, S., Booth, C., Fillman, C., Shapiro, M., Blair, M. P., Hyland, J. C., & Ala-Kokko, L. (2011). A loss of function mutation in the COL9A2 gene causes autosomal recessive Stickler syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *155*(7), 1668-1672.

Bang, P. I., Sewell, W. F., & Malicki, J. J. (2001). Morphology and cell type heterogeneities of the inner ear epithelia in adult and juvenile zebrafish (Danio rerio). *Journal of Comparative Neurology*, *438*(2), 173-190.

Baxendale, S., & Whitfield, T. T. (2014). *Zebrafish inner ear development and function* (pp. 63-106). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Bento, R. F. (2013). *Tratado de otologia*. São Paulo, SP: Atheneu.

Bermingham, N. A., Hassan, B. A., Price, S. D., Vollrath, M. A., Ben-Arie, N., Eatock, R. A., ... & Zoghbi, H. Y. (1999). Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science*, *284*(5421), 1837-1841.

Bever, M. M., & Fekete, D. M. (2002). Atlas of the developing inner ear in zebrafish. *Developmental dynamics*, *223*(4), 536-543.

Bok, J., Bronner-Fraser, M., & Wu, D. K. (2005). Role of the hindbrain in dorsoventral but not anteroposterior axial specification of the inner ear. *Development*, *132*(9), 2115-2124.

Bok, J., Raft, S., Kong, K. A., Koo, S. K., Dräger, U. C., & Wu, D. K. (2011). Transient retinoic acid signaling confers anterior-posterior polarity to the inner ear. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(1), 161-166.

Borck, G., Rehman, A. U., Lee, K., Pogoda, H. M., Kakar, N., Von Ameln, S., ... & Ansar, M. (2011). Loss-of-function mutations of ILDR1 cause autosomal-recessive hearing impairment DFNB42. *The American Journal of Human Genetics*, *88*(2), 127-137.

Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *7*(9), 678.

Brocal, I., White, R. J., Dooley, C. M., Carruthers, S. N., Clark, R., Hall, A., ... & Kettleborough, R. N. (2016). Efficient identification of CRISPR/Cas9-induced insertions/deletions by direct germline screening in zebrafish. *BMC genomics*, *17*(1), 259.

Brown, S. D., Hardisty-Hughes, R. E., & Mburu, P. (2008). Quiet as a mouse: dissecting the molecular and genetic basis of hearing. *Nature reviews. Genetics*, *9*(4), 277.

Brownstein, M. J., Carpten, J. D., & Smith, J. R. (1996). Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques*, *20*(6), 1004-6.

Carrington, B., Varshney, G. K., Burgess, S. M., & Sood, R. (2015). CRISPR-STAT: an easy and reliable PCR-based method to evaluate target-specific sgRNA activity. *Nucleic acids research*, *43*(22), e157-e157.

Chang, J. L., Brauer, D. S., Johnson, J., Chen, C. G., Akil, O., Balooch, G., ... & Ritchie, R. O. (2010). Tissue-specific calibration of extracellular matrix material properties by transforming growth factor-β and Runx2 in bone is required for hearing. *EMBO reports*, *11*(10), 765-771.

Charitidi, K., Meltser, I., Tahera, Y., & Canlon, B. (2009). Functional responses of estrogen receptors in the male and female auditory system. *Hearing research*, *252*(1), 71-78.

Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., ... & Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, *90*(3), 569-580.

Chen, Q., Li, W., Wan, Y., Xia, X., Wu, Q., Chen, Y., ... & Li, W. (2012). Amplified in breast cancer 1 enhances human cholangiocarcinoma growth and chemoresistance by simultaneous activation of Akt and Nrf2 pathways. *Hepatology*, *55*(6), 1820-1829.

Chen, J., Ingham, N., Kelly, J., Jadeja, S., Goulding, D., Pass, J., ... & White, J. K. (2014). Spinster homolog 2 (spns2) deficiency causes early onset progressive hearing loss. *PLoS genetics*, *10*(10), e1004688.

Chen, D. Y., Liu, X. F., Lin, X. J., Zhang, D., Chai, Y. C., Yu, D. H., ... & Sun, L. H. (2016a). A dominant variant in DMXL2 is linked to nonsyndromic hearing loss. *Genetics in Medicine*, *19*(5), 553-558.

Chen, M., Wang, Q., Zhu, G. H., Hu, P., Zhou, Y., Wang, T., ... & Xie, D. H. (2016b). Progressive hearing loss and degeneration of hair cell stereocilia in taperin gene knockout mice. *Biochemical and biophysical research communications*, *479*(4), 703-707.

Chopra, A. R., Louet, J. F., Saha, P., An, J., DeMayo, F., Xu, J., ... & Chan, L. (2008). Absence of the SRC-2 coactivator results in a glycogenopathy resembling Von Gierke's disease. *Science*, *322*(5906), 1395-1399.

Chopra, A. R., Kommagani, R., Saha, P., Louet, J. F., Salazar, C., Song, J., ... & Chan, L. (2011). Cellular energy depletion resets whole-body energy by promoting coactivator-mediated dietary fuel absorption. *Cell metabolism*, *13*(1), 35-43.

Chu, H. W., Rios, C., Huang, C., Wesolowska-Andersen, A., Burchard, E. G., O'Connor, B. P., ... & Seibold, M. A. (2015). CRISPR-Cas9 mediated gene knockout in primary human airway epithelial cells reveals a pro-inflammatory role for MUC18. *Gene therapy*, *22*(10), 822.

Coleman, K. M., & Smith, C. L. (2001). Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, *6*, D1379-91.

Coste, A., Antal, M. C., Chan, S., Kastner, P., Mark, M., O'malley, B. W., & Auwerx, J. (2006). Absence of the steroid receptor coactivator-3 induces B-cell lymphoma. *The EMBO journal*, *25*(11), 2453-2464.

Coste, A., Louet, J. F., Lagouge, M., Lerin, C., Antal, M. C., Meziane, H., ... & Auwerx, J. (2008). The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1α. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(44), 17187-17192.

Cotanche, D. A., & Kaiser, C. L. (2010). Hair cell fate decisions in cochlear development and regeneration. *Hearing research*, *266*(1), 18-25.

Cureoglu, S., Baylan, M. Y., & Paparella, M. M. (2010). Cochlear otosclerosis. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, *18*(5), 357.

Dantas, V. D. G. L. (2013). *Estudos moleculares na perda auditiva de herança autossômica dominante.* (Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo).

Darimont, B. D., Wagner, R. L., Apriletti, J. W., Stallcup, M. R., Kushner, P. J., Baxter, J. D., ... & Yamamoto, K. R. (1998). Structure and specificity of nuclear receptor–coactivator interactions. *Genes & development*, *12*(21), 3343-3356.

Dasgupta, S., Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2014). Nuclear receptor coactivators: master regulators of human health and disease. *Annual review of medicine*, *65*, 279-292.

Davis, H., & Silverman, S. R. (1970). Auditory test hearing aids. *Davis H, Silverman SR. Hearing and deafness. Holt: Rinehart and Winston*, 253-79.

Deng, H., Huang, X., & Yuan, L. (2016). Molecular genetics of the COL2A1-related disorders. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *768*, 1-13.

Diaz-Horta, O., Abad, C., Sennaroglu, L., Foster, J., DeSmidt, A., Bademci, G., ... & Fitoz, S. (2016). ROR1 is essential for proper innervation of auditory hair cells and hearing in humans and mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(21), 5993-5998.

Doench, J. G., Hartenian, E., Graham, D. B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., ... & Root, D. E. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nature biotechnology*, *32*(12), 1262-1267.

Doetzlhofer, A., Basch, M. L., Ohyama, T., Gessler, M., Groves, A. K., & Segil, N. (2009). Hey2 regulation by FGF provides a Notch-independent mechanism for maintaining pillar cell fate in the organ of Corti. *Developmental cell*, *16*(1), 58-69.

Dror, A. A., & Avraham, K. B. (2009). Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annual review of genetics*, *43*, 411-437.

Duteil, D., Chambon, C., Ali, F., Malivindi, R., Zoll, J., Kato, S., ... & Metzger, D. (2010). The transcriptional coregulators TIF2 and SRC-1 regulate energy homeostasis by modulating mitochondrial respiration in skeletal muscles. *Cell metabolism*, *12*(5), 496-508.

Dutton, K., Abbas, L., Spencer, J., Brannon, C., Mowbray, C., Nikaido, M., ... & Whitfield, T. T. (2009). A zebrafish model for Waardenburg syndrome type IV reveals diverse roles for Sox10 in the otic vesicle. *Disease models & mechanisms*, *2*(1-2), 68-83.

Evangelou, E., Kerkhof, H. J., Styrkarsdottir, U., Ntzani, E. E., Bos, S. D., Esko, T., ... & Thorleifsson, G. (2014). A meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel variants associated with osteoarthritis of the hip. *Annals of the rheumatic diseases*, *73*(12), 2130-2136.

Fajardo, K. V. F., Adams, D., Mason, C. E., Sincan, M., Tifft, C., Toro, C., ... & Markello, T. (2012). Detecting false-positive signals in exome sequencing. *Human mutation*, *33*(4), 609-613.

Freter, S., Muta, Y., Mak, S. S., Rinkwitz, S., & Ladher, R. K. (2008). Progressive restriction of otic fate: the role of FGF and Wnt in resolving inner ear potential. *Development*, *135*(20), 3415-3424.

Gagnon, J. A., Valen, E., Thyme, S. B., Huang, P., Ahkmetova, L., Pauli, A., ... & Schier, A. F. (2014). Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PloS one*, *9*(5), e98186.

Gee, F., Rushton, M. D., Loughlin, J., & Reynard, L. N. (2015). Correlation of the osteoarthritis susceptibility variants that map to chromosome 20q13 with an expression quantitative trait locus operating on NCOA3 and with functional variation at the polymorphism rs116855380. *Arthritis & Rheumatology*, *67*(11), 2923-2932.

Gehin, M., Mark, M., Dennefeld, C., Dierich, A., Gronemeyer, H., & Chambon, P. (2002). The function of TIF2/GRIP1 in mouse reproduction is distinct from those of SRC-1 and p/CIP. *Molecular and cellular biology*, *22*(16), 5923-5937.

Ghysen, A., & Dambly-Chaudiere, C. (2004). Development of the zebrafish lateral line. *Current opinion in neurobiology*, *14*(1), 67-73.

Gleason, M. R., Nagiel, A., Jamet, S., Vologodskaia, M., López-Schier, H., & Hudspeth, A. J. (2009). The transmembrane inner ear (Tmie) protein is essential for normal hearing and balance in the zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(50), 21347-21352.

Guruharsha, K. G., Kankel, M. W., & Artavanis-Tsakonas, S. (2012). The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nature Reviews Genetics*, *13*(9), 654-666.

Haddon, C., & Lewis, J. (1996). Early ear development in the embryo of the zebrafish, Danio rerio. *Journal of Comparative Neurology*, *365*(1), 113-128.

Haddon, C., Jiang, Y. J., Smithers, L., & Lewis, J. (1998). Delta-Notch signalling and the patterning of sensory cell differentiation in the zebrafish ear: evidence from the mind bomb mutant. *Development*, *125*(23), 4637-4644.

Hammond, K. L., Loynes, H. E., Folarin, A. A., Smith, J., & Whitfield, T. T. (2003). Hedgehog signalling is required for correct anteroposterior patterning of the zebrafish otic vesicle. *Development*, *130*(7), 1403-1417.

Hammond, K. L., van Eeden, F. J., & Whitfield, T. T. (2010). Repression of Hedgehog signalling is required for the acquisition of dorsolateral cell fates in the zebrafish otic vesicle. *Development*, *137*(8), 1361-1371.

Hammond, K. L., & Whitfield, T. T. (2011). Fgf and Hh signalling act on a symmetrical pre-pattern to specify anterior and posterior identity in the zebrafish otic placode and vesicle. *Development*, *138*(18), 3977-3987.

Han, S. J., DeMayo, F. J., Xu, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., & O'malley, B. W. (2006). Steroid receptor coactivator (SRC)-1 and SRC-3 differentially modulate tissue-specific activation functions of the progesterone receptor. *Molecular Endocrinology*, *20*(1), 45-55.

Han, Y., Mu, Y., Li, X., Xu, P., Tong, J., Liu, Z., ... & Meng, A. (2011). Grhl2 deficiency impairs otic development and hearing ability in a zebrafish model of the progressive dominant hearing loss DFNA28. *Human molecular genetics*, *20*(16), 3213-3226.

Hederstierna, C., Hultcrantz, M., Collins, A., & Rosenhall, U. (2010). The menopause triggers hearing decline in healthy women. *Hearing research*, *259*(1), 31-35.

Heeringa, S. F., Chernin, G., Chaki, M., Zhou, W., Sloan, A. J., Ji, Z., ... & Killen, P. D. (2011). COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *The Journal of clinical investigation*, *121*(5), 2013-2024.

Hickox, A. E., Wong, A. C., Pak, K., Strojny, C., Ramirez, M., Yates, J. R., ... & Savas, J. N. (2016). Global Analysis of Protein Expression of Inner Ear Hair Cells. *Journal of Neuroscience*, 2267-16.

Hilgert, N., Smith, R. J., & Van Camp, G. (2009). Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics?. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *681*(2), 189-196.

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... & McLaren, S. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498.

Huang, Z. J., Edery, I., & Rosbash, M. (1993). PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors. *Nature*, *364*(6434), 259-262.

Hultcrantz, M., Sylvén, L., & Borg, E. (1994). Ear and hearing problems in 44 middle-aged women with Turner's syndrome. *Hearing research*, *76*(1), 127-132.

Hultcrantz, M. (2003). Ear and hearing problems in Turner's syndrome. *Acta oto-laryngolog*

IBGE. Censo Populacional 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (http://censo2010.ibge.gov.br/.

Itoh, M., & Chitnis, A. B. (2001). Expression of proneural and neurogenic genes in the zebrafish lateral line primordium correlates with selection of hair cell fate in neuromasts. *Mechanisms of development*, *102*(1), 263-266.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*(6096), 816-821.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., & Kitamoto, T. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*, *270*(5241), 1491.

Kazmierczak, M., Harris, S. L., Kazmierczak, P., Shah, P., Starovoytov, V., Ohlemiller, K. K., & Schwander, M. (2015). Progressive hearing loss in mice carrying a mutation in Usp53. *Journal of Neuroscience*, *35*(47), 15582-15598.

Keats, B. J., & Berlin, C. I. (1999). Genomics and hearing impairment. *Genome research*, *9*(1), 7-16.

Kelley, M. W., Talreja, D. R., & Corwin, J. T. (1995). Replacement of hair cells after laser microbeam irradiation in cultured organs of corti from embryonic and neonatal mice. *Journal of Neuroscience*, *15*(4), 3013-3026.

Kettleborough, R. N., Busch-Nentwich, E. M., Harvey, S. A., Dooley, C. M., de Bruijn, E., van Eeden, F., ... & Fényes, F. (2013). A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature*, *496*(7446), 494.

Khetarpal, U., Robertson, N. G., Yoo, T. J., & Morton, C. C. (1994). Expression and localization of COL2A1 mRNA and type II collagen in human fetal cochlea. *Hearing research*, *79*(1), 59-73.

Kiernan, A. E., Pelling, A. L., Leung, K. K., & Tang, A. S. (2005). Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature*, *434*(7036), 1031.

Kiernan, A. E., Xu, J., & Gridley, T. (2006). The Notch ligand JAG1 is required for sensory progenitor development in the mammalian inner ear. *PLoS genetics*, *2*(1), e4.

Koh, S. S., Chen, D., Lee, Y. H., & Stallcup, M. R. (2001). Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(2), 1089-1098.

Kommareddi, P., Nair, T., Kakaraparthi, B. N., Galano, M. M., Miller, D., Laczkovich, I., ... & Kanicki, A. (2015). Hair Cell Loss, Spiral Ganglion Degeneration, and Progressive Sensorineural Hearing Loss in Mice with Targeted Deletion of Slc44a2/Ctl2. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, *16*(6), 695-712.

Kwon, H. J. (2016). Vitamin D receptor deficiency impairs inner ear development in zebrafish. *Biochemical and biophysical research communications*, *478*(2), 994-998.

Lachize, S., Apostolakis, E. M., van der Laan, S., Tijssen, A. M., Xu, J., de Kloet, E. R., & Meijer, O. C. (2009). Steroid receptor coactivator-1 is necessary for regulation of corticotropin-releasing hormone by chronic stress and glucocorticoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(19), 8038-8042.

Lanford, P. J., Shailam, R., Norton, C. R., Ridley, T., & Kelley, M. W. (2000). Expression of Math1 and HES5 in the cochleae of wildtype and Jag2 mutant mice. *JARO-Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, *1*(2), 161-171.

Lezirovitz, K., Braga, M. C. C., Thiele-Aguiar, R. S., Auricchio, M. T. B. M., Pearson, P. L., Otto, P. A., & Mingroni-Netto, R. C. (2009). A novel autosomal dominant deafness locus (DFNA58) maps to 2p12-p21. *Clinical genetics*, *75*(5), 490-493.

Lezirovitz, K., Batissoco, A. C., Lima, F. T., Auricchio, M. T., Nonose, R. W., dos Santos, S. R., ... & Mingroni-Netto, R. C. (2012). Aberrant transcript produced by a splice donor site deletion in the TECTA gene is associated with autosomal dominant deafness in a Brazilian family. *Gene*, *511*(2), 280-284.

Li, H., Kloosterman, W., & Fekete, D. M. (2010). MicroRNA-183 family members regulate sensorineural fates in the inner ear. *Journal of Neuroscience*, *30*(9), 3254-3263.

Li, J., Zhao, X., Xin, Q., Shan, S., Jiang, B., Jin, Y., ... & Xiao, J. (2015). Whole-Exome Sequencing Identifies a Variant in TMEM132E Causing Autosomal-Recessive Nonsyndromic Hearing Loss DFNB99. *Human mutation*, *36*(1), 98-105.

Li, M., Zhao, L., Page-McCaw, P. S., & Chen, W. (2016). Zebrafish Genome Engineering Using the CRISPR–Cas9 System. *Trends in Genetics*, *32*(12), 815-827.

Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature reviews. Genetics*, *8*(5), 353.

Litsiou, A., Hanson, S., & Streit, A. (2005). A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head. *Development*, *132*(18), 4051-4062.

Liu, Z., Liao, L., Zhou, S., & Xu, J. (2008). Generation and validation of a mouse line with a floxed SRC-3/AIB1 allele for conditional knockout. *International journal of biological sciences*, *4*(4), 202.

Liu, H., Pecka, J. L., Zhang, Q., Soukup, G. A., Beisel, K. W., & He, D. Z. (2014). Characterization of transcriptomes of cochlear inner and outer hair cells. *Journal of Neuroscience*, *34*(33), 11085-11095.

Louet, J. F., Coste, A., Amazit, L., Tannour-Louet, M., Wu, R. C., Tsai, S. Y., ... & O'Malley, B. W. (2006). Oncogenic steroid receptor coactivator-3 is a key regulator of the white adipogenic program. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(47), 17868-17873.

Louet, J. F., Chopra, A. R., Sagen, J. V., An, J., York, B., Tannour-Louet, M., ... & Bain, J. R. (2010). The coactivator SRC-1 is an essential coordinator of hepatic glucose production. *Cell metabolism*, *12*(6), 606-618.

Ma, X., Xu, L., Wang, S., Cui, B., Li, X., Xu, J., & Ning, G. (2011). Deletion of steroid receptor coactivator-3 gene ameliorates hepatic steatosis. *Journal of hepatology*, *55*(2), 445-452.

Ma, H., Marti-Gutierrez, N., Park, S. W., Wu, J., Lee, Y., Suzuki, K., ... & Darby, H. (2017). Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, *548*(7668), 413-419.Masaki, K., Gu, J. W., Ghaffari, R., Chan, G., Smith, R. J., Freeman, D. M., & Aranyosi, A. J. (2009). Col11a2 deletion reveals the molecular basis for tectorial membrane mechanical anisotropy. *Biophysical journal*, *96*(11), 4717-4724.

Matsuda, M., & Chitnis, A. B. (2010). Atoh1a expression must be restricted by Notch signaling for effective morphogenesis of the posterior lateral line primordium in zebrafish. *Development*, *137*(20), 3477-3487.

McDermott, B. M., Baucom, J. M., & Hudspeth, A. J. (2007). Analysis and functional evaluation of the hair-cell transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(28), 11820-11825.

Meeker, N. D., Hutchinson, S. A., Ho, L., & Trede, N. S. (2007). Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. *Biotechniques*, *43*(5), 610.

Melchionda, S., Ahituv, N., Bisceglia, L., Sobe, T., Glaser, F., Rabionet, R., ... & Zelante, L. (2001). MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *The American Journal of Human Genetics*, *69*(3), 635-640.

Meltser, I., Tahera, Y., Simpson, E., Hultcrantz, M., Charitidi, K., Gustafsson, J. Å., & Canlon, B. (2008). Estrogen receptor β protects against acoustic trauma in mice. *The Journal of clinical investigation*, *118*(4), 1563.

Millimaki, B. B., Sweet, E. M., Dhason, M. S., & Riley, B. B. (2007). Zebrafish atoh1 genes: classic proneural activity in the inner ear and regulation by Fgf and Notch. *Development*, *134*(2), 295-305.

Mo, P., Zhou, Q., Guan, L., Wang, Y., Wang, W., Miao, M., ... & Su, G. (2015). Amplified in breast cancer 1 promotes colorectal cancer progression through enhancing notch signaling. *Oncogene*, *34*(30), 3935.

Mohammad, K. S., Chen, C. G., Balooch, G., Stebbins, E., McKenna, C. R., Davis, H., ... & Bracey, J. W. (2009). Pharmacologic inhibition of the TGF-β type I receptor kinase has anabolic and anti-catabolic effects on bone. *PloS one*, *4*(4), e5275.

Montgomery, J., Carton, G., Voigt, R., Baker, C., & Diebel, C. (2000). Sensory processing of water currents by fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *355*(1401), 1325-1327.

Moody, S. A. (Ed.). (2014). *Principles of developmental genetics*. Academic Press.

Mora, J. F., & Brown, M. (2000). AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Molecular and cellular biology*, *20*(14), 5041-5047.

Moreno-Mateos, M. A., Vejnar, C. E., Beaudoin, J. D., Fernandez, J. P., Mis, E. K., Khokha, M. K., & Giraldez, A. J. (2015). CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9 targeting in vivo. *Nature methods*, *12*(10), 982.

Morsli, H., Choo, D., Ryan, A., Johnson, R., & Wu, D. K. (1998). Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. *Journal of Neuroscience*, *18*(9), 3327-3335.

Nicolson, T. (2005). The genetics of hearing and balance in zebrafish. *Annu. Rev. Genet.*, *39*, 9-22.

Nishihara, E., Yoshida-Komiya, H., Chan, C. S., Liao, L., Davis, R. L., O'Malley, B. W., & Xu, J. (2003). SRC-1 null mice exhibit moderate motor dysfunction and delayed development of cerebellar Purkinje cells. *Journal of Neuroscience*, *23*(1), 213-222.

Oghan, F., & Coksuer, H. (2012). Comparative audiometric evaluation of hearing loss between the premenopausal and postmenopausal period in young women. *American journal of otolaryngology*, *33*(3), 322-325.

Ohyama, T., Mohamed, O. A., Taketo, M. M., Dufort, D., & Groves, A. K. (2006). Wnt signals mediate a fate decision between otic placode and epidermis. *Development*, *133*(5), 865-875.

Patchev, A. V., Fischer, D., Wolf, S. S., Herkenham, M., Götz, F., Gehin, M., ... & Almeida, O. F. (2007). Insidious adrenocortical insufficiency underlies neuroendocrine dysregulation in TIF-2 deficient mice. *The FASEB Journal*, *21*(1), 231-238.

Pereira, T. C. (Org) (2016). *Introdução à técnica de CRISPR* (1ª ed). Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética,

Picard, F., Géhin, M., Annicotte, J. S., Rocchi, S., Champy, M. F., O'Malley, B. W., ... & Auwerx, J. (2002). SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell*, *111*(7), 931-941.

Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, *8*(11), 2281-2308.

Reineke, E. L., York, B., Stashi, E., Chen, X., Tsimelzon, A., Xu, J., ... & O'Malley, B. W. (2012). SRC-2 coactivator deficiency decreases functional reserve in response to pressure overload of mouse heart. *PloS one*, *7*(12), e53395.

Riccomagno, M. M., Martinu, L., Mulheisen, M., Wu, D. K., & Epstein, D. J. (2002). Specification of the mammalian cochlea is dependent on Sonic hedgehog. *Genes & Development*, *16*(18), 2365-2378.

Riccomagno, M. M., Takada, S., & Epstein, D. J. (2005). Wnt-dependent regulation of inner ear morphogenesis is balanced by the opposing and supporting roles of Shh. *Genes & development*, *19*(13), 1612-1623.

Romero-Carvajal, A., Acedo, J. N., Jiang, L., Kozlovskaja-Gumbrienė, A., Alexander, R., Li, H., & Piotrowski, T. (2015). Regeneration of sensory hair cells requires localized interactions between the Notch and Wnt pathways. *Developmental cell*, *34*(3), 267-282.

Rost, S., Bach, E., Neuner, C., Nanda, I., Dysek, S., Bittner, R. E., ... & Müller, C. R. (2014). Novel form of X-linked nonsyndromic hearing loss with cochlear malformation caused by a mutation in the type IV collagen gene COL4A6. *European Journal of Human Genetics*, *22*(2), 208.

Sai, X., & Ladher, R. K. (2015). Early steps in inner ear development: induction and morphogenesis of the otic placode. *Frontiers in pharmacology*, *6*.

Sampson, T. R., & Weiss, D. S. (2014). CRISPR-Cas systems: new players in gene regulation and bacterial physiology. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *4*.

Sanggaard, K. M., Kjaer, K. W., Eiberg, H., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Hoffman, K., ... & Tranebjærg, L. (2008). A novel nonsense mutation in MYO6 is associated with progressive nonsyndromic hearing loss in a Danish DFNA22 family. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *146*(8), 1017-1025.

Sapède, D., Dyballa, S., & Pujades, C. (2012). Cell lineage analysis reveals three different progenitor pools for neurosensory elements in the otic vesicle. *Journal of Neuroscience*, *32*(46), 16424-16434.

Scheffer, D. I., Shen, J., Corey, D. P., & Chen, Z. Y. (2015). Gene expression by mouse inner ear hair cells during development. *Journal of Neuroscience*, *35*(16), 6366-6380.

Schmidt, M. V., Oitzl, M., Steenbergen, P., Lachize, S., Wurst, W., Müller, M. B., ... & Meijer, O. C. (2007). Ontogeny of steroid receptor coactivators in the hippocampus and their role in regulating postnatal HPA axis function. *Brain research*, *1174*, 1-6.

Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology*, *18*(2), 233-234.

Shah, A. N., Davey, C. F., Whitebirch, A. C., Miller, A. C., & Moens, C. B. (2015). Rapid reverse genetic screening using CRISPR in zebrafish. *Nature methods*, *12*(6), 535-540.

Shen, X., Liu, F., Wang, Y., Liu, F., Xia, W., Ma, J., Wang, H., Zhang, J., ... & Ma, D. (2015). Down-regulation of msrb3 and destruction of normal auditory system development through hair cell apoptosis in zebrafish. *International Journal of Developmental Biology*, *59*(4-5-6), 195-203.

Simonoska, R., Stenberg, A. E., Duan, M., Yakimchuk, K., Fridberger, A., Sahlin, L., ... & Hultcrantz, M. (2009). Inner ear pathology and loss of hearing in estrogen receptor-β deficient mice. *Journal of Endocrinology*, *201*(3), 397-406.

Smeti, I., Assou, S., Savary, E., Masmoudi, S., & Zine, A. (2012). Transcriptomic analysis of the developing and adult mouse cochlear sensory epithelia. *PloS one*, *7*(8), e42987.

Smeti, I., Watabe, I., Savary, E., Fontbonne, A., & Zine, A. (2014). HMGA2, the architectural transcription factor high mobility group, is expressed in the developing and mature mouse cochlea. *PloS one*, *9*(2), e88757.

Smith, R. J., Shearer, A. E., Hildebrand, M. S., & Van Camp, G. (2014). Deafness and hereditary hearing loss overview.

Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., & Allis, C. D. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, *389*(6647), 194.

Stashi, E., Lanz, R. B., Mao, J., Michailidis, G., Zhu, B., Kettner, N. M., ... & Dean, A. (2014). SRC-2 is an essential coactivator for orchestrating metabolism and circadian rhythm. *Cell reports*, *6*(4), 633-645.

Stein, G. S., Lian, J. B., Van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Montecino, M., Javed, A., ... & Pockwinse, S. M. (2004). Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene*, *23*(24), 4315.

Stenberg, A. E., Wang, H., Sahlin, L., & Hultcrantz, M. (1999). Mapping of estrogen receptors α and β in the inner ear of mouse and rat. *Hearing research*, *136*(1), 29-34.

Stenberg, A. E., Wang, H., Fish, J. 3., Schrott-Fischer, A., Sahlin, L., & Hultcrantz, M. (2001). Estrogen receptors in the normal adult and developing human inner ear and in Turner's syndrome. *Hearing research*, *157*(1), 87-92.

Stooke-Vaughan, G. A., Obholzer, N. D., Baxendale, S., Megason, S. G., & Whitfield, T. T. (2015). Otolith tethering in the zebrafish otic vesicle requires Otogelin and α-Tectorin. *Development*, *142*(6), 1137-1145.

Svedbrant, J., Bark, R., Hultcrantz, M., & Hederstierna, C. (2015). Hearing decline in menopausal women–a 10-year follow-up. *Acta oto-laryngologica*, *135*(8), 807-813.

Thisse, C., & Thisse, B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature protocols*, *3*(1), 59.

Thyme, S. B., Akhmetova, L., Montague, T. G., Valen, E., & Schier, A. F. (2016). Internal guide RNA interactions interfere with Cas9-mediated cleavage. *Nature communications*, *7*.

Tompson, S. W., Bacino, C. A., Safina, N. P., Bober, M. B., Proud, V. K., Funari, T., ... & Eyre, D. R. (2010). Fibrochondrogenesis results from mutations in the COL11A1 type XI collagen gene. *The American Journal of Human Genetics*, *87*(5), 708-712.

Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., & Kamei, Y. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*, *387*(6634), 677.

Ueyama, T., Ninoyu, Y., Nishio, S. Y., Miyoshi, T., Torii, H., Nishimura, K., ... & Watanabe, N. (2016). Constitutive activation of DIA1 (DIAPH1) via C-terminal truncation causes human sensorineural hearing loss. *EMBO molecular medicine*, *8*(11), 1310-1324.

Varshney, G. K., Pei, W., LaFave, M. C., Idol, J., Xu, L., Gallardo, V., ... & Harper, U. (2015). High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Genome research*, *25*(7), 1030-1042.

Visosky, A. M. B., Johnson, J., Bingea, B., Gurney, T., & Lalwani, A. K. (2003). Otolaryngological manifestations of cleidocranial dysplasia, concentrating on audiological findings. *The Laryngoscope*, *113*(9), 1508-1514.

Voegel, J. J., Heine, M. J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P., & Gronemeyer, H. (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and-independent pathways. *The EMBO journal*, *17*(2), 507-519.

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

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

Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F. J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., & O'malley, B. W. (1998). Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science*, *279*(5358), 1922-1925.

Xu, J., Liao, L., & Ning, G. (2000). The steroid receptor coactivator SRC3 is required for normal growth, puberty female reproductive function and mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA*, *97*(12), 6379-6384.

Xu, J., & Li, Q. (2003). Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Molecular endocrinology*, *17*(9), 1681-1692.

Xu, Y., Chen, Q., Li, W., Su, X., Chen, T., Liu, Y., ... & Yu, C. (2010). Overexpression of transcriptional coactivator AIB1 promotes hepatocellular carcinoma progression by enhancing cell proliferation and invasiveness. *Oncogene*, *29*(23), 3386.

Yan, J., & Tsai, S. Y. (2006). SRC-3/AIB1: transcriptional coactivator in oncogenesis. *Acta pharmacologica Sinica*, *27*(4), 387-394.

Yan, J., Erdem, H., Li, R., Cai, Y., Ayala, G., Ittmann, M., ... & Tsai, M. J. (2008). Steroid receptor coactivator-3/AIB1 promotes cell migration and invasiveness through focal adhesion turnover and matrix metalloproteinase expression. *Cancer research*, *68*(13), 5460-5468.

Yen, S. T., Zhang, M., Deng, J. M., Usman, S. J., Smith, C. N., Parker-Thornburg, J., ... & Behringer, R. R. (2014). Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR/Cas9 RNA injections in mouse zygotes. *Developmental biology*, *393*(1), 3-9.

York, B., Yu, C., Sagen, J. V., Liu, Z., Nikolai, B. C., Wu, R. C., ... & O'Malley, B. W. (2010). Reprogramming the posttranslational code of SRC-3 confers a switch in mammalian systems biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(24), 11122-11127.

York, B., Reineke, E. L., Sagen, J. V., Nikolai, B. C., Zhou, S., Louet, J. F., ... & Adesina, A. M. (2012). Ablation of steroid receptor coactivator-3 resembles the human CACT metabolic myopathy. *Cell metabolism*, *15*(5), 752-763.

York, B., Sagen, J. V., Tsimelzon, A., Louet, J. F., Chopra, A. R., Reineke, E. L., ... & Bain, J. R. (2013). Research resource: tissue-and pathway-specific metabolomic profiles of the steroid receptor coactivator (SRC) family. *Molecular endocrinology*, *27*(2), 366-380.

York, B., Sagen, J. V., Tsimelzon, A., Louet, J. F., Chopra, A. R., Reineke, E. L., ... & Bain, J. R. (2013). Research resource: tissue-and pathway-specific metabolomic profiles of the steroid receptor coactivator (SRC) family. *Molecular endocrinology*, *27*(2), 366-380.

Yoshida, H., Liu, J., Samuel, S., Cheng, W., Rosen, D., & Naora, H. (2005). Steroid receptor coactivator-3, a homolog of Taiman that controls cell migration in the Drosophila ovary, regulates migration of human ovarian cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology*, *245*(1), 77-85.

Yuan, Y., Liao, L., Tulis, D. A., & Xu, J. (2002). Steroid receptor coactivator-3 is required for inhibition of neointima formation by estrogen. *Circulation*, *105*(22), 2653-2659.

Wang, Z., Rose, D. W., Hermanson, O., Liu, F., Herman, T., Wu, W., ... & Rosenfeld, R. (2000). Regulation of somatic growth by the p160 coactivator p/CIP. *Procee*

Wang, Z., Shah, O. J., & Hunter, T. (2012). The transcriptional coactivators p/CIP and SRC-1 control insulin resistance through IRS1 in obesity models. *PloS one*, *7*(7), e36961.

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

Waterston, R. H., & Pachter, L. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, *420*(6915), 520-562.

Weiss, R. E., Xu, J., Ning, G., Pohlenz, J., O'Malley, B. W., & Refetoff, S. (1999). Mice deficient in the steroid receptor co-activator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *The EMBO journal*, *18*(7), 1900-1904.

Westerfield, M. (2007). *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish Danio (" Brachydanio Rerio")*. University of Oregon.

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

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

Winnay, J. N., Xu, J., O'malley, B. W., & Hammer, G. D. (2006). Steroid receptor coactivator-1-deficient mice exhibit altered hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocrinology*, *147*(3), 1322-1332.

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

Wu, Z., Yang, M., Liu, H., Guo, H., Wang, Y., Cheng, H., & Chen, L. (2012). Role of nuclear receptor coactivator 3 (Ncoa3) in pluripotency maintenance. Journal of Biological Chemistry, 287(45), 38295-38304.

Zhao, C., Yasui, K., Lee, C. J., Kurioka, H., Hosokawa, Y., Oka, T., & Inazawa, J. (2003). Elevated expression levels of NCOA3, TOP1, and TFAP2C in breast tumors as predictors of poor prognosis. *Cancer*, *98*(1), 18-23.

Zheng, J. L., Shou, J., Guillemot, F., Kageyama, R., & Gao, W. Q. (2000). Hes1 is a negative regulator of inner ear hair cell differentiation. *Development*, *127*(21), 4551-4560.

Zhu, L., Yang, Y., Xu, P., Zou, F., Yan, X., Liao, L., ... & Xu, Y. (2013). Steroid receptor coactivator-1 mediates estrogenic actions to prevent body weight gain in female mice. *Endocrinology*, *154*(1), 150-158.

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

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

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

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

http://hereditaryhearingloss.org/

http://www.internationalgenome.org/

http://www.mousephenotype.org/

http://www.mutationtaster.org/

http://primer3.ut.ee/

http://research.nhgri.nih.gov

https://shield.hms.harvard.edu

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

http://sift.jcvi.org/

https://swissmodel.expasy.org/

http://www.who.int/

http://zfin.org/

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