

Ádilla Latielle Abelha de Santana

Caracterização fenotípica do zebrafish (*Danio rerio*) portador de knockout no gene *prop1* gerado pela técnica de edição genômica CRISPR/Cas9 na fase adulta.

São Paulo

2023

Ádilla Latielle Abelha de Santana

Caracterização fenotípica do zebrafish (*Danio rerio*) portador de knockout no gene *prop1* gerado pela técnica de edição genômica CRISPR/Cas9 na fase adulta

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

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciani Renata Silveira de Carvalho

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santana, Ádilla Latielle Abelha de
Caracterização fenotípica do zebrafish (Danio rerio) portador de knockout no gene propl gerado pela técnica de edição genômica CRISPR/Cas9 na fase adulta / Ádilla Latielle Abelha de Santana. -- São Paulo, 2023.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.
Orientadora: Luciani Renata Silveira de Carvalho.

Descritores: 1.Hipopituitarismo 2.Fertilidade 3.Proteína 9 associada à CRISPR 4.Hipófise 5.Peixe-zebra

USP/FM/DBD-094/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Trabalho realizado no Laboratório de
Hormônios e Genética Molecular (LIM42)
do Serviço de Endocrinologia e
Metabologia do HC-FMUSP e Centro de
Bioterismo da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo

*Aos meus pais, **Marilucia** e **Joilson**, por sempre
acreditarem em mim e por terem abdicado
de suas vidas em prol das realizações e da felicidade de
suas filhas.*

Agradecimientos

Primeiramente a **Deus**, pela dádiva da vida e por me permitir realizar sonhos que eu jamais imaginei realizar. Sua presença não me permitiu desistir, mesmo em meio aos obstáculos que enfrentei durante essa jornada.

À Profª Drª **Luciani Renata Silveira de Carvalho**, pela orientação e dedicação. Obrigada pelos ensinamentos, paciência e por acreditar na minha competência para finalizar esse trabalho.

À minha mãe, **Marilucia Abelha de Santana**. Mãe, a senhora é incrível! Obrigada por me apoiar nessa trajetória tão árdua. Obrigada por todas as lições de amor incondicional, caridade, amizade e compreensão.

Ao meu pai, **Joilson Ferreira de Santana**, pelo exemplo de caráter, por sempre incentivar os meus estudos e por acreditar em mim.

À minha irmã querida, **Maquela Abelha de Santana**, obrigada por festejar cada nova vitória conquistada, pelas comidas gostosas que é feita com tanto carinho e por sempre querer o meu bem.

À minha sobrinha, **Maria Eduarda de Santana Matos**, por ser o meu orgulho! Vejo um futuro brilhante pra você.

Ao meu amor, **Victor Yuri Danoel**, por absolutamente tudo, principalmente pela compreensão e ajuda. Obrigada por permanecer ao meu lado, mesmo sem a atenção devida e por acreditar em mim quando eu mesma não tive forças para acreditar. Esse título também é seu!

À minha sogra, **Solange Aparecida Danoel**, que sempre, de uma forma ou outra, deu-me estímulo para seguir esse caminho até a finalização.

Ao meu cunhado, **Kleber Kenite Takahashi**, por toda a parceria e disponibilidade.

À **Bianca Helena Ventura Fernandes**. Bi, eu nem sei como agradecer por toda a ajuda que você me deu. Por muitas vezes eu me senti só e você me acolheu

com toda paciência e educação do mundo. Você é uma mulher incrível e eu sou sua fã. Te admiro demais! Não só pela cientista, mas também pela pessoa que você é.

Ao **Dr Joel Claudio Heimann**, por ser o início de tudo. Tenho muito orgulho de ter sido sua aluna, mesmo por pouco tempo.

À **Amanda Pereira**, por ser essa pessoa incrível e por estar presente em todas as fases dessa caminhada.

À **Gleide Sanges**, por todo o cuidado com os animais e pelas conversas gostosas durante a tarde. Sentirei saudades!

Aos colegas do Biotério Central da FMUSP, em especial ao **Robison Cruz** e a **Milena Mota**.

Aos colegas e funcionários do LIM 42, em especial ao **Nicholas Trigueiro**, principalmente pela contribuição nesse trabalho.

Aos meus amigos do **LIM 16** – **Ivone Braga**, **Beatriz Geoffroy**, **Júlia Braga** e **Wagner Vasques**, o apoio moral de vocês foi muito significativo pra mim. Obrigada pelos encontros pós expedientes e conversas divertidas.

As minhas amigas do **Hospital Israelita Albert Einstein** - **Dayane Masutani** e **Camilla Pereira**. Ah, meninas! Obrigada pelo ombro amigo! Foram tantas conversas de apoio durante esses anos, é? Obrigada por indiretamente ajudar nesse percurso árduo.

“Construí amigos, enfrentei derrotas, venci obstáculos, bati na porta da vida e disse-lhe: Não tenho medo de vivê-la!”

(Augusto Cury)

Normatização Adotada

Esta Tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus

Sumário

Lista de abreviaturas

Nomenclatura

Lista de símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1.Introdução.....	1
1.1 Hipófise.....	2
1.2 Embriogênese hipofisária em mamíferos.....	5
1.3 Hipopituitarismo congênito em modelos animais disponíveis para estudo.....	5
1.4 O zebrafish(<i>Danio rerio</i>) como um modelo animal.....	6
1.5 O zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como modelo animal para estudar o gene <i>prop1</i>	7
1.6 CRISPR/Cas9 e geração de um modelo animal com variante alélica patogênica no gene <i>prop1</i>	10
2.Justificativa.....	14
3.Objetivos.....	16
4. Material e métodos.....	18
4.1 Aspectos éticos.....	19

4.2 Descrição da linhagem.....	19
4.3 Manutenção do zebrafish.....	19
4.4 Reprodução do zebrafish.....	19
4.5 Análise da Expressão Proteica.....	21
4.6 Análise da fertilidade e fecundidade dos mutantes <i>prop1</i> (-/-).....	22
4.7 Caracterização do tamanho na fase adulta.....	22
4.8 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	23
4.8.1 Extração de RNA.....	23
4.8.2 Transcrição reversa.....	24
4.8.3 Primers.....	25
4.8.4 Mix para PCR em tempo real.....	25
4.8.5. Análise estatística.....	27
5.Resultados.....	28
5.1 Avaliação da fertilidade restaurada espontaneamente.....	29
5.2 Avaliação do comprimento corporal.....	30
5.3 Análise proteica.....	30
5.4 Expressão gênica dos hormônios hipofisários <i>lh</i> , <i>tsh</i> , <i>gh1</i> e <i>fsh</i>	32

6.Discussão.....	34
7.Conclusão.....	39
8.Referências.....	41
9.Anexos.....	49

Lista de Abreviações

CRISPR – Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

Cas9 – CRISPR associated protein 9

Prop1 – homeobox protein prophet of Pit-1

prop1 - prophet of pit1, paired-like homeobox

LH – hormônio luteinizante

FSH – hormônio foliculoestimulante

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

GH – hormônio do crescimento

PRL – prolactina

TSH – hormônio tireoestimulante

Hpf – horas pós-fertilização

Dpf – dias pós-fertilização

Dpc – dias pós-coito

DNA – ácido desoxirribonucleico

RNA – ácido ribonucleico

sgRNA – *single-guide* RNA

PCR – reação em cadeia da polimerase

dNTP - desoxirribonucleotídeos fosfatados

WT – *wild type*

HM – homocigoto

pb – pares de base

Ct – *cycle threshold*

cDNA – DNA complementar

qPCR – PCR em tempo real

RT-PCR – reação da transcriptase reversa

Nomenclatura

Humanos: gene em caixa alta, *itálico*. Proteína com a mesma grafia, mas não em *itálico*.

Camundongos: gene com a primeira letra em caixa alta, *itálico*. Proteína com a mesma grafia, mas não em *itálico*.

Zebrafish: gene com grafia em caixa baixa, *itálico*. Proteína com a primeira letra em caixa alta, sem *itálico*.

Lista de símbolos

μL – microlitros

mm – milímetros

mg – miligramas

ng - nanogramas

mM – milimolar

μM – micromolar

M – molar

β - Beta

Lista de tabelas

Tabela 1. Protocolo para reação de cDNA.....	25
Tabela 2. Protocolo de programação do termociclador para reação de cDNA.....	25
Tabela 3. Sequências de primers para a RT qPCR.....	26
Tabela 4. Protocolo para a reação de RT-PCR.....	26
Tabela 5. Protocolo de programação do equipamento Aria Mx.....	27

Lista de figuras

Figura 1: Esquema representativo ilustrando as etapas da embriogênese hipofisária em camundongos e a atuação de fatores de transcrição.....	4
Figura 2: Casal de “Zebrafish”, macho apresenta um corpo esguio e alongado em comparação com a fêmea.....	6
Figura 3: Genes ortólogos compartilhados entre o genoma do humano, camundongo, frango e zebrafish.....	7
Figura 4: Sequência de aminoácidos da proteína PROP1 codificada pelo gene <i>PROP1</i> e zebrafish.....	9
Figura 5: Estrutura 3D da proteína PROP1 codificada pelo gene <i>PROP1</i> em humanos e zebrafish.....	9
Figura 6: Análise de alinhamento das sequências de aminoácidos correspondentes ao homeodomínio das proteínas Prop1 de humanos e zebrafish.....	10
7: Alvos da edição genômica e animais fundadores (F0) escolhidos para estabelecer a linhagem com <i>knock-out</i> no gene <i>prop1</i>	11
Figura 8: Comparação de tamanho e expressão gênica nos estágios iniciais do desenvolvimento.....	12
Figura 9: Modelo de aquário para acasalamento: <i>sex on the beach</i>	20
Figura 10: Placa de petri com embriões desovados.....	20

Figura 11: Medidas utilizadas para avaliar o crescimento e desenvolvimento no Zebrafish.....	23
Figura 12: Representação de como foi realizada a medição do comprimento padrão.....	23
Figura 13: A contabilização dos ovos postos.....	29
Figura 14: Análise do comprimento em <i>standard length</i> (SL) na fase adulta.....	30
Figura 15: Expressão proteica.....	31
Figura 16: Expressão proteica após protocolo de adsorção.....	31
Figura 17: Histonas.....	32
Figura 18: Expressão gênica dos hormônios hipofisários na fase adulta.....	32

RESUMO

Santana ALA. *Caracterização fenotípica do zebrafish (Danio rerio) portador de knockout no gene prop1 gerado pela técnica de edição genômica CRISPR/Cas9 na fase adulta* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2023.

Hipopituitarismo congênito é definido como a deficiência de um ou mais hormônios da hipófise e pode ocorrer devido a mutações em fatores de transcrição envolvidos na embriogênese hipofisária. Em humanos, as variantes alélicas patogênicas no *PROP1* são a causa mais comum de hipopituitarismo congênito que se manifesta com déficit de GH (hormônio de crescimento), TSH (hormônio tireoestimulante), PRL (prolactina), gonadotrofinas (FSH e LH), e déficit variável e progressivo de ACTH. O gene *PROP1* é responsável pelo deslocamento de células tronco/progenitoras da zona marginal para dentro do lobo anterior da hipófise onde elas irão se diferenciar. Esse gene é altamente conservado entre as espécies e é responsável direta ou indiretamente pela produção e secreção de hormônios hipofisários. A dissertação de mestrado da aluna de Mestrado Caroline Caetano Silva defendida na disciplina de endocrinologia do HCFMUSP teve como objetivo gerar um modelo animal zebrafish com variante alélica patogênica no gene *prop1*, e a iniciação científica da Aluna Débora Bissegatto teve o objetivo de fazer a caracterização auxológica e molecular do modelo com nocaute no período larval. Nessa fase observou-se uma redução do tamanho do peixe com variante deletéria quando comparado com o selvagem com 13 dias após fertilização, sendo restaurado o crescimento em 20dpf. A expressão gênica evidenciou uma diminuição do fator de transcrição hipofisário *pit1* e do transcrito do hormônio hipofisário *gh1* durante o desenvolvimento larval. O presente estudo se propõe a fazer caracterização fenotípica, no seu aspecto de fertilidade e crescimento, do modelo animal portador de variante alélica no gene *prop1* na vida adulta. Foram avaliados os

transcritos dos hormônios hipofisários gh1, lh, fsh e tsh e também foi feita a comparação da quantidade de ovos postos, além da medição do tamanho dos animais adultos. Não houve diferença significativa entre os grupos, mostrando que o animal gerado tem o fenótipo restaurado de forma espontânea.

Descritores: Hipopituitarismo; Fertilidade; Proteína 9 associada à CRISPR; Hipófise; Peixe-zebra.

ABSTRACT

Santana ALA. *Phenotypic characterization of zebrafish (Danio rerio) with a knockout in the prop1 gene generated by the CRISPR/Cas9 genomic edition in adulthood* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Congenital hypopituitarism is defined as the deficiency of one or more pituitary hormones and may occur due to mutations in transcription factors involved in pituitary embryogenesis. In humans, pathogenic allelic variants in PROP1 are the most common cause of congenital hypopituitarism that manifests with deficits in GH (growth hormone), TSH (thyroid-stimulating hormone), PRL (prolactin), gonadotropins (FSH and LH), and variable and progressive ACTH. The PROP1 gene is responsible for the displacement of stem/progenitor cells from the marginal zone into the anterior lobe of the pituitary gland where they will differentiate. This gene is highly conserved across species and is directly or indirectly responsible for the production and secretion of pituitary hormones. The master's thesis of Master's student Caroline Caetano Silva defended in the discipline of endocrinology at HCFMUSP aimed to generate a zebrafish animal model with a pathogenic allelic variant in the prop1 gene, and the scientific initiation of Student Débora Bissegatto aimed to make the auxological characterization and molecular of the model with knockout in the larval period. In this phase, a reduction in the size of the fish with the deleterious variant was observed when compared to the wild type at 13 days after fertilization, with restoration in the size at 20dpf. Gene expression showed a decrease in the pituitary transcription factor pit1 and the pituitary hormone gh1 transcript during larval development. The present study proposes to carry out a phenotypic characterization in terms of fertility and growth features in an animal model carrying an allelic variant in the prop1 gene in adulthood. The transcripts of the pituitary hormones gh1, lh, fsh and tsh were evaluated and the amount of eggs laid was also compared, in addition to measuring the size of the adult animals. There was no significant difference between the groups, showing that the generated animal has the phenotype spontaneously restored.

Descriptors: Hypopituitarism; Fertility; CRISPR-associated protein 9; Hypophysis; Zebrafish.

1. Introdução

1.1 Hipófise

A glândula hipófise é uma estrutura vital do corpo humano, pois desempenha funções cruciais para a funcionalidade biológica normal. Faz parte do eixo hipotálamo-hipofisário e controla diversos processos essenciais do organismo, através da produção e secreção de hormônios. Anatomicamente, a glândula está localizada em uma estrutura óssea (sela túrcica) na base do crânio e é dividida em duas porções: adenohipófise ou hipófise anterior, e neurohipófise ou hipófise posterior. A origem embriológica é distinta, sendo a adenohipófise originada a partir do ectoderma oral e a neurohipófise a partir do ectoderma neural (Zhu; Gleiberman; Rosenfeld, 2007) (Nunes, 2012) (Otto et al., 2015) (Ganapathy; Tadi, 2021) . A adenohipófise é dividida em *pars distalis* e *pars intermedialis*, sendo a *pars distalis* responsável pela produção da maioria dos hormônios hipofisários e a *pars intermedialis* responsável, unicamente, pela secreção do hormônio melanotrófico (α -MSH), importante apenas no desenvolvimento fetal, particularmente para o desenvolvimento do sistema nervoso central, porém, após o nascimento essa região perde a sua funcionalidade, sendo assim, o α -MSH é indetectável na circulação. (Nunes, 2012).

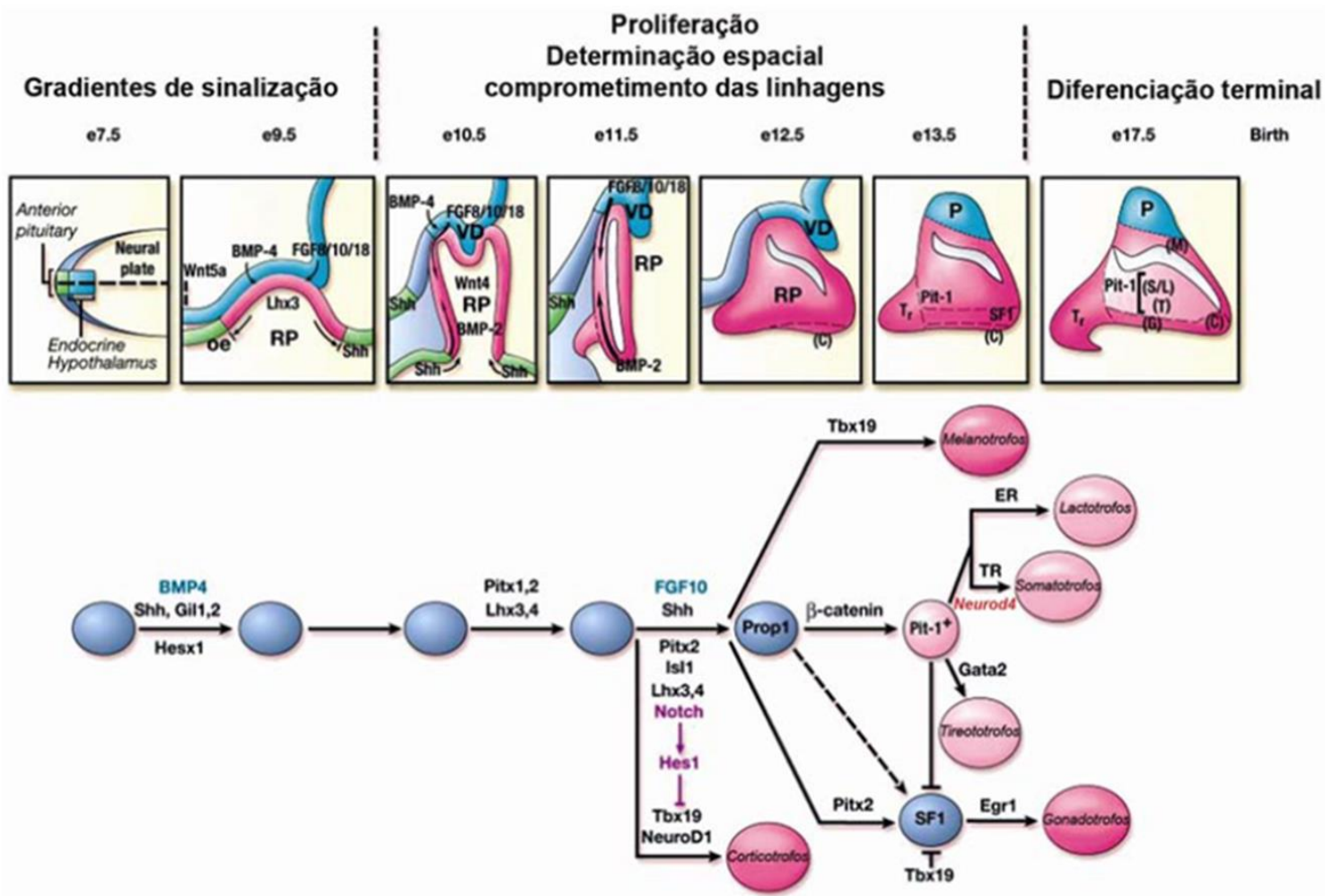
A adenohipófise é composta por cinco tipos celulares distintos: corticotrofos, tireotrofos, gonadotrofos, somatotrofos e lactotrofos. Essas células são responsáveis pela biosíntese e secreção, respectivamente, do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); hormônio tireoestimulante (TSH); hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH); hormônio do crescimento (GH); e prolactina (PRL). A secreção destes hormônios é controlada pelos hormônios produzidos pelo hipotálamo e secretados na circulação portal hipofisária, atingindo as células secretoras na adenohipófise (Barret, 2017) .(Nunes, 2012).

1.2. Embriogênese hipofisária em mamíferos

O processo de embriogênese hipofisária é altamente conservado entre os mamíferos (Pogoda; Hammerschmidt, 2007; X et al., 2007) O desenvolvimento

da hipófise é dividido em: Iniciação da organogênese hipofisária, início do desenvolvimento da Bolsa de Rathke, formação da Bolsa de Rathke definitiva e determinação da linhagem e diferenciação celular. Vários fatores de transcrição estão envolvidos na formação da hipófise, entre eles o *Hesx1*, *Gli2*, *Lhx3*, *Lhx4* e *Gata2* estão associados no desenvolvimento inicial, e os fatores *Prop1* e *Pou1f1* (ou *Pit1*), descritos na migração e diferenciação dos tipos celulares, estão envolvidos na etapa final do desenvolvimento (Schoenmakers *et al.*, 2015; Larkin S *et al.*, 2000; Madeira *et al.*, 2017).

A partir de 8º dia pós coito (dpc) é visualizado em camundongos o espessamento do ectoderma oral e as células presentes neste evento irão dar origem à bolsa de Rathke, e a sua interação celular com o diencéfalo, proveniente do ectoderma neural, mostrou-se necessária para o desenvolvimento posterior da glândula (Dattani; Robinson, 2000). A expressão



de fatores de transcrição, como *Bmp4*, *Fgf8/10/18* e *Wtn5* são induzidos pelo ectoderma neural e são importantes para a formação da adenohipófise. (Quentien *et al.*, 2006) e *Ttf1* (Lazzaro *et al.*, 1991) (Kimura *et al.*, 1996).

Figura1: Esquema representativo ilustrando as etapas da embriogênese hipofisária em camundongos e a atuação de fatores de transcrição. FONTE: Adaptado de (Zhu, Gleiberman e Rosenfeld, 2007).

Entre o 8,5 e 9,5 dpc, já é possível identificar a bolsa de Rathke como uma estrutura definida, apesar de ela ainda se manter ligada ao ectoderma neural. A bolsa de Rathke estará completamente formada aos 10,5 dpc. A proliferação do epitélio do lúmen dessa estrutura se prolifera durante o período de 10,5-12 dpc e se torna uma estrutura separada do ectoderma oral ao 12,5 dpc. (Schoenmakers *et al.*, 2015). As células progenitoras que se encontram no lúmen da bolsa de Rathke começam a sair do ciclo celular, coincidindo com o pico de expressão do *Prop1* e iniciam uma transição semelhante a transição epitelial-mesenquimal (*EMT-like*), perdendo as suas ligações e movendo-se para a parte anterior da glândula, formando o lobo anterior. A partir do 14,5dpc, as células progenitoras começam a expressar fatores de transcrição considerados marcadores genéticos intermediários da diferenciação de cada linhagem celular hipofisária.

O gene *PROP1* (Prophet of Pit1, Paired-Like Homeodomain Transcription Factor) possui três éxons altamente conservados, localizados no cromossomo 5, na região q3.5.3 em humanos, codificando um fator de transcrição de 226 aminoácidos, pertencente à família *paired-like homeobox*. O domínio *homeodomain* da proteína, de 60 aminoácidos, é responsável pela capacidade de ligação ao DNA e é codificado pelo éxon 2 do gene (Dattani; Robinson, 2000) (Bottner *et al.*, 2004).

A proteína PROP1 é necessária para a ativação da expressão do *Pit1* e camundongos, o *Pit1* é necessário para a expressão de 3 hormônios: GH, TSH e PRL, pois ativa a expressão dos genes responsáveis pela produção dos hormônios hipofisários *tshb*, *gh1* e *prl*, tanto como ativador transcricional direto quanto por meio de outras proteínas como a Beta-Catenina. O *PROP1* age como

ativador transcricional do *Pit1* ao se ligar à região *enhancer* do gene após formar um complexo com a Beta-Catenina (Davis *et al.*, 2016)

1.3. Hipopituitarismo congênito em modelos animais disponíveis para estudo

O hipopituitarismo congênito é uma doença caracterizada pela deficiência na produção de 1 ou mais hormônios hipofisários sendo a deficiência de GH a mais comum das deficiências dos hormônios hipofisários. As variantes alélicas patogênicas em fatores de transcrição hipófise-específicos envolvidos na embriogênese hipofisária são a causa mais comum dessa doença em humanos, um deles sendo o *PROP1*. variantes alélicas patogênicas neste gene são a causa genética mais comum de hipopituitarismo congênito (prevalência de 53% na casuística estudada no Ambulatório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, Brasil), que se manifesta com déficit de GH, TSH, PRL e gonadotrofinas (FSH e LH), podendo ou não haver progressão para deficiência de ACTH. Estes pacientes não entram na puberdade ou têm a puberdade interrompida. (Madeira *et al.*, 2017). A maioria das variantes alélicas no gene *PROP1* encontradas em pacientes com hipopituitarismo se localizam no segundo éxon (Madeira *et al.*, 2017; Sornson *et al.*, 1996). A imagem da região hipofisária pode cursar com hipófise normal, hipoplásica ou hiperplásica. Os casos descritos são de herança recessiva com casos esporádicos filhos de pais consanguíneos e a grande maioria de casos familiares (Bottner *et al.*, 2004; Duquesnoy *et al.*, 1998). Um dos modelos animais disponíveis para realizar estudos sobre essa condição é a linhagem *Ames* de camundongo, que carrega uma variante alélica patogênica missense espontânea no gene *Prop1* (*Prop1^{df/df}*) e cursa com deficiência no crescimento, hipotireoidismo e infertilidade. Nesse modelo há a especificação dos subtipos celulares, porém, não há a multiplicação e expansão dessas células (somatotrofos, lactotrofos e tireotrofos) Dattani e Robinson (2000).

Em 2016 Davis e colaboradores realizaram um estudo em camundongos *Prop^{df/df}(Ser83pro)* e *Prop1^{-/-}* e afirmaram que, esses animais apresentavam deficiência congênita na linhagem de células dependente de *Pit1* (somatotrofos, lactotrofos e tireotrofos) com diminuição das gonadotrofinas e preservação do

eixo corticotrofo. Em contraste, humanos com variantes alélicas patogênicas no *PROP1* apresentam deficiência hormonal evolutiva da linhagem *PIT1* dependente (GH, TSH, PRL) assim como deficiência de gonadotrofinas e cortisol.

1.4. O Zebrafish (*Danio rerio*) como um modelo animal

O Zebrafish ou paulistinha (*Danio rerio*) é um pequeno teleósteo (3-4 cm) de água doce do sudeste da Ásia, da família Cyprinidae. Seu uso como modelo animal tem diversas vantagens em comparação com os roedores dado a sua fácil manutenção, pequeno porte, menor custo para criação, rápido metabolismo e alta taxa reprodutiva. Constituem excelente modelo experimental para estudos genéticos, toxicológicos, para desvendar o mecanismo de diversas doenças humanas além de testar novos agentes terapêuticos (Lieschke; Currie, 2007; Kari; Rodeck; Dicker, 2007).

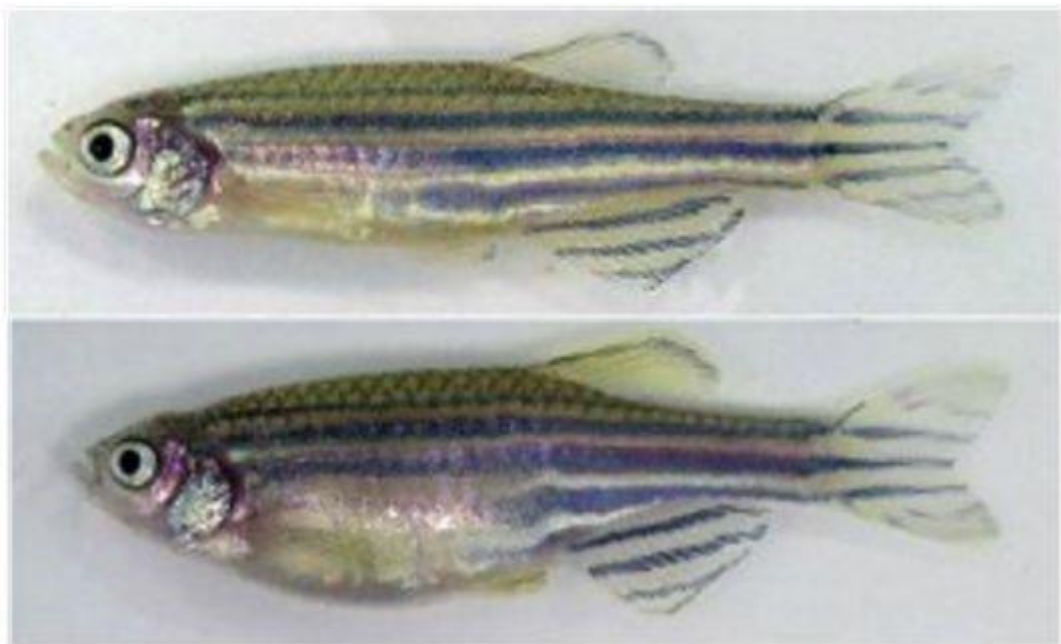


Figura 2: Casal de “Zebrafish”, macho apresenta um corpo esguio (acima) e alongado em comparação com a fêmea (abaixo). FOTO:acervo pessoal - Fernandes, BHV.

De acordo com um artigo publicado na *Nature*, 70% dos genes humanos codificadores de proteínas estão relacionados a genes encontrados no zebrafish (Howe et.al.,2013).

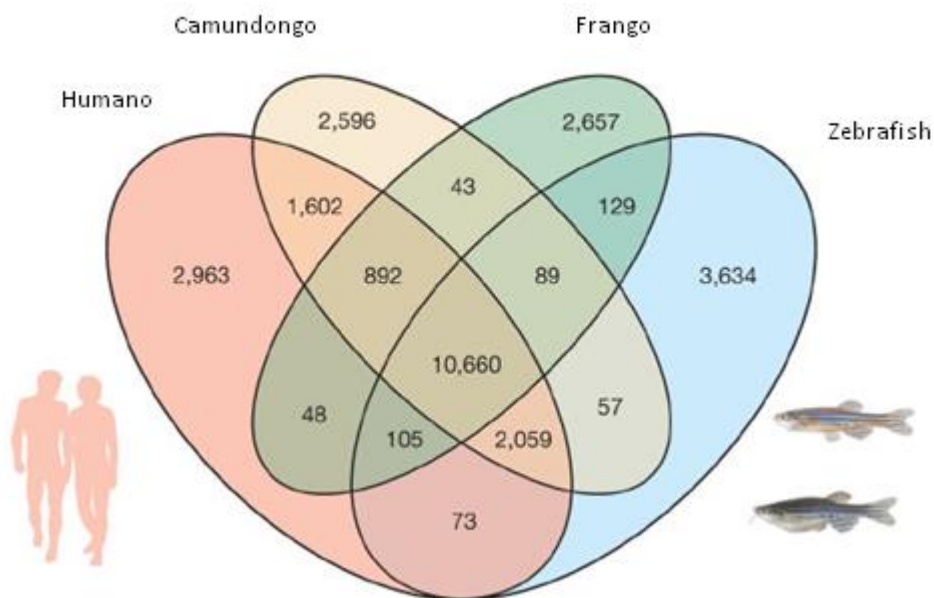


Figura 3: Genes ortólogos compartilhados entre o genoma do humano, camundongo, frango e zebrafish. FONTE: Adaptado de (Howe et.al,2013)

As características de sua embriogênese já são bem conhecidas, assim como o destino celular durante o seu desenvolvimento (Kimmel, 1988) (Kimmel, 1989). Sua formação embrionária é rápida e de fácil visualização. Além disso, o zebrafish tem um ciclo de vida mais rápido do que os de camundongos. Com 72 horas pós fertilização (hpf) entram em fase larval; seu crescimento é rápido e exacerbado entre o 9^o e 51^o dia pós-fertilização (dpf); ao 50^o dpf, entram na fase de maturação sexual e com 90 dpf são considerados sexualmente maduros (Figura 2), permitindo que, em um curto período de tempo, seja possível estudar todas as fases do desenvolvimento do animal (He et al., 2014).

1.5. O Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo animal para estudar o gene *prop1*

Uma pesquisa bibliográfica feita usando os termos “*prop1* and zebrafish” mostrou como resultado apenas um artigo publicado com esse modelo animal, mostrando que são necessários mais estudos envolvendo esse fator de transcrição para ampliar a caracterização tanto fenotípica, quanto molecular do zebrafish.

A hipófise do Zebrafish está localizada abaixo do hipotálamo, porém, diferentemente dos mamíferos, o sistema de circulação portal que conecta o hipotálamo a hipófise encontra-se ausente e tanto a adenohipófise quanto a neurohipófise estão conectadas diretamente ao hipotálamo por células hipotalâmicas neurosecretoras. Outra característica anatômica que difere dos mamíferos é a ausência de divisão entre *pars distalis* e *pars intermedialis*, mas os tipos celulares se encontram organizados em domínios no lobo anterior, que abriga dois ou três tipos celulares (Pogoda; Hammerschmidt, 2007). Neste modelo, seis linhagens celulares se diferenciam durante a embriogênese, sendo cinco delas semelhantes encontradas em humanos e camundongos, somadas aos melanotrofos, produtores de pró-opiomelanocortina (POMC), um precursor hormonal tanto do ACTH como do α -MSH (Pogoda; Hammerschmidt, 2007) (Angotzi et al., 2011).

As características principais do sistema endócrino observadas em mamíferos se encontram conservadas no zebrafish, como a similaridade entre os sistemas de controle endócrino da reprodução, os mecanismos de controle de diferenciação e maturação sexual, tornando este animal um modelo adequado para ser utilizado em estudos do sistema endócrino. (Löhr; Hammerschmidt, 2011).

Os genes deste teleósteo são evolutivamente conservados e apresentam alto grau de similaridade com os genes humanos e de camundongos (Lieschke; Currie, 2007) (Barbazuk et al., 2000).

Em 2011, Angotzi e colaboradores analisaram o gene ortólogo ao *prop1* existente no zebrafish e descobriram que a expressão é específica da hipófise. O gene *prop1* também possui três éxons e o homeodomínio é codificado principalmente pelo segundo éxon, do aminoácido 56 ao aminoácido 115 da proteína.

A

PROP1 Human - 075360 [69-128]				
MEAERRRQAE	KPKKGRVGSN	LLPERHPATG	TPTTTVDSSA	PPCRRLPGAG
GGRSRFSPQG	GQRGRPHSRR	GQRGRPHSRR	LEQLESAFGR	NQYPDIWARE
SLARDTGLSE	ARIQVWFQNR	RAKQRKQERS	LLQPLAHLSP	AAFSSFLPES
TACPYSYAAP	PPPVTCTFPH	YSHALPSQPS	TGGAFALSHQ	SEDWYPTLHP
APAGHLPCPP	PPPMLPLSLE	PSKSWN		

B

PROP1 Zebrafish - B8R403 [56-115]				
MDIEKPQQQF	PENYSEVTVS	SSADIDVQIH	PRKVSQKSES	VRDGGARARP
YSPSRRRRHR	TTFSNEQLEH	LELAFRQNHY	PDIYYREELA	RVTKLNEARI
QVWFQNRRAK	QRKQDRITQK	SLAVSMMPVR	GPLFSTMCVS	SSAMGRQCQC
PHSLPHVPQF	SPVLPPGGYP	PHPSSGSQFS	SPSGSLPSQA	NRQPNDWYNQ
LRNIGPSPTS	VLSLASVPGL	ESTSHWN		

Figura 4: Sequência de aminoácidos da proteína *PROP1* codificada pelo gene *PROP1* em humanos (O75360) está representada em (A) e a sequência de aminoácidos da proteína *PROP1* codificada pelo gene *prop1* em Zebrafish (B8R403) representada em (B). Em amarelo destacam-se os homeodomínios.

FONTE: (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021).

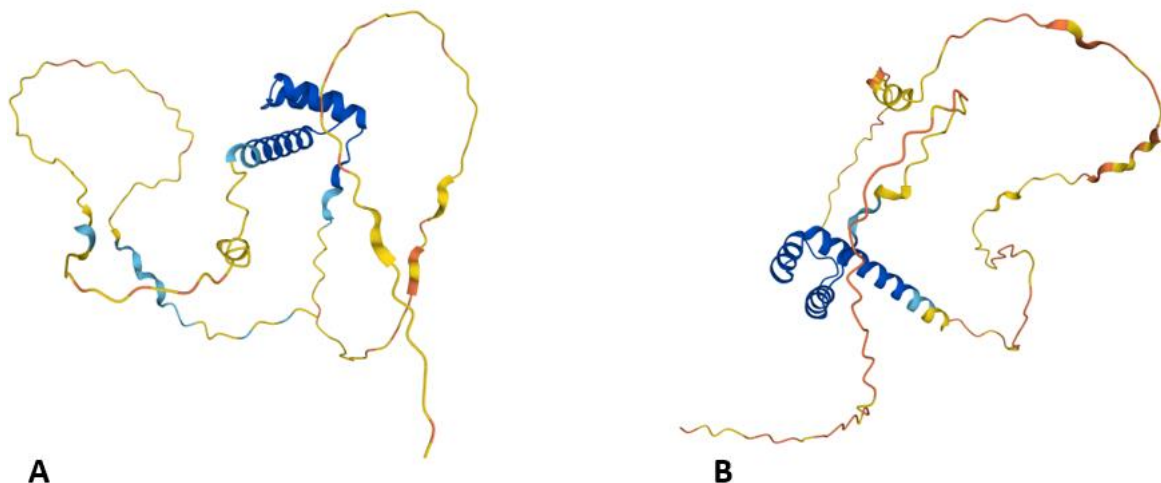


Figura 5: Estrutura 3D da proteína *PROP1* codificada pelo gene *PROP1* em humanos (O75360) está representada em (A) e a estrutura da proteína *PROP1* codificada pelo gene *prop1* em Zebrafish (B8R403) representada em (B).

A semelhança entre o homeodomínio das proteínas das duas espécies é de 75% de acordo com análises de pareamento realizadas com o software BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Figura 5), provando que esse domínio é importante para a produção da proteína e é conservado entre as duas espécies, sendo assim, o zebrafish é um modelo animal válido para estudar os efeitos da variante alélica patogênica no *prop1* e realizar comparações com o fenótipo encontrado em humanos portadores de variante alélica patogênica no mesmo gene.

sp|O75360|69-128
Sequence ID: Query_24449 Length: 60 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 60 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
89.7 bits(221)	2e-31	Compositional matrix adjust.	45/60 (75%)	49/60(81%)	0/60(0%)
Query 1	RRRHRTTFSNEQLEHLELAFRQNHYPDIYYREELARVTKLNEARIQANFQNRRAKQKQD	60			
	RRRHRTTFS QLE LE AF +N YPDI+ RE LAR T L+EARIQ WFNRRAKQKQ+				
Sbjct 1	RRRHRTTFS PVQLEQLS AFGRNQYPDIWARES LARDTGLSEARIQWVFNRRAKQKQE	60			

Figura 6: Análise de alinhamento das sequências de aminoácidos correspondentes ao homeodomínio das proteínas Prop1 (zebrafish) e PROP1 (humanos) indica similaridade de 75% entre os aminoácidos.

1.6. CRISPR/Cas9 e geração de um modelo animal com variante alélica patogênica no gene *prop1*

Na dissertação de mestrado de Caetano Silva (2017) foram gerados Zebrafish com edição genômica do gene *prop1*, que neste modelo se localiza no cromossomo 13, através da técnica de CRISPR/Cas9 (Silva;2017). Com dois componentes, esse sistema de edição usa uma sequência de RNA para guiar a endonuclease Cas9 ao alvo através da correlação de bases (Jinek et al., 2012). A técnica de CRISPR/Cas9 provou-se eficiente em zebrafish quando a Cas9 e o RNA guia (sgRNA) são injetados no zigoto no estágio de uma célula, podendo resultar em um organismo com inativação bialélica do gene em quase todas as células (Jao; Went; Chen, 2013).

Foram desenhados três sgRNA, tendo como alvo o segundo éxon do gene *prop1* de acordo com a sequência depositada no Zfin por Angotzi et.al. (2001) .

Para estabelecer a linhagem, foram selecionado o animal (F0) que apresentou uma inserção de 32 pares de base levando a uma alteração na fase de leitura e a inserção de um stop códon prematuro no aminoácido 61 da proteína (Figura 5). Conforme dito anteriormente, o éxon 2 é de grande importância no gene e no funcionamento da proteína, por codificar o homeodomínio do fator de transcrição, responsável pela capacidade de ligação ao DNA (Madeira *et al.*, 2017) (Dattani; Robinson, 2000).

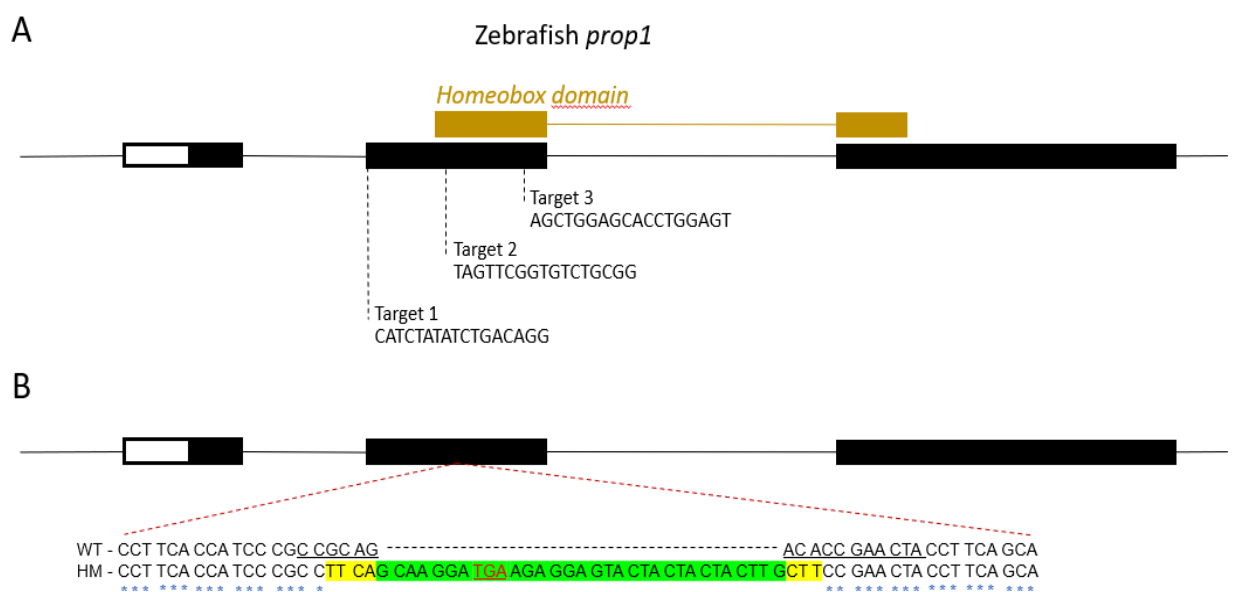


Figura 7: Alvos da edição genômica e animais fundadores (F0) escolhidos para estabelecer a linhagem com *knock-out* no gene *prop1*. (A) Estrutura genômica do gene *prop1* do *Danio rerio*. Os três alvos para edição genômica foram desenhados no éxon 2 do gene, que compreende o domínio homeobox da proteína, indicado em amarelo. A sequência codificadora e a sequência não-traduzida estão representadas por quadrados pretos e brancos, respectivamente. (B) variantes alélicas patogênicas encontradas no animal F0 utilizado para estabelecer a linhagem. Destacado em amarelo, trocas de nucleotídeos (g.337G>T); (g.338C>T); (g.339A>C); (g.340G>A). Destacado em verde, a inserção de 32 pares de base, seguindo a fase de leitura, e em vermelho sublinhado, o códon de parada inserido. Sublinhado em preto na sequência *wild type* (WT) se encontra o alvo do sgRNA 2.

Análises prévias realizadas durante a execução do projeto de Iniciação Científica com bolsa de IC FAPESP (Processo 2018/04616-0) “Caracterização fenotípica do Zebrafish (*Danio rerio*) portador de variante alélica patogênica no gene *prop1* gerado por edição genômica pela técnica de CRISPR/Cas9”

demonstraram que durante o desenvolvimento embrionário, os animais homozigotos apresentam uma diminuição significativa na expressão do fator de transcrição *pit1* e dos transcritos do hormônio hipofisário *gh1*, mesmo enquanto a expressão do *prop1* se encontrava à níveis comparáveis aos níveis observados em animais selvagens vide figura 6. Esse estudo mostrou que durante o desenvolvimento pós-embrionário, os animais homozigotos apresentavam uma significativa diferença no crescimento corporal aos 13dpf (Figura 8). Entretanto, aos 20dpf, o crescimento do homozigoto se apresentou semelhante ao selvagem (Figura 8).

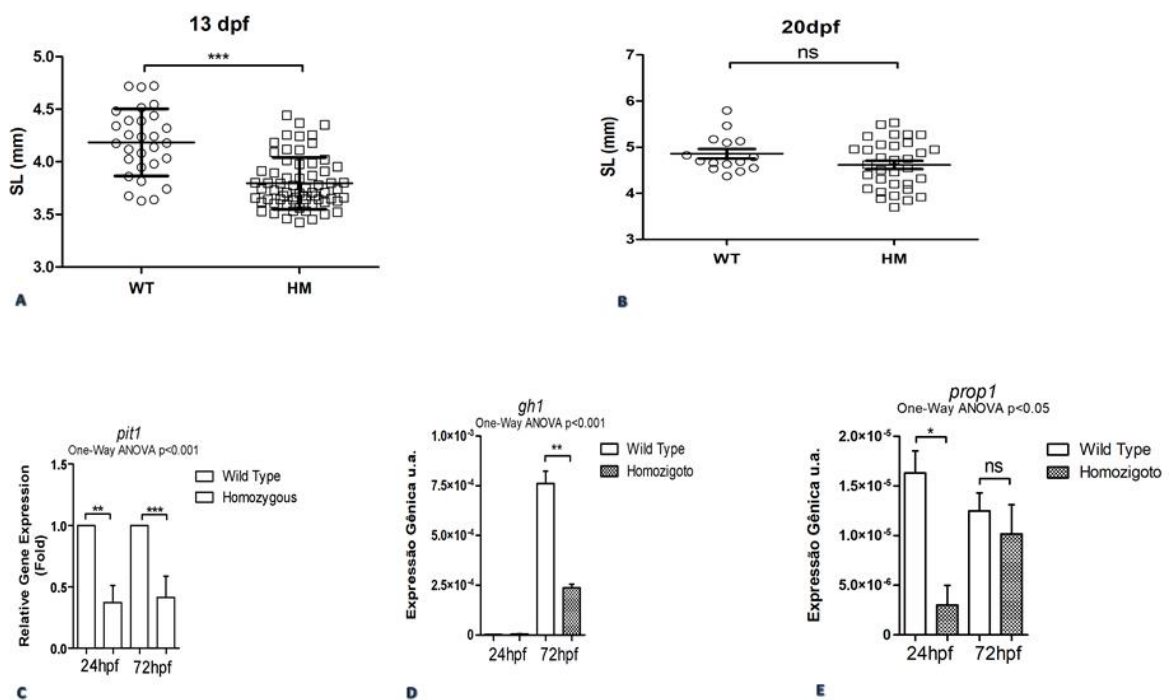


Figura 8: (A) Análise do comprimento em *standard length* (SL) em 13dpf revela que os animais homozigotos apresentavam comprimentos menores em comparação com os animais *wild type* ($p < 0.0001$) (B) Análise do comprimento em *standard length* (SL) em 20dpf revela que os animais homozigotos não apresentavam diferença de comprimento em relação aos animais *wild type* neste período. (C) Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real do gene *pit1* revela alterações significativas em 24hpf que persistem em 72hpf. Foi aplicado o teste estatístico One-Way ANOVA ($p < 0.001$). (D) Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real do gene *gh1* indicando expressão comparável aos animais *wild type* nos animais homozigotos em 24hpf. Em

72hpf, a expressão do *gh1* nos animais homozigotos se encontra significativamente diminuída em comparação aos animais *wild type*. Foi aplicado o teste estatístico One-Way ANOVA ($p < 0.001$). Posteriormente, pares foram comparados pelo teste t de Student, *** = $p < 0.001$, ns = não significativo. 24hpf = 24 horas pós-fertilização, 72hpf = 72 horas pós-fertilização. **(E)** Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real do gene *prop1* indica expressão semelhante dos animais *wild type* quando comparado aos animais homozigotos em 24hpf e em 72hpf. FONTE: (Bisegatto, 2019).

2. Justificativa

A hipófise é uma glândula que produz e secreta hormônios responsáveis pelo metabolismo, crescimento e reprodução. Sabe-se que o gene *Prop1* é importante para a produção e secreção hormonal, e variantes alélicas patogênicas no gene *PROP1/Prop1* em humanos e camundongos comprometem seu crescimento e reprodução.

O Zebrafish gerado como modelo animal para estudo do hipopituitarismo através da técnica de CRISPR/Cas9 carrega a inserção de 32 pb levando a alteração na fase de leitura e inserção de um códon de parada no éxon 2. Esse animal apresenta alterações na expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário da hipófise e alterações no crescimento em fases iniciais, que são restaurados ainda na fase larval e permanecem na vida adulta.

3.Objetivos

Objetivo primário

- Caracterização fenotípica do modelo animal portador de variante alélica patogênica no gene *prop1* na fase adulta.

Objetivos secundários

- Caracterizar o nocaute do gene *prop1* a nível proteico por meio da técnica de Western Blot.
- Avaliar a expressão dos transcritos hipofisários do animal portador de variante alélica patogênica no gene *prop1* na fase adulta.

4. Material e Métodos

4.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e está registrado com o código 1548/2021.

4.2 Descrição da linhagem

Foram utilizados zebrafish (*Danio rerio*) da linhagem AB/Oregon University.

4.3 Manutenção do zebrafish

Todos os animais foram mantidos em aquários de 3,5 litros (*Tecniplast*), com uma distribuição de 5 animais adultos por litro. Os aquários foram mantidos sob condições climáticas controladas, pH ~ 7,5; condutividade de 500 a 700 μ s; com temperatura da sala de até 29°C. O fotoperíodo foi de 14 horas de luz. Os animais, mantidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP, foram alimentados de duas a três vezes ao dia, com ração comercial Gemma micro de tamanho adequado ao seu estágio de desenvolvimento (*Skretting a nutreco company*®). Larvas de 5 a 17 dpf foram alimentadas com ração granulada de 75 micras, larvas de 18 a 30 dpf foram alimentadas com ração granulada de 150 micras e fase juvenil e adulta com ração granulada de 300 micras.

4.4 Reprodução do zebrafish

Mantendo a proporção de 1 fêmea para 2 machos, os animais foram separados e colocados no aquário específico de fertilização na noite anterior.



Figura 9: Modelo de aquário para acasalamento: *sex on the beach*. Fotos: Fernandes, BHV.

Na manhã seguinte, após a retirada da divisória e a dança do acasalamento, os ovos foram recolhidos do fundo do aquário. Os ovos viáveis foram separados e armazenados em placas de Petri (90x15 mm, n=50 embriões/placas) com meio embriônico e mantidos em estufa à 28°C até o 5 dia pós-fertilização (dpf).

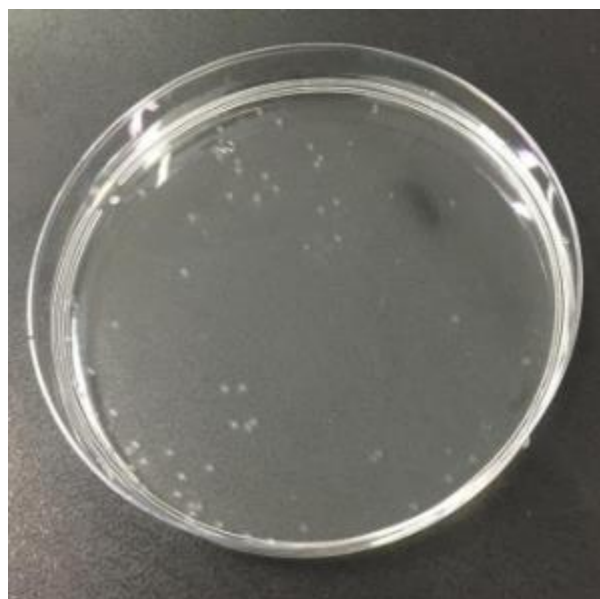


Figura 10: Placa de petri com embriões desovados. Coleta feita no período matutino.

Durante o período de cinco dias foi necessário limpar manualmente a placa de uma a duas vezes por dia, para retirar os embriões e larvas mortas e trocar o meio embriônico. No sexto dia as larvas saudáveis foram transferidas para o aquário e começaram a ser alimentadas com ração especial para larvas.

4.5 Análise da Expressão Proteica

A presença da proteína Prop1 nas amostras de animais homozigotos foi avaliada por meio da técnica de Western Blot.

Pools de 30 embriões foram coletados em 24hpf e 72hpf, e foram armazenados a -80°C até a manipulação das amostras. Para a extração, as amostras foram lisadas em 100uL de Buffer RIPA (ThermoFisher Cientific, USA) e inibidor de protease (Sigma, St. Louis, EUA). Cada amostra foi quantificada utilizando o kit *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

Quantidades iguais de proteína (30µg) dissolvidas em tampão de amostra contendo SDS foram aplicadas nos poços de gel de SDS-PAGE 12% (sódio gel de poliacrilamida-dodecilsulfato) e submetidas à eletroforese em cuba para mini-gel (Bio-Rad, Brasil), por 2 horas, com corrente/voltagem de 120V.

Após a eletroforese, as amostras fracionadas no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose *Hybond-ECL* (Amersham-Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra) em equipamento semi-seco a 10V/90 mA por 1 hora. A membrana então foi bloqueada com uma solução de 5% de leite desnatado em PBST (PBS 1X com adição de 0.1% de Tween20 (Invitrogen)), sob agitação, por 4-6 horas em temperatura ambiente ou overnight a 4°C. Após o bloqueio, a membrana foi incubada em solução de 5% de leite desnatado e PBST com o anticorpo primário Anti Prop1 (Proteimax, Brasil) diluído a 1:500 e incubada a 4°C, overnight e em agitação. Foram realizadas três lavagens rápidas com PBS após a incubação, e depois mais três lavagens de 10 minutos com PBST. Então, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-Rabbit conjugado com HRP diluído a uma concentração de 1:5000 em PBST por 2 horas a 4°C. Foram realizadas três lavagens rápidas com PBS 1X e três lavagens de 10 minutos com PBST. O complexo antígeno-anticorpo foi

visualizado por quimioluminescência após adição de substrato da peroxidase conjugada ao anticorpo secundário.

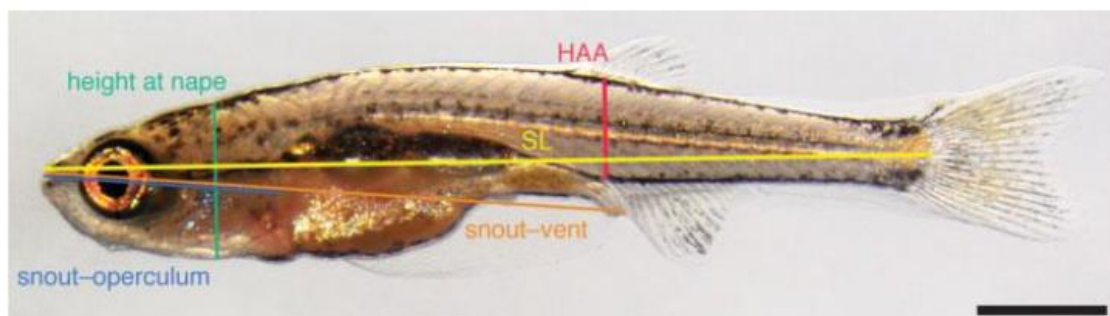
4.6 Análise da fertilidade e fecundidade dos mutantes *prop1* (-/-)

A fertilidade foi testada utilizando machos e fêmeas do genótipo homozigoto em comparação com animais wild type, iniciados a partir da maturação sexual (animais com três meses de vida). Foram contabilizados o total de ovos postos e de ovos fertilizados após a cópula, por 72 horas.

- I. Acasalamento ♀ (-/-) vs. ♂ (-/-) - contabilização de ovos postos, ovos fertilizados e viabilidade dos embriões.
- II. Acasalamento ♀ WT vs. ♂ WT - contabilização de ovos postos, ovos fertilizados e viabilidade dos embriões.

4.7 Caracterização do tamanho na fase adulta

Foi realizada a medição do comprimento padrão (*standard length – SL*), da ponta do focinho até a cauda dos animais homozigotos com uma régua, conforme descrito por Partichy et.al (2009), em animais adultos de 90 dias após fertilização, comparando com os animais wild type. Para isso, os animais foram imersos em solução de Tricaína a 160mg/mL para anestesia e foi anotado o tamanho em cm para posterior análise estatística. Para evitar interferências ambientais, os animais homozigotos e *wild type* foram alimentados de maneira idêntica e mantidos em densidades populacionais iguais, de 5 animais adultos por aquário, para diminuir a competição por alimento.



FONTE: (PARICHY et al., 2009)

Figura 11: Medidas utilizadas para avaliar o crescimento e desenvolvimento no Zebrafish.

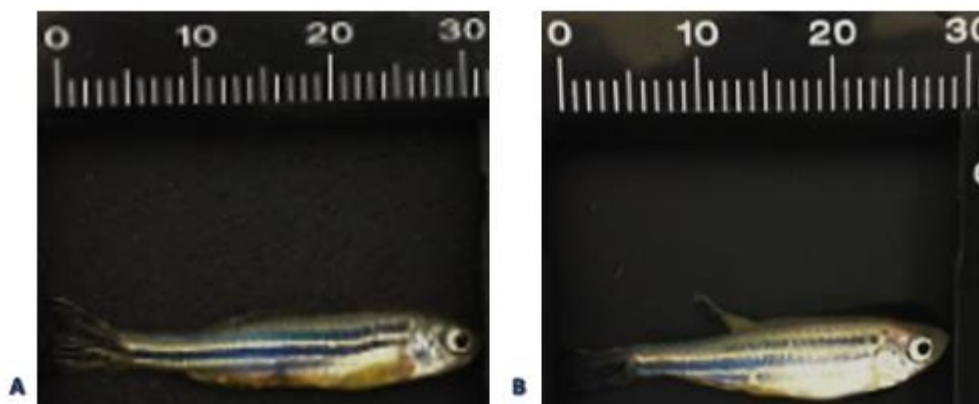


Figura 12: Representação de como foi realizada a medição do comprimento padrão. **(A)** Zebrafish homocigoto **(B)** Zebrafish Wild Type.

4.8 PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

A expressão dos transcritos dos hormônios hipofisários *gh1*, *tshb*, *prl*, *fshb*, *lhb* foram avaliadas na fase adulta (90dpf). Como normalizador, foi utilizado o gene endógeno *ef1a*.

4.8.1 Extração de RNA

Foram feitos pools (n=3) do cérebro e hipófise dos animais adultos (90dpf). As amostras foram coletadas e imediatamente armazenadas em *RNAlater* (TermoFisher Scientific, USA) a -80°C até a sua manipulação.

A extração de RNA foi realizada utilizando o kit AllPrep® DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha).

Primeiramente as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.800 rpm. O RNA later foi retirado completamente e os seguintes passos foram seguidos: Um volume de 350µL de Buffer RLT Plus foi adicionado ao tubo e as amostras foram lisadas com um auxílio de um triturador até que as amostras ficassem bem homogêneas. As amostras foram transferidas para a coluna AllPrep DNA spin (2ml) e centrifugadas por 1 minuto a 14.800 rpm. Um volume

de 350 μ L de etanol 70% gelado foi acrescentado as amostras. O volume total de 700 μ L foi transferido para a coluna RNeasy spin (2ml), centrifugado por 45 segundos a 14.800rpm. A mesma coluna foi utilizada nos três passos a seguir:

- 1- Foi adicionado 700 μ L de Buffer RW1 na coluna RNeasy, centrifugado por 45 segundos a 14.800 rpm e após retirar da centrífuga foi descartado sobrenadante.
- 2- Foi adicionado 500 μ L de Buffer RPE na coluna RNeasy, centrifugado por 45 segundos a 14.800 rpm e após retirar da centrífuga foi descartado o sobrenadante.
- 3- Foi adicionado novamente 500 μ L de Buffer RPE na coluna RNeasy, centrifugado por 45 segundos a 14.800 rpm e após retirar da centrífuga foi descartado o sobrenadante.

A coluna RNeasy foi colocada em um eppendorf de 1.5ml e foi acrescentado 20 μ L de RNase-free water diretamente na coluna da membrana. E centrifugado por 1 minuto a 14.800 rpm para eluir o RNA.

A quantificação do total de RNA obtido na extração foi realizada utilizando espectrofotômetro (*NanoPhotometer P-300, Implen, Alemanha*), com o comprimento de onda de 260nm, e será determinada a pureza das amostras através das relações 260/280 e 260/230, sendo consideradas para transcrição reversa as amostras com relações maiores que 1,8 e 2,0, respectivamente). O RNA extraído foi armazenado no -80°C até a sua manipulação.

4.8.2 Transcrição Reversa

1. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 500 nanogramas de RNA total através do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)*, de acordo com as recomendações do fabricante, descritas a seguir.

2. Foi diluído 500 ng de RNA total, ajustando o volume final para 20 μ L

3. O Mix para a transcrição reversa foi executado de acordo com as orientações do fabricante:

Tabela 1. Protocolo para reação de cDNA.

Reagente	Quantidade para uma amostra (μL)
10x RT Buffer	4 μL
10x RT random primers	4 μL
25x dNTP mix (100nm)	1,6 μL
Multiscribe RT	2 μL
H2O nuclease-free	8,4 μL
Volume Total	20μL

4. 20 μL de 2x RT *master* mix foi pipetado em cada tubo eppendorf juntamente com 20 μL da amostra de RNA. Os tubos foram fechados e foi dado *spin down*.

5. As amostras foram colocadas no termociclador e o programa foi ajustado de acordo com as condições a seguir descritas pelo fabricante:

Tabela 2. Protocolo de programação do termociclador para reação de cDNA

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	25°C	10'
1	37°C	120'
1	85°C	5''
1	4°C	∞

Após o término do procedimento, as amostras foram armazenadas a -20°C até a manipulação.

4.8.3 Primers

As sequências nucleotídicas dos pares de primers que foram utilizados estão descritos na tabela 1. Os primers dos genes *ef1a* (Angotzi et al., 2011), *gh1*, *lshb*, *fshb* e *tshb* (He et al., 2014) foram previamente descritos na literatura.

Tabela 3. Sequências de primers para a RT-qPCR

Gene	Sequência Forward 5'-3'	Sequência Reverse 5'-3'
<i>ef1a</i>	CGTCTGCCACTTCAGGATG	TGTCTCCAGCCACATTACCA
<i>gh1</i>	CCTCTGTCGTTCTGCAACTC	ACTCCCAGGATTCAATGAGG
<i>tshb</i>	CTGTCAACACCACCATCTGC	GTGCATCCCCTCTGAACAAT
<i>fshb</i>	GATGCGTGTGCTTGTCTGG	ACTCGATCCATTGTCCAGCAT
<i>lhb</i>	GCAGAGACACTTACAACAGCC	AAAACCAAGCTCTGAGCAGCC

4.8.4 Mix para PCR em tempo real

Após a reação de transcriptase reversa, os cDNAs obtidos foram utilizados para análise da expressão gênica utilizando o kit SYBR™ Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems, USA*), conforme protocolo descrito pelo fabricante.th

As amostras foram amplificadas em um termociclador AriaMx Real-Time PCR System (*Agilent, USA*) e a expressão dos genes foi normalizada utilizando amostras dos animais selvagens de período correspondente (90dpf) e o gene endógeno *ef1a*.

O Mix para a reação de RT-PCR foi feito de acordo com as instruções do fabricante:

Tabela 4. Protocolo para a reação de RT-PCR

Reagente	Quantidade para uma amostra (µL)
Sybr® Green	10µL
Primer Forward	0,4 µL
Primer Reverse	0,4 µL
H2O nuclease-free	7,2 µL
Volume Total	18µL

Tabela 5. Protocolo de programação do equipamento Aria Mx

Temperatura	Tempo
95°C	10'
95°C	15''
60°C	1'

A quantificação relativa foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ de Livak e Schmittgen (2001), em que o ΔCT representa a diferença de expressão entre o gene-alvo e o endógeno da mesma amostra e o $\Delta\Delta CT$ corresponde a diferença entre o ΔCT da amostra mutante e o ΔCT do calibrador selvagem do mesmo sexo e período. Os valores da expressão gênica representam o número de vezes em que o gene-alvo está expresso em relação ao calibrador utilizado. Cada amostra foi reproduzida em triplicata. (Livak KJ; Schmittgen TD,2001)

4.8.5. Análise estatística

Todos os valores submetidos à análise estatística foram obtidos de múltiplos ensaios independentes e em triplicatas biológicas (n=9). Os valores foram submetidos a ANOVA e ao teste-*t* de Student, utilizando o software "GraphPad Prism" versão 9.1.0. As análises foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

5. Resultados

5.1 Avaliação da fertilidade restaurada espontaneamente

Foi avaliada a fertilidade dos animais (-/-) em comparação com o grupo controle, contando o número de ovos postos por 15 acasalamentos seguidos.

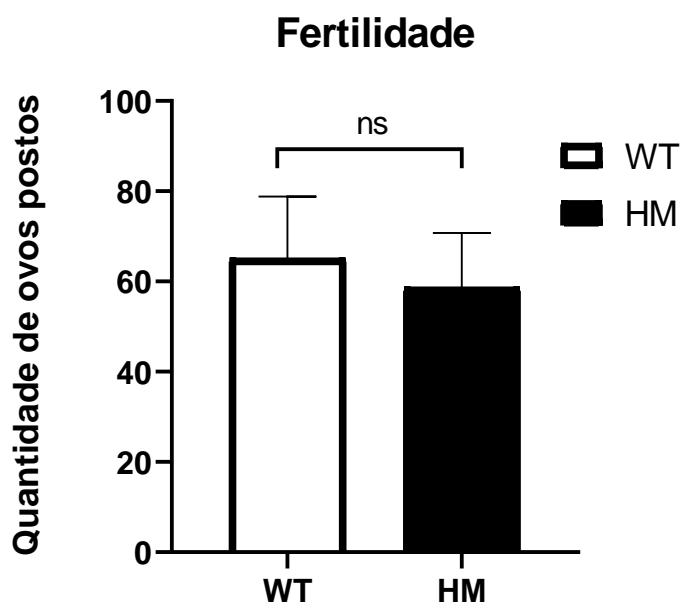


Figura 13: A contabilização dos ovos postos evidenciou um p sem significância estatística (ns), mostrando que os animais homozigotos têm uma taxa de reprodução similar a dos animais wild type. Teste t não pareado $p < 0.05$. ns= não significativo, 90 dpf= 90 dias pós fertilização.

5.2 Avaliação do comprimento corporal

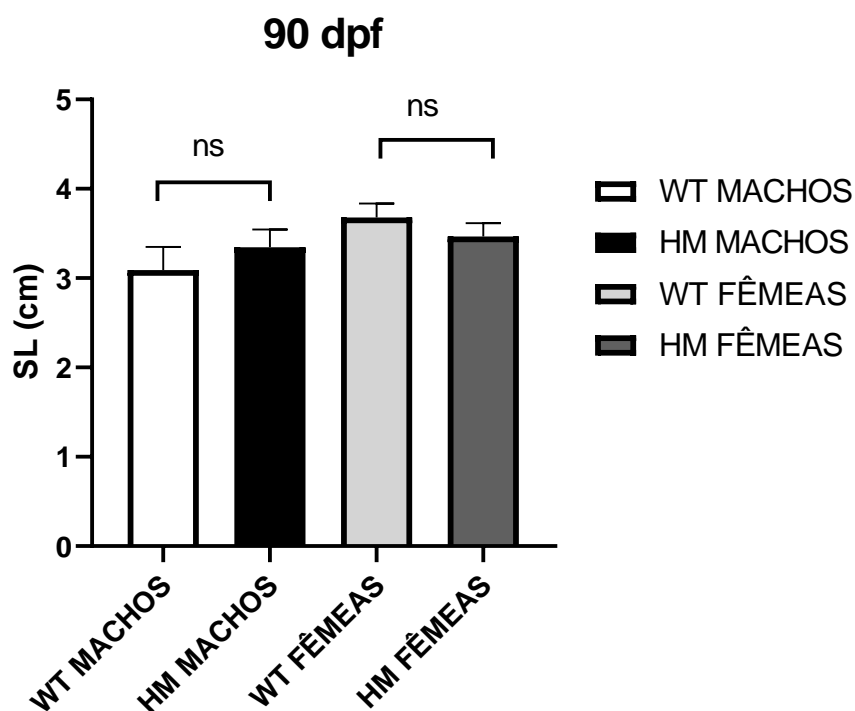


Figura 14: Análise do comprimento em *standard length* (SL) revela que os animais homozigotos não apresentam diferença de comprimento em relação aos animais *wild type* na fase adulta. Os pares foram comparados pelo teste t de Student $p < 0.05$. ns= não significativo, 90 dpf= 90 dias pós fertilização.

5.3 Análise proteica

Inicialmente, a análise protéica por western blotting permitiu observar que grupo WT possuía uma banda com PM aproximado de 50 kDa e o grupo HM possuía duas bandas com PM aproximado de 50 kDa (figura 15). Novos testes foram realizados para confirmar esse resultado e obter a ausência da proteína (figura 16).

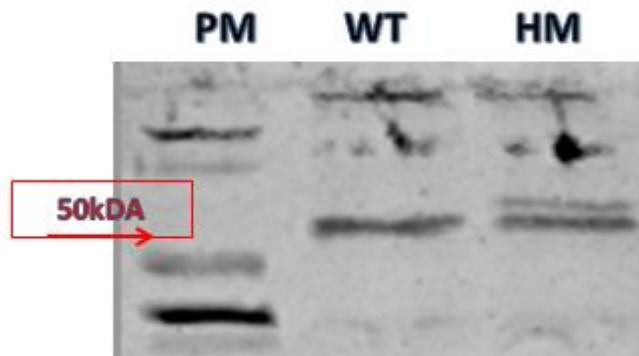


Figura 15: Expressão proteica realizada em núcleo. É possível ver uma banda de PM aproximado de 50kDa no grupo WT, enquanto que é possível ver duas bandas de pM aproximado de 50 kDa no grupo de animais HM.

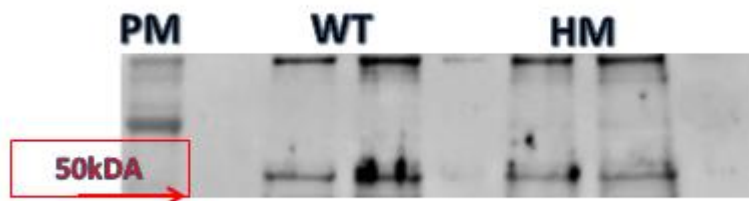


Figura 16: Expressão protéica realizada em núcleo. É possível ver uma banda de PM aproximando de 50kDa no grupo WT e uma banda de PM aproximado de 50 kDa no grupo de animais HM. Experimento realizado após teste de adsorção.

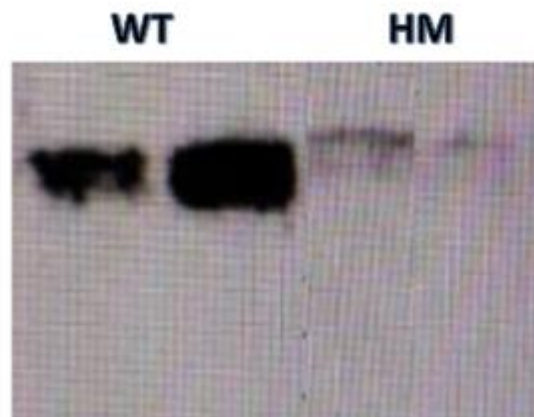


Figura 17: Histona foi utilizada como marcador de núcleos.

5.4 Expressão gênica dos hormônios hipofisários *lh*, *tsh*, *gh1* e *fsh*

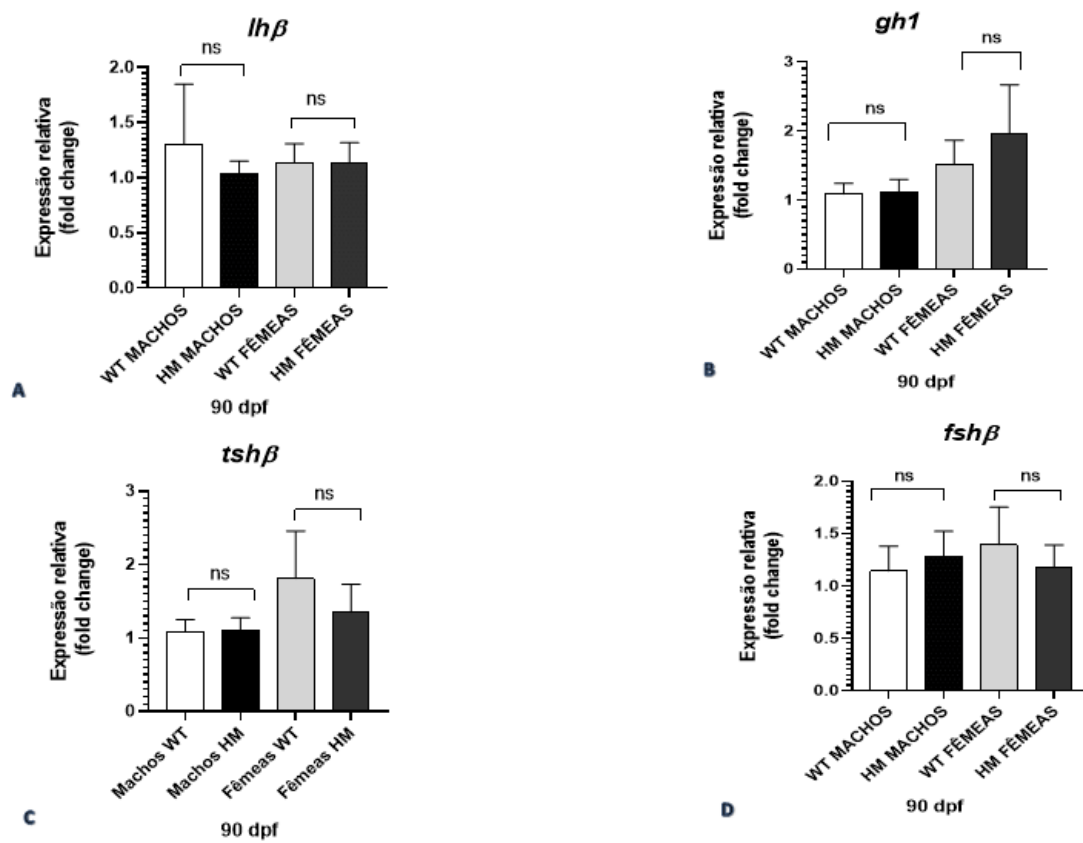


Figura 18: Expressão gênica dos hormônios hipofisários na fase adulta. **(A)** Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real do *lhβ*. **(B)** Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real do *gh1*. **(C)** Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real do *tshβ*. **(D)** Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real do *fshβ*. Foi aplicado o teste ANOVA ($p < 0.05$). Posteriormente, os pares foram comparados pelo teste t de Student. ns= não significativo. 90dpf=dias pós-fertilização.

6. Discussão

O processo de embriogênese hipofisária depende da expressão de diversos fatores de transcrição, que atuam na proliferação, migração e diferenciação das células hipofisárias.

O gene *PROP1* (Prophet of Pit1 paired-liked homeobox 1) codifica a proteína PROP1, um fator de transcrição da família *homeodomain* e o PROP1 também promove a expressão do gene POU1F1 (Pit1) ao se ligar na região promotora desse gene. (BANERJEE-BASU, 2001; YOUNGBLOOD et al., 2018).

Estudos feitos em camundongo, mostraram que Pit1 era necessário para a especificação de três subtipos celulares (somatotrofos, lactotrofos e tireotrofos) e que variantes alélicas patogênicas no Pit1 resultavam na ausência de expressão de GH, PRL e TSH e diminuição dessas três populações celulares nas hipófises (LI et al., 1990). A maioria dos humanos com variantes alélicas patogênicas no gene *PROP1* apresentam deficiências hormonais de GH, PRL, TSH e gonadotrofinas, mas também podem apresentar deficiência de cortisol geralmente na fase adulta. (MENDONÇA et.al., 1999).

Em 2011, Angotzi e colaboradores clonaram o gene ortólogo ao *prop1* do zebrafish. Nesse estudo, a autora caracterizou o padrão de expressão do *prop1* nos animais normais, e determinou que a expressão do *prop1* começa a ser detectada a partir de 16 hpf e o gene é expresso de maneira crescente até 36hpf. A partir desse período, a expressão diminui gradativamente, sendo detectada com menor intensidade em 96 hpf (Angotzi et al., 2011).

O presente estudo permitiu a criação de um modelo animal com nocaute no gene *prop1* utilizando morpholinos, oligonucleotídeos que são complementares ao mRNA do gene e, ao se ligarem, impedem a tradução do mesmo. Entretanto, essa variante alélica patogênica não é permanente, sendo eficaz por 72 horas e tornando impossível caracterizar os efeitos das variantes alélicas patogênicas no gene *prop1* a longo prazo no zebrafish. Levando em consideração essas informações, a aluna de mestrado Caroline Caetano, em sua dissertação de mestrado, gerou animais através da técnica de CRISPR/Cas9. Esses animais apresentavam uma inserção de 32 pb no éxon 2 do gene *prop1*, levando a alteração de leitura e um stop códon prematuro no aminoácido 61 da proteína. A presença dessa variante alélica patogênica foi confirmada em todas as proles através do sequenciamento. O éxon 2 apresenta

uma de grande importância no gene por codificar o domínio *homeodomain* da proteína, espera-se que a proteína PROP1 truncada precocemente seja pouco ativa ou até mesmo inativa, por não conter o domínio de atividade.

Na iniciação científica da aluna Débora Bissegatto, os níveis de expressão do gene *prop1* foram analisados, juntamente com os níveis de expressão do *pit1* e *gh1*, por serem genes dependentes da atividade da proteína PROP1. Foi observado que os animais homozigotos apresentavam níveis menores na expressão do *prop1*, em comparação com os animais *wild type*, quando analisados em 24 horas. Em 72hpf, os níveis de expressão do *prop1* em animais homozigotos não apresentaram diferença em relação à expressão nos animais *wild type*. Já sobre a expressão do gene *pit1*, sabemos que ele é dependente da atividade do Prop1, os animais homozigotos apresentaram baixos níveis de expressão em comparação aos animais *wild type*, em ambos os períodos analisados, o que pode ser explicado por uma possível inatividade da proteína PROP1. Nesse estudo também foi feita uma análise do crescimento desses animais. Os animais com variante alélica patogênica apresentaram uma diferença de tamanho em 13 dpf, em comparação com os animais *wild type*, porém, em 20 dpf há um restauro do crescimento e não há diferença significativa entre tamanho desses animais. Isso pode ser causado por uma ausência ou inativação da proteína PROP1 no animal com variante alélica patogênica.

Atualmente pudemos comprovar que os animais homozigotos são naturalmente férteis, pois foi mostrado estatisticamente que não existe diferença significativa entre os grupos homozigotos e *wild type*, diferentemente de humanos e camundongos, fazendo nos postular que possa existir uma via de reparo ativada quando há a variante alélica patogênica no Prop1.

Um ponto a ser considerado é que existe uma duplicação ampla no genoma do zebrafish e todos os genes podem estar funcionais, ou seja, é necessário o nocaute de todos os genes para se obter ausência total da proteína. (Amores et.al.1998; Postlethwait et.al.1998; Gates et.al. 1999). O gene *prop1* pode estar duplicado, o que levaria a confirmação da variante alélica patogênica através do sequenciamento, o fenótipo nos estágios iniciais do desenvolvimento e a recuperação do crescimento e fertilidade.

No presente estudo os níveis de expressão de gh1 nos animais com variante alélica patogênica no gene *prop1* se mostraram menores em comparação aos níveis de expressão dos animais wild type, indicando um atraso na diferenciação celular dos somatotrofos nesses animais. Em 24hpf, não se detectou expressão de gh1 nos animais wild type e homozigotos, pois a diferenciação celular dos somatotrofos se inicia a partir de 42hpf (HERZOG et al., 2003). Esses achados também corroboram com a hipótese da inativação da proteína Prop1 e falha na ativação da expressão do gene pit1.

O experimento de western blotting mostrou que há proteína residual nos pools de animais de homozigotos e os ensaios foram repetidos três vezes, porém, a proteína ainda aparece mesmo que de forma menor em comparação com os animais *wild type*. O fato da proteína aparecer no western blotting não quer dizer que ela seja funcional, visto que os animais apresentam um fenótipo diferente nos estágios iniciais da vida.

Segundo Smits et.al, embora a eficiência da variante alélica patogênica realizada por Crispr/Cas9 seja confirmada pelo sequenciamento de DNA, ainda não há uma compreensão sistemática da eficiência da eliminação de proteínas. Em um estudo realizado em 2019, onde realizaram 193 deleções visando 136 genes distintos com frameshift induzidos por Crispr/Cas9 em células HAP1, observaram proteína residual para cerca de um terço dos alvos e identificaram alguns mecanismos que podem estar associados a esse fenômeno, o que levaria a implicar que a caracterização sistemática da expressão ou função de proteínas residuais em nocautes gerados através de Crispr/Cas9 é necessária para a interpretação do fenótipo apresentado.

Nesse estudo são citados dois mecanismos causais: 1- Exon skipping, que pode levar a isoformas de proteínas com deleções de sequências internas e reinício de tradução, o que leva proteínas alvo truncadas parcialmente funcionais (Smits et.al.,2019). 2- Nonsense mediated decay é uma via de vigilância celular que tem como principal função reduzir erros na expressão gênica que contém stop códons prematuros, porém, de acordo com Teran et.al (2021) existem proteínas truncadas que escapam a esse mecanismo. Lindeboom et.al mostrou que existem regras que podem ser utilizadas como justificativa para tais eventos, como por exemplo não estar perto do início de um

gene (dentro de 150nt), em um éxon longo (mais de 450 nt) ou após 50-55 nucleotídeos antes da última junção de éxon. Se a variante alélica patogênica estiver dentro dessas regras provavelmente ela irá escapar do mecanismo de nonsense mediated decay (Lindeboom et.al.,2016).

Até o presente momento, podemos concluir que o animal com nocaute no gene *prop1* gerado por edição genômica apresenta um fenótipo no início do desenvolvimento larval, com possível recuperação do fenótipo, já que os transcritos dos hormônios hipofisários lh, tsh, gh1 e tsh não apresentam diferença estatística significativa e esses aspectos precisam ser melhor caracterizados e esclarecidos em experimentos adicionais.

7. Conclusão

Concluimos que os animais com variante alélica patogênica no gene *prop1* apresentam proteína residual, visualizada nos testes de western blotting. Eles o crescem semelhante ao selvagem e se reproduzem espontaneamente. A expressão gênica dos hormônios hipofisários gh, lh, fsh e tsh são semelhantes ao selvagem na vida adulta.

Portanto, podemos concluir que o zebrafish portador de variante alélica patogênica no gene *prop1* criado pela técnica de CRISPR/Cas9 possui um restauro espontâneo da fertilidade, tamanho e expressão gênica e mais estudos devem ser realizados a fim de descobrir qual ou quais vias estão presentes nesse mecanismo.

8. Referências

Angotzi AR, Mungpakdee S, Stefansson S, Male R, Chourrout D. Involvement of Prop1 homeobox gene in the early development of fish pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol*. 2011 May 1;171(3):332-40. doi: 10.1016/j.ygcen.2011.02.026. Epub 2011 Mar 21. PMID: 21362424.

Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, Fritz A., et al. Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science*. 1998 Nov 27;282(5394):1711-4. doi: 10.1126/science.282.5394.1711. PMID: 9831563.

Banerjee-Basu S, Baxevanis AD. Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors. *Nucleic Acids Res*. 2001 Aug 1;29(15):3258-69. doi: 10.1093/nar/29.15.3258. PMID: 11470884; PMCID: PMC55828.

Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E., et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res*. 2000 Sep;10(9):1351-8. doi: 10.1101/gr.144700. PMID: 10984453; PMCID: PMC310919.

Barrett EJ. Organization of endocrine control. In: Boron WF, Boulpaep EL, eds. *Medical Physiology*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2017:chap 47.

Böttner A, Keller E, Kratzsch J, Stobbe H, Weigel JF, Keller A., et al. PROP1 mutations cause progressive deterioration of anterior pituitary function including adrenal insufficiency: a longitudinal analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Oct;89(10):5256-65. doi: 10.1210/jc.2004-0661. PMID: 15472232.

Chrousos GP. Organization and Integration of the Endocrine System. *Sleep Med Clin*. 2007 Jun;2(2):125-145. doi: 10.1016/j.jsmc.2007.04.004. PMID: 18516219; PMCID: PMC2128294.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T., et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797. Epub 2009 Feb 26. PMID: 19246619.

Dattani MT, Robinson IC. The molecular basis for developmental disorders of the pituitary gland in man. *Clin Genet*. 2000 May;57(5):337-46. doi: 10.1034/j.1399-0004.2000.570503.x. PMID: 10852367.

Davis SW, Mortensen AH, Camper SA. Birthdating studies reshape models for pituitary gland cell specification. *Dev Biol.* 2011 Apr 15;352(2):215-27. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.01.010. Epub 2011 Jan 22. PMID: 21262217; PMCID: PMC3066562.

Davis SW, Keisler JL, Pérez-Millán MI, Schade V, Camper SA. All Hormone-Producing Cell Types of the Pituitary Intermediate and Anterior Lobes Derive From Prop1-Expressing Progenitors. *Endocrinology.* 2016 Apr;157(4):1385-96. doi: 10.1210/en.2015-1862. Epub 2016 Jan 26. PMID: 26812162; PMCID: PMC4816735.

Duquesnoy P, Roy A, Dastot F, Ghali I, Teinturier C, Netchine I, et.al. Prop-1: cloning, mapping, genomic structure. Mutations in familial combined pituitary hormone deficiency. *FEBS Lett.* 1998 Oct 23;437(3):216-20. doi: 10.1016/s0014-5793(98)01234-4. PMID: 9824293.

He W, Dai X, Chen X, He J, Yin Z. Zebrafish pituitary gene expression before and after sexual maturation. *J Endocrinol.* 2014 Jun;221(3):429-40. doi: 10.1530/JOE-13-0488. Epub 2014 Apr 7. PMID: 24709578.

Herzog W, Zeng X, Lele Z, Sonntag C, Ting JW, Chang CY., et. al. Adenohypophysis formation in the zebrafish and its dependence on sonic hedgehog. *Dev Biol.* 2003 Feb 1;254(1):36-49. doi: 10.1016/s0012-1606(02)00124-0. PMID: 12606280.

Himes AD, Raetzman LT. Premature differentiation and aberrant movement of pituitary cells lacking both Hes1 and Prop1. *Dev Biol.* 2009 Jan 1;325(1):151-61. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.10.010. Epub 2008 Nov 1. PMID: 18996108; PMCID: PMC2642967.

Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M., et. al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* 2013 Apr 25;496(7446):498-503. doi: 10.1038/nature12111. Epub 2013 Apr 17. Erratum in: *Nature.* 2014 Jan 9;505(7482):248. Cooper, James [corrected to Cooper, James D]; Elliott, David [corrected to Elliot, David]; Mortimer, Beverly [corrected to Mortimore, Beverley]; Begum, Sharmin [added]; Lloyd, Christine

[added]; Lanz, Christa [added]; Raddatz, Günter [added]; Schuster, Ste. PMID: 23594743; PMCID: PMC3703927.

Jao LE, Wente SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Aug 20;110(34):13904-9. doi: 10.1073/pnas.1308335110. Epub 2013 Aug 5. PMID: 23918387; PMCID: PMC3752207.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829. Epub 2012 Jun 28. PMID: 22745249; PMCID: PMC6286148.

Kari G, Rodeck U, Dicker AP. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 Jul;82(1):70-80. doi: 10.1038/sj.clpt.6100223. Epub 2007 May 9. PMID: 17495877.

Kimmel CB. Genetics and early development of zebrafish. *Trends Genet*. 1989 Aug;5(8):283-8. doi: 10.1016/0168-9525(89)90103-0. PMID: 2686119.

Kimmel CB, Warga RM. Cell lineage and developmental potential of cells in the zebrafish embryo. *Trends Genet*. 1988 Mar;4(3):68-74. doi: 10.1016/0168-9525(88)90043-1. PMID: 3076294.

Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM., et. al. The T/eBP null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev*. 1996 Jan 1;10(1):60-9. doi: 10.1101/gad.10.1.60. PMID: 8557195.

Lazzaro D, Price M, de Felice M, Di Lauro R. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development*. 1991 Dec;113(4):1093-104. doi: 10.1242/dev.113.4.1093. PMID: 1811929.

Li S, Crenshaw EB 3rd, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the

POU-domain gene pit-1. *Nature*. 1990 Oct 11;347(6293):528-33. doi: 10.1038/347528a0. PMID: 1977085.

Lieschke, G., Currie, P. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8, 353–367 (2007). <https://doi.org/10.1038/nrg2091>

Lindeboom RG, Supek F, Lehner B. The rules and impact of nonsense-mediated mRNA decay in human cancers. *Nat Genet*. 2016 Oct;48(10):1112-8. doi: 10.1038/ng.3664. Epub 2016 Sep 12. PMID: 27618451; PMCID: PMC5045715.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.

Löhr H, Hammerschmidt M. Zebrafish in endocrine systems: recent advances and implications for human disease. *Annu Rev Physiol*. 2011;73:183-211. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142320. PMID: 21314433.

Madeira JL, Nishi MY, Nakaguma M, Benedetti AF, Biscotto IP, Fernandes T., et al. Molecular analysis of brazilian patients with combined pituitary hormone deficiency and orthotopic posterior pituitary lobe reveals eight different PROP1 alterations with three novel mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2017 Dec;87(6):725-732. doi: 10.1111/cen.13430. Epub 2017 Sep 4. PMID: 28734020.

McMenamin SK, Minchin JE, Gordon TN, Rawls JF, Parichy DM. Dwarfism and increased adiposity in the gh1 mutant zebrafish vizzini. *Endocrinology*. 2013 Apr;154(4):1476-87. doi: 10.1210/en.2012-1734. Epub 2013 Mar 1. PMID: 23456361; PMCID: PMC3602633.

Mendonca BB, Osorio MG, Latronico AC, Estefan V, Lo LS, Arnhold IJ. Longitudinal hormonal and pituitary imaging changes in two females with combined pituitary hormone deficiency due to deletion of A301,G302 in the PROP1 gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Mar;84(3):942-5. doi: 10.1210/jcem.84.3.5537. PMID: 10084575.

Nunes, M.T. (Comp.). Glândula Hipófise. In: AIREs, M.M. Fisiologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. Cap. 66. p. 1019-44.

Parichy, David & Elizondo, Michael & Mills, Margaret & Gordon, Tiffany & Engeszer, Raymond. (2009). Normal Table of Post-Embryonic Zebrafish Development: Staging by Externally Visible Anatomy of the Living Fish. *Developmental dynamics* : an official publication of the American Association of Anatomists. 238. 2975-3015. 10.1002/dvdy.22113.

Pogoda HM, Hammerschmidt M. Molecular genetics of pituitary development in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol.* 2007 Aug;18(4):543-58. doi: 10.1016/j.semcdb.2007.04.004. Epub 2007 Apr 19. PMID: 17560816.

Procter AM, Phillips JA 3rd, Cooper DN. The molecular genetics of growth hormone deficiency. *Hum Genet.* 1998 Sep;103(3):255-72. doi: 10.1007/s004390050815. PMID: 9799079.

Postlethwait J., Yan Y., Gates M., Horne S., Amores A., Brownlie A., Donovan A., Egan E., Force A., Gong Z., et al. (1998) Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. ***Nat. Genet.*** 18:345–349.

Quentien MH, Barlier A, Franc JL, Pellegrini I, Brue T, Enjalbert A. Pituitary transcription factors: from congenital deficiencies to gene therapy. *J Neuroendocrinol.* 2006 Sep;18(9):633-42. doi: 10.1111/j.1365-2826.2006.01461.x. PMID: 16879162.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jul;9(7):671-5. doi: 10.1038/nmeth.2089. PMID: 22930834; PMCID: PMC5554542.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jul;9(7):671-5. doi: 10.1038/nmeth.2089. PMID: 22930834; PMCID: PMC5554542.

Schoenmakers N, Alatzoglou KS, Chatterjee VK, Dattani MT. Recent advances in central congenital hypothyroidism. *J Endocrinol.* 2015 Dec;227(3):R51-71. doi: 10.1530/JOE-15-0341. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26416826; PMCID: PMC4629398.

Silva, CC. O nr2e1 influencia o comportamento exploratório, mas não é necessário para a diferenciação hormonal hipofisária no zebrafish (*Danio rerio*). 2017. Dissertação (Mestrado em Endocrinologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM., et. al. Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature*. 1996 Nov 28;384(6607):327-33. doi: 10.1038/384327a0. PMID: 8934515.

Sprague J, Clements D, Conlin T, Edwards P, Frazer K, Schaper K., et al. The Zebrafish Information Network (ZFIN): the zebrafish model organism database. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jan 1;31(1):241-3. doi: 10.1093/nar/gkg027. PMID: 12519991; PMCID: PMC165474.

UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8;49(D1):D480-D489. doi: 10.1093/nar/gkaa1100. PMID: 33237286; PMCID: PMC7778908.

Toro S, Wegner J, Muller M, Westerfield M, Varga ZM. Identification of differentially expressed genes in the zebrafish hypothalamic-pituitary axis. *Gene Expr Patterns*. 2009 Apr;9(4):200-8. doi: 10.1016/j.gep.2008.12.007. Epub 2009 Jan 8. PMID: 19166982; PMCID: PMC2804439.

Vesper AH, Raetzman LT, Camper SA. Role of prophet of Pit1 (PROP1) in gonadotrope differentiation and puberty. *Endocrinology*. 2006 Apr;147(4):1654-63. doi: 10.1210/en.2005-1080. Epub 2005 Dec 29. PMID: 16384867.

Youngblood JL, Coleman TF, Davis SW. Regulation of Pituitary Progenitor Differentiation by β -Catenin. *Endocrinology*. 2018 Sep 1;159(9):3287-3305. doi: 10.1210/en.2018-00563. PMID: 30085028.

Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev*. 2007 Jul;87(3):933-63. doi: 10.1152/physrev.00006.2006. PMID: 17615393.

9 . *Anexos*

ANEXO A: Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de animais



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Caracterização fenotípica e investigação molecular do mecanismo de restauro do crescimento e fertilidade em zebrafish (Danio rerio) portador de knockout no gene prop1 gerado pela técnica de edição genômica CRISPR/Cas9**”, registrada com o nº **1548/2021**, sob a responsabilidade de **Luciani Renata Silveira de Carvalho e Ádilla Latielle Abelha de Santana**, apresentada pela Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 18/06/2021

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 20-09-2019 Término: 20-09-2022
Espécie/linhagem/raça	ZEBRAFISH
Nº de animais	20 Danio Rerio – mutante adulto 20 Danio Rerio - WT adulto 15 Danio Rerio - WT embrião (lote com 100 un.) 15 Danio Rerio – mutante embrião (lote com 100 un.)
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 18 de junho de 2021

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais