

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – GENÉTICA E
BIOTECNOLOGIA**

Gustavo Torres de Souza

**PRODUÇÃO DE CÉLULAS MDBK EXPRESSANDO A ENZIMA CAS9 E EDIÇÃO
DO GENE DA BETA-LACTOGLOBULINA PELO SISTEMA CRISPR/CAS9**

**Juiz de Fora
2017**

Gustavo Torres de Souza

**PRODUÇÃO DE CÉLULAS MDBK EXPRESSANDO A ENZIMA CAS9 E EDIÇÃO
DO GENE DA BETA-LACTOGLOBULINA PELO SISTEMA CRISPR/CAS9**

Trabalho a ser apresentado a
banca examinadora como
avaliação para obtenção do
título de Mestre em ciências
biológicas com ênfase em
Genética e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Sérgio de Oliveira Camargo

**Juiz de Fora
2017**

Gustavo Torres de Souza

**PRODUÇÃO DE CÉLULAS MDBK EXPRESSANDO A ENZIMA CAS9 E EDIÇÃO
DO GENE DA BETA-LACTOGLOBULINA PELO SISTEMA CRISPR/CAS9**

Aprovada em:

de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Sérgio de Oliveira Camargo - Orientador
EMBRAPA

Prof. Dr. Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista
UFVJM

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos
UFJF

Dra. Rafaela Chitarra Rodrigues Hell
UFMG (Suplente)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a meus pais por apoiarem as minhas decisões e por terem dado todo o suporte necessário que permitiu esse momento.

Ao professor e grande orientador Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo, por todos os ensinamentos, paciência, ajuda e incentivo durante minha estada no LRA.

Ao Lucas, por estar ao meu lado durante todos os momentos, por mais tumultuados que fossem oferecendo todo o carinho e suporte necessários. E por ter sido com quem tenho aprendido tanto durante esses anos.

A Rafaela, por toda a amizade e por tanto ter me ensinado ao longo de todo o tempo de convívio no laboratório.

Ao professor e amigo Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba, por todos os ensinamentos, paciência, ajuda e incentivo durante todos esses anos, além de ter me permitido a inserção na ciência. Assim como todos os outros professores que de alguma forma iluminaram meu caminho nas ciências.

Aos funcionários e amigos do laboratório por toda ajuda durante o trabalho, pelas risadas e conselhos, sem vocês esse trabalho não teria sido realizado e nem teria a mesma graça.

À minha família e aos meus amigos por me escutarem, darem força e apoio nos meus estudos.

Aos órgãos de fomento, à EMBRAPA Gado de Leite e à Universidade Federal de Juiz de Fora por possibilitarem minha formação em todos os âmbitos.

Aos membros da banca por me proporcionarem mais essa oportunidade de aprendizado.

A Fapemig e CNPq pelo apoio financeiro para a execução das atividades.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

E, finalmente, mas não menos importante, à ciência e aos gigantes sobre cujos ombros me apoio.

RESUMO

O advento sistema CRISPR/Cas9 tornou o processo de edição gênica consideravelmente mais fácil e direto, uma vez que retirou empecilhos técnicos relacionados aos sistemas já disponíveis. Desta forma, foram permitidos diversos avanços no entendimento da função de elementos genômicos, assim como a produção de embriões geneticamente modificados com diversas finalidades. O atual trabalho objetivou a edição gênica no gene da beta-lactoglobulina em células somáticas bovinas objetivando a produção futura de embriões da espécie geneticamente modificados. Considerando-se que a hipersensibilidade a essa proteína responde pela maior parte das alergias ao leite bovino, a produção de animais cujo leite não contenha essa molécula é de grande interesse para a indústria de laticínios. Durante os experimentos, foi possível obter uma linhagem de células bovinas MDBK expressando a enzima Cas9 (MDBK-Cas). Usando células MDBK e as células MDBK-Cas foi possível se obter com sucesso edições gênicas no *locus* beta-lactoglobulina utilizando-se os componentes do sistema CRISPR/Cas9 na forma de mRNA da proteína Cas9 e sgRNAs. Conclui-se que o sistema CRISPR/Cas9 pode ser usado com os sgRNA desenhados neste estudo para editar o gene da beta-lactoglobulina em células MDBK. Assim, células MDBK podem ser utilizadas como alvo o *locus* em estudo. Modelos de estudos para edição do genoma bovino. Em vista da escassa literatura constando de trabalhos em que tenha sido feita a edição gênica em embriões bovinos, os dados gerados por esse trabalho colaborarão para o avanço do estado da arte no que diz respeito a engenharia gênica de bovinos e no conhecimento do funcionamento do sistema CRISPR/Cas9.

Palavras Chave: Edição Gênica; Engenharia Genética; Transgenia animal; AGMs; CRISPR/Cas9; Beta-lactoglobulina; Embriões

ABSTRACT

The advent of the CRISPR / Cas9 system made the process of gene editing considerably easier and more straightforward, since it removed technical impediments related to the systems already available. In this way, several advances were made in the understanding of the function of genomic elements, as well as the production of genetically modified embryos for various purposes. The present work aimed at the genetic editing of the beta-lactoglobulin gene in bovine somatic cells aiming at the future production of genetically modified embryos of the species. Considering that hypersensitivity to this protein accounts for most of the allergies to bovine milk, the production of animals whose milk does not contain this molecule is of great interest to the dairy industry. During the experiments, it was possible to obtain a lineage of bovine MDBK cells expressing the Cas9 enzyme (MDBK-Cas). Using MDBK cells and MDBK-Cas cells it was possible to successfully obtain gene editions at the beta-lactoglobulin locus using the components of the CRISPR / Cas9 system as mRNA of the Cas9 protein and sgRNAs. It is concluded that the CRISPR / Cas9 system can be used with the sgRNAs designed in this study to edit the beta-lactoglobulin gene in MDBK cells. Thus, MDBK cells can be targeted as the locus under study. Models of studies for editing the bovine genome. In view of the scarce literature consisting of studies in which bovine embryos have been genetically engineered, the data generated by this work will contribute to the advancement of the state of the art regarding the genetic engineering of cattle and the knowledge of the functioning of the system CRISPR / Cas9.

Key Words: Gene Editing; genetic engineering; animals; transgenics; GMAs; CRISPR/Cas9; Beta-lactoglobulin; Embryos

LISTA DE ABREVIações

GM - Geneticamente Modificado

DNA - Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Desoxirribonucleic acid*

RNA - Ácido Rribonucleico, do inglês *Ribonucleic acid*

AGM - Animal Geneticamente Modificado

FDA – Controle de Alimentos e Medicamentos, do inglês *Food and Drug Administration*

EG - Edição Gênica ou Edição Genômica

QDF - Quebra em dupla fita

JENH - Junção de extremidades não-homólogas

NDZ - Nucleases Dedos de Zinco

TALEN -Nucleases efetoras semelhantes a fatores de ativação, do inglês *Transcription activator-like effector*

CRISPR/Cas9 - Sistema da nuclease 9 (Cas9) associada a Repetições palindrômicas curtas regularmente interespaçadas do inglês CRISPR/Cas9 - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9*

DZ - Dedo de zinco

CMV - Citomegalovirus

eGFP - Proteína verde fluorescente, do inglês Green fluorescent protein

PCR - Reação da polimerase em cadeia, do inglês Polymerase Chain Reaction

SSCP-PCR - Polimorfismo de conformação de fita única a partir de produto de PCR

E2 - Exon 2

BLG - Beta-lactoglobulina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo das modificações genéticas implementadas em animais de grande porte de interesse pecuário.

Tabela 2: Informações principais sobre as técnicas de edição gênica NDZ; TALENs e CRISPR/Cas9

Tabela 3: Correspondência entre resíduos de aminoácidos 12 e 13 nos motivos TALE e nucleotídeos

Tabela 4: Esquema do funcionamento biológico do sistema CRISPR/Cas9

Tabela 5: Esquema para condução de experimento com o sistema CRISPR/Cas9

Tabela 6: Esquema da otimização da transfecção dos plasmídeos em células MDBK utilizando Fugene HD.

Tabela 7: Quantidade dos componentes do sistema CRISPR/Cas9 utilizados para transfecção de células MDBK e Células MDBK-Cas9

Tabela 8: Soluções preparadas para microinjeção nos embriões

Tabela 9: Desenho dos Primers para as reações de PCR no *locus* analisado do gene da beta-lactoglobulina

Tabela 10: Primers utilizados para a amplificação da sequência codificante da eGFP

Tabela 11: Desenho dos oligonucleotídeos para síntese dos sgRNAs

Tabela 12: Fitas 5'-3' dos produtos de amplificação obtidos com as reações de PCR utilizando os Primers resumidos acima.

Tabela 13: Avaliação visual da fluorescência em células MDBK transfectadas com os vetores px458 e pCas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema das Ferramentas de Edição Gênica

Figura 2: Fluxograma dos principais experimentos realizados

Figura 3: Esquema da transcrição *in vitro* dos sgRNAs E2A, E2B e TATA.

Figura 4: Corridas eletroforéticas em agarose 2% (A) dos produtos de PCR utilizados para transcrição *in vitro* e dos sgRNAs E2A, E2B, TATA em poliacrilamida 6% (B) com ureia 6mol/L.

Figura 5: Alinhamento dos sgRNAs com a sequência do gene da beta-lactoglobulina e elementos do gene (TATA-box e Exon 2)

Figura 6: Imagem representativa (produzida com as células transfectadas com 12µL do mix em proporção 3:1) das células MDBK transfectadas com o vetor px458 visualizadas em microscópio invertido.

Figura 7: Imagem representativa das células HEK293FT transfectadas com o vetor px458 visualizadas em microscópio invertido.

Figura 8: A) Gráfico de dispersão de tamanho por granulosidade de células HEK293FT não transfectadas; A') Gráfico de dispersão de intensidade de fluorescência no canal GFP e PE para células HEK293FT não transfectadas; A'') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal GFP; A''') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal PE; B) Gráfico de dispersão de tamanho por granulosidade de células HEK293FT transfectadas com px458; B') Gráfico de dispersão de intensidade de fluorescência no canal GFP e PE para células HEK293FT transfectadas com px458; B'') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal GFP; B''') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal PE;

C) Gráfico de dispersão de tamanho por granulosidade de células HEK293FT transfectadas com pCas2; C') Gráfico de dispersão de intensidade de fluorescência no canal GFP e PE para células HEK293FT transfectadas com pCas2; C'') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal GFP; C''') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal PE; D) Gráfico de dispersão de tamanho por granulosidade de células MDBK não transfectadas; D') Gráfico de dispersão de intensidade de fluorescência no canal GFP e PE para células MDBK não transfectadas; D'') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal GFP; D''') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal PE; E) Gráfico de dispersão de tamanho por granulosidade de células MDBK transfectadas com px458; E') Gráfico de dispersão de intensidade de fluorescência no canal GFP e PE para células MDBK transfectadas com px458; E'') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal GFP; E''') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal PE; F) Gráfico de dispersão de tamanho por granulosidade de células MDBK transfectadas com pCas2; F') Gráfico de dispersão de intensidade de fluorescência no canal GFP e PE para células MDBK transfectadas com pCas2; F'') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal GFP; F''') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal PE;

Figura 9: A (contra-coloração DAPI-núcleo) e A') Células MDBK transfectadas com mRNA eGFP; B (contra-coloração DAPI-núcleo) e B') Células MDBK transfectadas com mRNA eGFP-Kozak; C (contra-coloração DAPI-núcleo) e C') Células MDBK transfectadas com mRNA eGFP-PoliA; D (contra-coloração DAPI-núcleo) e D') Células MDBK transfectadas com mRNA eGFP-Kozak-PoliA;

Figura 10: A e B) Colônias obtidas a partir de células transfectadas com 1µg do plasmídeo na proporção 3:1; C) Colônia obtida a partir de células transfectadas com 0,5µg do plasmídeo na proporção 6:1; D) Colônia obtida a partir de células transfectadas com 1µg do plasmídeo na proporção 6:1.

Figura 11: A) Corrida eletroforética em agarose 2% do produto gerado em reação de PCR com gDNA controle com o par de primers surv 2, cujo alvo esperado tem 1268bp. Poços 2 e 3: duplicata da reação; B) Corrida eletroforética em agarose 2% do produto gerado em reação de PCR com gDNA controle com o par de primers surv 3 e 4, cujos produtos esperados eram de, respectivamente, 193bp e 176bp. Poços 2 e 3: duplicata da reação com surv 3; poços 4 e 5: duplicata da reação com surv 4.

Figura 12: Corrida eletroforética em agarose 2% dos produtos de amplificação obtidos por PCR com primer Surv2 da gDNA das amostras de R1 a R10, e do gDNA controle (células MDBK não transfectadas).

Figura 13: Corrida eletroforética em gel de agarose 2% dos produtos de amplificação obtidos por PCR com primer Surv2 e tratados posteriormente com o protocolo de detecção de mutação. Foram aplicados nos poços adjacentes as amostras não-tratadas com a enzima Surveyor seguidas das tratadas. As amostras foram denominadas como segue o exemplo: D1: não-tratada; D1': tratada com a enzima.

Figura 14: Corrida eletroforética em gel de agarose 2% para detecção de mutação nas amostras de R1 a R10. Foram aplicados nos poços adjacentes as amostras não-tratadas com a enzima Surveyor seguidas das tratadas. As amostras foram denominadas como segue o exemplo: R1: não-tratada; R1': tratada com a enzima.*As amostras não-tratadas com as enzimas foram diluídas em água, o que alterou o padrão de migração eletroforética.

Figura 15: A) Corrida eletroforética em gel de agarose 2% confirmando a presença

das bandas obtidas pela amplificação em PCR com o primer surv2 para as amostras de R11 a R16, de células MDBK-Cas9; B) Corrida eletroforética em gel de agarose 2% para detecção de mutação nas amostras de R11 a R16. Foram aplicados nos poços adjacentes as amostras não-tratadas com a enzima Surveyor seguidas das tratadas. As amostras foram denominadas como segue o exemplo: R1: não-tratada; R1': tratada com a enzima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Edição Genômica	17
1.1.1 Nucleases dedos de Zinco	20
1.1.2 TALENs	21
1.1.3 O sistema CRISPR/Cas9	23
1.1.3.1 Funcionamento Biológico do Sistema CRISPR/Cas9 em bactérias	24
1.1.3.2 Edição Gênica com o Sistema CRISPR/Cas9	25
1.2 PRODUÇÃO DE EMBRIÕES GENETICAMENTE MODIFICADOS	28
1.2.1 Tecnologias de Produção de Embriões Geneticamente Modificados	28
1.2.2 Interferência na Expressão da Beta-lactoglobulina em leite bovino	30
2.0 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivos Específicos	32
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Desenho de RNAs Guia para o Sistema CRISPR/Cas9	33
3.2 Produção de RNAs guia para o sistema CRISPR/Cas9	34
3.3 Caracterização dos RNAs guia por eletroforese	35
3.4 Cultura de Células MDBK	35
3.5 Transfecção de Células MDBK com Plasmídeos Expressando Cas9	35
3.6. Avaliação da Fluorescência por Citometria de Fluxo de Células Transfectadas	37
3.7 Produção de Células MDBK Expressando Cas9 de Maneira Estável	37
3.8 Transfecção de Células MDBK e Células MDBK-Cas9 com o Sistema CRISPR/Cas9	38
3.9 Cultura de Embriões	41
3.10 Microinjeção de Embriões com os RNAs do Sistema CRISPR/Cas9	42
3.11 Reação da Polimerase em Cadeia para Detecção do Alvo da Edição Gênica	44
3.12 Detecção de Mutações no Alvo de Edição Gênica	45
3.13 Produção de mRNAs da eGFP	45
3.14 Transfecção de mRNAs da eGFP	47
3.15 Avaliação da Fluorescência em Células Transfectadas com mRNA eGFP	47

4.0 RESULTADOS	48
4.1 Produção e Caracterização dos RNAs guia e mRNAs eGFP por eletroforese	48
4.2 Avaliação da fluorescência em células MDBK transfectadas com plasmídeo px458 e pCas	52
4.3 Avaliação da Fluorescência por Citometria de Fluxo de Células Transfectadas com o Plasmídeo px458 e pCas	54
4.4 Avaliação da Fluorescência de Células MDBK Transfectadas com os mRNAs eGFP	57
4.5 Produção de Linhagem de Células Expressando Estavelmente a proteína Cas9	59
4.6 Amplificação do Alvo de Edição Gênica por PCR e Análise de Mutação	60
4.7 Avaliação das Taxas de Clivagem e Blastocisto de Embriões Injetados com RNAs do Sistema CRISPR/Cas9	62
5.0 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

O advento das técnicas de modificação genética em animais ocorreu em 1980 e 1981 com os trabalhos de Gordon e Ruddle, nos quais foram produzidos embriões murinos geneticamente modificados (GMs). Ficou, então, demonstrado que a técnica de microinjeção pronuclear de DNA na fase de pronúcleo permitia a integração estável de construtos de DNA ao genoma (GORDON, J W; RUDDLE, 1981). Na mesma década, essa tecnologia possibilitou a produção de animais geneticamente modificados (AGMs) com deleções e inserções de genes de interesse objetivando a criação de animais modelos para estudos (BEARDMORE, 1997; J. M. ADAMS; et al, 1985). Apesar da baixa eficiência da técnica, sequências adicionadas eram transmitidas para a prole dos animais produzidos como uma herança mendeliana.

Atualmente, a tecnologia da transgenia aplicada a animais tem como o objetivo a produção de organismos que permitam: 1) modelar a patogênese e comportamento de doenças de interesse (HUTCHINSON; MULLER, 2000; PINNAPUREDDY et al., 2015); 2) estudar eventos celulares e moleculares (i.e. regulação gênica; vias biosintéticas) (SCHEENEN et al., 2009); 3) melhorar a produtividade de animais de interesse pecuário (LIEVENS et al., 2015) e detectar alterações ambientais (ALMEIDA et al., 2014); 5) produção de órgãos para transplante em humanos (MOHIUDDIN et al., 2014; REARDON, 2015); 6) produzir proteínas recombinantes de alta qualidade para fins biotecnológicos e medicinais (MOURA et al., 2013; QIAN et al., 2015).

Destacam-se nesse cenário, os animais de produção, uma vez que modificações genética neles são de grande valia tanto no âmbito da pecuária quanto no puramente científico. No que diz respeito ao impacto econômico, diversas características puderam ser alteradas em animais de grande porte de maneira a

aumentar sua produtividade ou diminuir perdas inerentes ao processo de produção, como resumido na Tabela 1 e amplamente revisado por Lievens et al. (LIEVENS et al., 2015).

Tabela 1: Resumo das modificações genéticas implementadas em animais de grande porte de interesse pecuário.

Objetivo da Modificação Genética	Animais Geneticamente Modificados	Gene Inserido/Modificado	Referência
Aumento da Sobrevivência Neonatal	Suínos, Bovinos	Alfa-lactalbumina	(BLECK et al., 1998; TONG et al., 2011; WHEELER; BLECK; DONOVAN, 2001)
Resistência a Doenças	Ovelhas, Galinhas, Bovinos	SP110	(DENNING et al., 2001; LYALL et al., 2011; RICHT et al., 2007; WU et al., 2015)
Aumento da Taxa de Crescimento	Salmão, Suínos	Hormônio do Crescimento	(DEVLIN et al., 2009; FAHRENKRUG et al., 2015; SAUNDERS; FLETCHER; HEW, 1998)
Melhora na Carne	Suínos	Fat-1	(LAI et al., 2006)
Alteração na Composição do Leite	Bovinos	Fat-1	(WU et al., 2012)
Aumento na Produção de Lã	Ovelhas	IGF-1	(DAMAK et al., 1996)
Melhora no Manejo (Descorna Genética)	Bovinos	POLLED	(FAHRENKRUG et al., 2016)

Dentre os animais geneticamente modificados (AGMs) resumidos acima, o salmão publicado sob o nome proprietário *AquaAdvantage*® ganhou grande atenção em 2015, ao ter sido aprovado para alimentação humana. Sendo assim o primeiro AGM a ter tal aval da instituição americana de administração de alimentos e

medicamentos (*FDA, Food and Drug Administration*) (LEDFORD, 2015). Vale ressaltar, que os requerimentos regulatórios para que o animal passasse a ser comercializado como alimento estenderam-se por duas décadas, destacando assim o ainda complexo processo de aprovação da técnica para esse fim (LEDFORD, 2013). Não obstante, o grande apelo econômico da pecuária motiva a melhoria de animais de produção através de técnicas diversas a serem esclarecidas aqui.

Em adição ao interesse do aumento da produção, animais de grande porte também foram vislumbrados como possíveis modelos para doenças humanas. O uso de animais de grande porte para esse fim trás a possibilidade de se estudar disfunções cujos modelos em pequenos animais não são satisfatórios (ROGERS, 2016; WHITELAW et al., 2016).

Em vista da importância das modificações genéticas em animais, torna-se mandatória a melhoria no arsenal biotecnológico utilizado para produzi-los. Nesse âmbito, a emergência da edição genômica e, sobretudo, a diminuição na complexidade do emprego dessas técnicas tem se mostrado de grande valia.

1.1 Edição Genômica

O termo edição gênica ou edição genômica (EG) foi cunhado para especificar as técnicas que permitem que sejam feitas quebras cromossômicas com inserções ou deleções em regiões predeterminadas de genomas selecionados e com relativa precisão. No que diz respeito ao mecanismo básico, as tecnologias de EG a serem aqui especificadas funcionam baseadas no princípio de que deve haver a quebra em dupla fita (QDF) do segmento de DNA seguida do reparo por junções de extremidades não homólogas (JENH) (GAJ , 2013) desencadeado pela própria célula ou induzido

(LAZZERINI-DENCHI, 2016).

O funcionamento dos sistemas de edição gênica está atrelado a dois requisitos básicos: 1) capacidade de reconhecer uma sequência alvo no genoma e 2) poder de clivagem do DNA no sítio reconhecido (CHANDRASEGARAN; CARROLL, 2016). Na prática, a edição gênica requer uma nuclease acoplada a uma macromolécula capaz de reconhecer nucleotídeos, um *domínio ligador de DNA*. Em adição, é indispensável que a parte do sistema que reconhece a sequência seja capaz de ligar-se a um trecho longo o suficiente para ser de ocorrência única em um genoma eucariótico.

Diversos sistemas surgiram com o intuito de permitir a edição gênica e variaram enormemente quanto a capacidade de fazer a clivagem no DNA assim como na especificidade com a qual essa quebra ocorre (CHANDRASEGARAN; CARROLL, 2016). Serão abordados a seguir os aspectos técnicos e biológicos dos sistemas nomeados: Nucleases Dedos de Zinco (NDZs); Nucleases efetoras semelhantes a fatores de ativação (do inglês TALENs - *Transcription activator-like effector nucleases*) e o sistema da nuclease 9 (Cas9) associada a Repetições palindrômicas curtas regularmente interespaçadas (do inglês CRISPR/Cas9 - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9*). As características mais básicas dessas tecnologias estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 2: Informações principais sobre as técnicas de edição gênica NDZ; TALENs e CRISPR/Cas9

Sistema	Nuclease Empregada	Natureza e características do Sistema de Guia	Ano que se tornou disponível	Referência
Nucleases Dedos de Zinco	FokI	Natureza proteica, capaz de reconhecer entre 9 e 18bp por monômero da proteína	1996	KIM, Y G; CHANDRASEGARAN, 1994; KIM; CHA; CHANDRASEGARAN, 1996
Nucleases efetoras semelhantes a fatores de ativação	FokI	Natureza proteica, capaz de reconhecer entre 14 e 20bp por monômero da proteína	2010	CHRISTIAN et al., 2010
CRISPR/Cas	Cas9	Polímero de nucleotídeos, capaz de reconhecer por pareamento 22bp	2012	JINEK et al., 2012

Na figura 1 estão esquematizados os mecanismos de edição gênica das ferramentas a serem discutidas nesse trabalho.

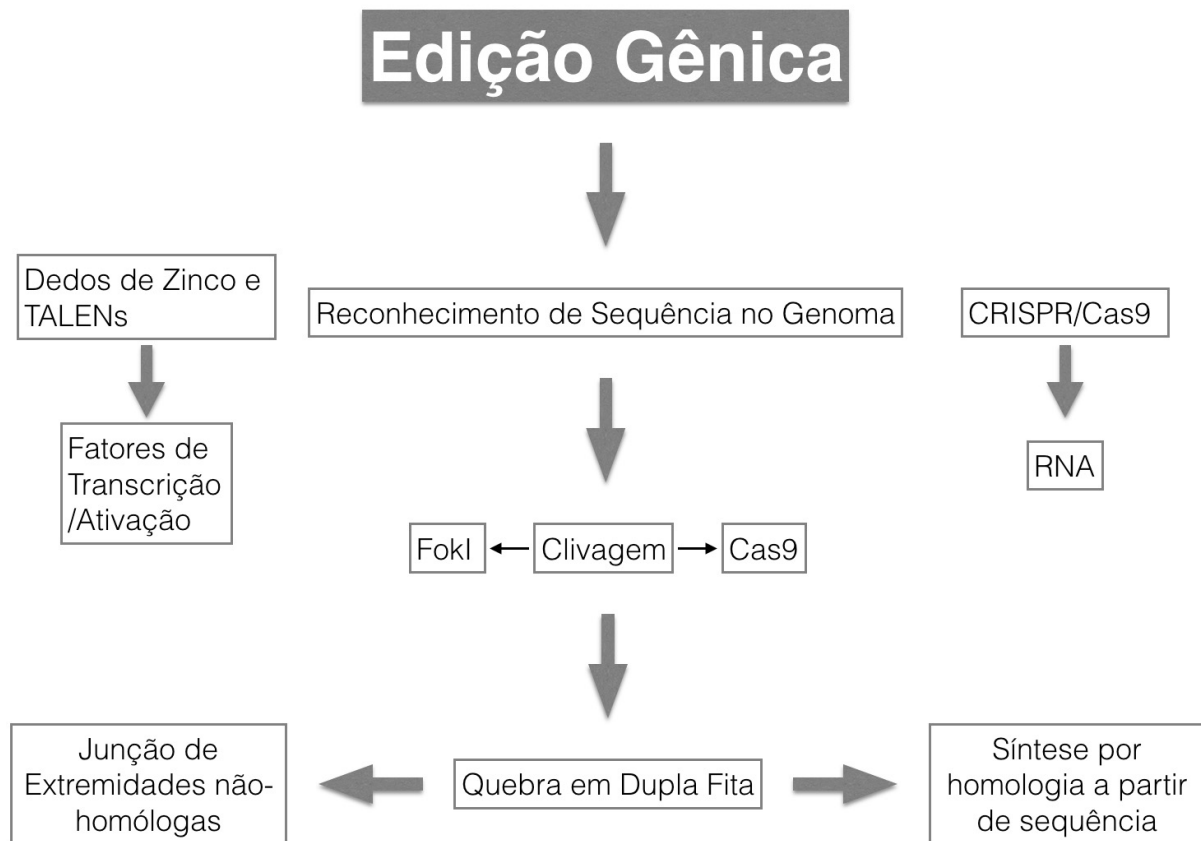


Figura 1: Esquema das Ferramentas de Edição Gênica

A seguir serão resumidos os mecanismos e principais aspectos dos sistemas de edição gênica resumidos acima.

1.1.1 Nucleases Dedos de Zinco

O sistema de NDZ começou a ser entendido a partir dos trabalhos de Klug et al. (1985), quais foram descritos fatores de transcrição de *Xenopus laevis* cujo domínio ligador de DNA possuía um átomo de Zinco em complexo com a estrutura proteica (MILLER; MCLACHLAN; KLUG, 1985). Os domínios contendo zinco descritos são muito prevalentes em eucariotos (CHANDRASEGARAN; CARROLL, 2016), mais tarde, foi obtida a estrutura cristalográfica desses fatores de transcrição em camundongos, permitindo o estudo de sua interação com o DNA (PAVLETICH;

PABO, 1991), sendo descrito em seguida, que, na maioria dos casos, cada dedo de zinco (DZ) interagem com uma sequência específica no DNA. A estrutura descrita possui cerca de 30 resíduos aminoácidos, sendo dois desses pares de histidina e cisteína invariantes. Os resíduos de aminoácidos de cada DZ ligam-se a um átomo de zinco por complexação (PAVLETICH; PABO, 1991). Nos anos seguintes, foram, pois, implementados extensivos trabalhos nos quais DZ interagem com cada triplet de nucleotídeos na sequência de DNA (KLUG, A; CHOO, 1994a, 1994b; LIU; XIA; CASE, 2002; REBAR; PABO, 1994).

Enfim, em 1996, Chandrasegaran e colaboradores, lançaram mão do conhecimento acumulado sobre os DZ e propuseram uma proteína híbrida, na qual era unida a nucleasse FokI com os DZ (KIM; CHA; CHANDRASEGARAN, 1996) dando origem, então, as nucleases dedos de zinco (NDZ). Mais tarde, o mesmo grupo demonstrou que não havia perda de especificidade ou atividade catalítica ao se fazer a fusão entre as proteínas (SMITH; BERG; CHANDRASEGARAN, 1999).

Apesar da complexidade do sistema e relativa inespecificidade, quando comparado aos demais a serem esclarecidos aqui, as NDZ representaram um importante passo para produção de alterações genéticas direcionadas. Desta forma, as NDZ podem ser vistas a primeira ferramenta a permitir um estudo mais profundo e direto da relação genótipo-fenótipo.

1.1.2 TALENs

Assim como para as NDZ, o desenvolvimento das TALENs iniciou-se com o entendimento de proteínas que naturalmente interagem com o DNA na transcrição. As proteínas responsáveis pelo reconhecimento de sequências no genoma, nesse

caso, foram efetores semelhantes a ativadores da transcrição (TALE, do inglês – *Transcription activator-like effector*) (CHRISTIAN et al., 2010). Em 2009, foram estudadas proteínas secretadas naturalmente por bactérias do gênero *Xanthomonas* capazes de se ligar ao genoma do hospedeiro e desencadear transcrição (BOCH et al., 2009; MOSCOU; BOGDANOVE, 2009). A descoberta dos efetores TALEs representou, antes de uma ferramenta de edição gênica, um modo inédito de reconhecimento de sequência de DNA por proteína (MOSCOU; BOGDANOVE, 2009).

Diferentemente dos DZ, cada motivo TALE foi descoberto como capaz de reconhecer um único nucleotídeo com elevada especificidade. Ademais, a presença de motivos vizinhos não interferia na capacidade de ligação ao DNA. Cada domínio TALE possui de 33 a 35 resíduos de aminoácidos bastante conservados. Os resíduos de aminoácidos presentes nas posições 12 e 13 de cada sequência, denominados di-resíduos variáveis da repetição (DVRs), são os responsáveis pela especificidade por cada único nucleotídeo. Estão resumidos na Tabela 3 os DVRs que interagem com cada nucleotídeo (CHRISTIAN et al., 2010).

Tabela 3: Correspondência entre resíduos de aminoácidos 12 e 13 nos motivos TALE e nucleotídeos

Di-resíduos Variáveis	Nucleotídeo
Asparaginina e Isoleucina	A
Histidina e Aspartato	C
Asparaginina e Glicina ou Histidina e Glicina	T
Asparaginina e Asparaginina	G ou A

Com base no conhecimento extensivo gerado durante a produção das NDZs, as TALENs como ferramentas biotecnológicas foram produzidas apenas um ano após a descrição dos TALEs como domínio de interação com DNA (CHRISTIAN et al., 2010). Vetores contendo o gene para as TALENs são desenhados de maneira semelhante aos das NDZs, sendo que os motivos TALE são também fusionados a nucleasse FokI (CHRISTIAN et al., 2010).

Como consequência intuitiva da maneira com que funcionam as TALENs, as sequências necessárias para codificá-las são cerca de 3 vezes maiores do que as das NDZs, uma vez que ao passo que cada DZ reconhece um triplet de DNA, cada TALE reconhece um único nucleotídeo (CHANDRASEGARAN; CARROLL, 2016; GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013). Em comparações feitas após a descrição desse sistema, as TALENs demonstraram-se tão eficazes e específicas quanto as NDZs, entretanto, com menor citotoxicidade (CHANDRASEGARAN; CARROLL, 2016; RAMALINGAM et al., 2013, 2014).

1.1.3 O Sistema CRISPR/Cas9

Em 2012, foi reportado pelo grupo de Doudna e colaboradores o sistema de edição gênica CRISPR/Cas9, no qual, diferentemente dos previamente discutidos, o reconhecimento da sequência alvo é feito baseado no pareamento entre um oligoribonucleotídeo e o DNA do genoma de interesse (JINEK et al., 2012) já previsto por Watson e Crick. Os trabalhos desenvolvidos por Doudna e aqueles que os precederam permitiram uma importante mudança de paradigma da edição genômica, uma vez que a interação RNA-DNA passou a ser o requisito para o direcionamento da QDF. Apesar dos recentes avanços no entendimento das limitações do sistema

CRISPR/Cas9 no que diz respeito às quebras inespecíficas (ZHANG et al., 2015), a ferramenta é vista como de grande interesse, por ter tornado os experimentos desse tipo notavelmente mais simples (CHANDRASEGARAN; CARROLL, 2016; GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013). Mais recentemente, foram feitos avanços em tornar a técnica menos inespecífica através de modificações na nuclease que será apresentada a seguir (KLEINSTIVER et al., 2016).

1.1.3.1 Funcionamento Biológico do sistema CRISPR/Cas9 em bactérias

O sistema composto pela nuclease 9 (Cas9) associada a repetições palindrômicas curtas regularmente interespaçadas (do inglês CRISPR - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*; e Cas9 - CRISPR-associated protein 9) utilizado como ferramenta biotecnológica foi derivado do conhecimento básico obtido sobre a imunidade adaptativa de bactérias (SANDER; JOUNG, 2014).

Os sistemas CRISPR do tipo II são elementos importantes da imunidade adaptativa de bactérias que responde de maneira intracelular a elementos de material genético exógeno, como de plasmídeos e vírus (BARRANGOU et al., 2007). Inicialmente, foi identificado em *Escherichia coli* o primeiro *locus* contendo CRISPR, apesar de ainda não ter sido associado com a função que hoje se explora (ISHINO et al., 1987). No entanto, foi apenas em 2005 que esses *loci* começaram a ser descritos como provenientes de material genético exógeno (BOLOTIN, A; QUINQUIS, B; SOROKIN, A; EHRLICH, 2005; MOJICA et al., 2005; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005). Foram encontradas sequências CRISPR em 84% das archaea e 45% das espécies do domínio *bacteria* (GRISSA; VERGNAUD; POURCEL, 2007).

A partir de então, foi que começou a ser esclarecido o funcionamento biológico

do sistema CRISPR/Cas9 do tipo II na interação entre bactérias e os patógenos com os quais interagem ecologicamente. De maneira geral, o Sistema CRISPR, em bactérias, funciona em três estágios para conferir imunidade a elementos de DNA exógenos conforme esquematizado na Tabela 4 (WANG; LA RUSSA; QI, 2016).

Tabela 4: Esquema do funcionamento biológico do sistema CRISPR/Cas9

Etapa 1 – Aquisição	Etapa 2 – Expressão	Etapa 3 – Reconhecimento e Clivagem do genoma invasor
DNA exógeno é processado e fragmentos, denominados protoespaçadores, são incorporados ao <i>locus</i> CRISPR do hospedeiro. Esses fragmentos ficam como espaçadores entre as repetições de onde são derivados os RNA-CRISPR (crRNA)	Proteínas Cas são expressas de maneira concomitante com a transcrição dos trechos de repetições CRISPR e protoespaçadores. Inicialmente é transcrito um pré-crRNA e, em seguida, esse é clivado e torna-se o crRNA maduro, capaz de associar-se a proteína Cas9	Em uma segunda interação, proteínas Cas9 associadas ao crRNA reconhecem a sequência no genoma invasor e são feitas clivagens, de maneira a proteger a célula hospedeira da infecção

O direcionamento das proteínas Cas para o genoma invasor é dependente de da interação do crRNA por pareamento de bases com o DNA exógeno, entretanto a clivagem depende também de uma interação da nuclease Cas9 com um motivo adjacente ao protoespaçador (PAM – do inglês, Protospacer adjacent motif). A sequência PAM trata-se de um trecho organizado da seguinte maneira NGG (no qual N é qualquer nucleotídeo). Os requisitos para a imunidade protetiva adquirida bacteriana foram explorados de maneira a minimizar os elementos envolvidos de forma que possibilitasse a produção da ferramenta de edição gênica, CRISPR/Cas9.

1.1.3.2 Edição Gênica com o Sistema CRISPR/Cas9

Em 2012, o grupo de Charpentier e Doudna demonstrou a possibilidade de se direcionar a clivagem pela Cas9 em genomas específicos apenas com a utilização da nuclease guiada por um único segmento de RNA, que passou a ser denominado RNA guia (sgRNA) (JINEK et al., 2012). A partir daí foram implementadas diversas melhoras no sistema que conferiram a facilidade de uso a qual é referida atualmente na literatura (WANG; LA RUSSA; QI, 2016). Logo em seguida aos trabalhos de Doudna, vários grupos demonstraram a possibilidade de edição do complexo genoma de células eucarióticas (CHO et al., 2013; CONG et al., 2013; JINEK et al., 2013; MALI et al., 2013).

Assim como nos outros métodos de edição genômica apresentados aqui, a dinâmica da modificação genética feita com o sistema CRISPR/Cas9 baseia-se nos seguintes passos: 1) identificação o *locus* pelo sgRNA, de maneira que é guiada a nuclease Cas9; 2) quebra feita pela enzima; 3) reparo trecho clivado. O reparo que ocorre em células eucarióticas após essa clivagem é do tipo junção de extremidades não-homólogas (JENH), no qual há introdução de erros e, portanto, interferência no transcrito obtido a partir daquela região e, potencialmente, no produto proteico. Alternativamente, o reparo pode ocorrer por homologia, sendo que para fins de edição gênica, é considerado o reparo em homologia a moldes de DNA introduzidos juntamente com o sistema CRISPR/Cas9 nas células (WANG; LA RUSSA; QI, 2016).

Os protocolos para edição utilizando esse sistema variam consideravelmente de acordo com o tipo de célula a ser editada, mas podem ser resumidos conforme esquematizado na Tabela 5 (RAN et al., 2013).

Tabela 5: Esquema para condução de experimento com o sistema CRISPR/Cas9

Passos	Atividade Principal	Comentários
1	Design <i>in silico</i> dos sgRNAs, a partir de bancos de dados de genomas ou partindo-se de sequenciamento utilizando ferramentas para encontrar sequências que possam ser usadas para a clivagem pela Cas9	Nesse passo, os requisitos são: o conhecimento do genoma com o qual se trabalha; e a presença de uma sequência NGG, referente ao PAM no <i>locus</i> onde se deseja fazer a edição.
2	Produção de construtos de DNA contendo o gene para a Cas9 e sequência para sgRNA	É interessante que se tenha no construto de DNA um gene reportador que possa ser utilizado para separação de células efetivamente expressando o construto; Alternativamente, podem ser produzidos <i>in vitro</i> os sgRNAs e mRNA da proteína Cas9, o que é, particularmente, interessante para edição gênica em embriões ou células que não expressem bem os construtos de DNA
3	Transfecção dos construtos de DNA ou co-transfecção de sgRNA e mRNA ou microinjeção desses elementos em embriões	
4	Avaliação da mutação	Atualmente, é utilizada como rotina, a detecção de mutação pelo ensaio restrição por meganucleases em heteroduplexes como maneira de triagem para genomas editados antes do sequenciamento
5	Expansão clonal de células presumivelmente editadas ou transferência de embriões editados	

Como visto acima, a edição gênica com o sistema CRISPR/Cas9 é de relativa facilidade de aplicação, de forma que permite sua utilização para uma grande gama de finalidades, tendo sido de grande importância na determinação de função de diversos elementos genômicos desde seu advento.

A principal diferença entre o sistema CRISPR/Cas9 e seus antecessores, TALENs e

NDZs, é a facilidade na construção de experimentos. Não se deve deixar de considerar o fato de que a capacidade de edição de todos é comparável, conforme relatado em experimentos recentes (HE et al., 2016) e há ainda o problema das modificações fora do alvo a ser endereçado (ZHANG et al., 2015).

1.2 PRODUÇÃO DE EMBRIÕES GENETICAMENTE MODIFICADOS

A produção de embriões geneticamente modificados permanece como uma ferramenta de grande valia para diversas finalidades, desde aplicações importantes para a elucidação de mecanismos biológicos, no âmbito da ciência básica, até a produção de animais geneticamente modificados para pecuária e produção de proteínas recombinantes (LIEVENS et al., 2015).

No presente trabalho será objetivada a produção de animais geneticamente modificados em um *locus* de grande interesse para a indústria de laticínios. Apesar do foco do presente trabalho ser direcionado para animais de produção, os avanços biotecnológicos a serem alcançados ajudaram no entendimento da transgenia animal.

1.2.1 Tecnologias de Produção de Embriões Geneticamente Modificados

A produção atual de embriões geneticamente modificados é realizada atualmente através de: 1) microinjeção de construtos de DNA na fase de pro-núcleo; 2) transdução e integração de construtos de DNA mediada por retro- e lentivírus; 3) edição gênica para deleção ou inserção de sequências; 4) transferência nuclear a partir de células previamente geneticamente modificadas por uma das técnicas citadas. Apesar das consideráveis diferenças conceituais e técnicas entre as

ferramentas apresentadas, invariavelmente, a produção de AGMs ainda esbarra nas baixas taxas de sucesso na produção de embriões GMs e dos animais *per se* (BOUABE; OKKENHAUG, 2013; MELO et al., 2007). Além disso, a implementação de tais técnicas exige um alto custo inicial e operacional e grande habilidade técnica (GAMA SOSA; DE GASPERI; ELDER, 2010; MELO et al., 2007).

Gordon e colaboradores produziram o primeiro AGM mamífero, em 1980, através da microinjeção de vetores no pro-núcleo em embriões murinos, permitindo assim o início do entendimento da transgenia em animais (GORDON et al., 1980). Em seguida, em 1985, a transgenia em camundongos e permitiu o estudo da função do gene do fator liberador de hormônio do crescimento humano (HAMMER et al., 1985).

A grande maioria dos animais transgênicos e AGMs produzidos e já reportados na literatura advém da microinjeção de construtos de DNA e pela transferência nuclear de células cultivadas previamente modificadas geneticamente (KUES; NIEMANN, 2011; MAKSIMENKO et al., 2013). Durante vários anos, essas técnicas permaneceram como as únicas disponíveis para transgenia animal. O advento das NDZ foi encarado como um importante marco para a produção de AGMs (SWARTHOUT; RAISINGHANI; CUI, 2011), entretanto, devido às dificuldades da técnica, na maioria dos casos, os animais permaneceram sendo produzidos pelas técnicas clássicas.

A introdução das TALENs no arsenal biotecnológico também permitiu importante aumento na produção de AGMs (LOTTI et al., 2017). Tendo sido de grande relevância na produção de animais de produção geneticamente modificados (CARLSON et al., 2012, 2016; PROUDFOOT et al., 2015) pelo grupo de Fahrenkrug e colaboradores.

Assim como para as outras aplicações da edição gênica, a transgenia e modificação genética em animais foi enormemente facilitada pelo sistema CRISPR/Cas9, de modo que desde sua disponibilização em 2012, diversos trabalhos já relataram a produção de AGMs (FUJIHARA; IKAWA, 2014; HIROSE et al., 2017; HWANG et al., 2013; IRION; KRAUSS; NUSSLEIN-VOLHARD, 2014; JIN; LI, 2016; NAKAGAWA et al., 2015).

1.2.2 Interferência na Expressão da Beta-lactoglobulina em leite bovino

A beta-lactoglobulina (BLG) é a principal proteína dentre as proteínas do soro do leite bovino (FIOCCHI, A et al. , 2010). Apesar da intrínseca relação evolutiva entre os grupos humanos e o consumo de leite (WARINNER et al., 2015), componentes do leite bovino tem elementos imunogênicos que desencadeiam reação de hipersensibilidade em uma considerável parte da população (FIOCCHI, A et al. , 2010). Os sintomas relacionados com essa alergia são, principalmente, relacionados com o trato gastrointestinal (TGI) além, de sintomas sistêmicos como prurido e dificuldade respiratória característicos da resposta imune gerada (CRITTENDEN; BENNETT, 2005; VANDENPLAS; DE GREEF; DEVREKER, 2014). O quadro causa desconforto e impedindo o consumo de leite por essa parcela da população.

De maneira geral, os epítomos que desencadeiam a reação imune no TGI nesses casos deixam de ser elicitados resposta imune ao serem hidrolisados, de forma que essa foi a maneira, até então, empregada para produção de um leite bovino menos alergênico (BU et al., 2013). Não obstante, o processamento do leite dessa forma leva a alterações em suas características organolépticas, diminuindo a palatabilidade e aceitação pela população alvo (VANDENPLAS; DE GREEF;

DEVREKER, 2014).

Em vista desse panorama, a produção de leite com teor diminuído da beta-lactoglobulina é de grande interesse para a indústria de laticínios.

Em 2012, foi reportada a produção de vacas GM nas quais foi introduzida uma sequência para RNA de interferência expressa constitutivamente que diminuiu consideravelmente a produção de BLG (JABED et al., 2012), sendo, entretanto, necessária a introdução de um transgene. Anteriormente, foram produzidas vacas modificadas para o gene da BLG através do sistema de NDZ por edição gênica em células em cultura, seguida de clonagem (YU et al., 2011).

No âmbito do entendimento da transgenia, o gene para a BLG representa um importante alvo, uma vez que seu produto proteico é facilmente analisado no leite dos animais produzidos.

2.0 OBJETIVOS

Gerar células somáticas bovinas contendo edições gênicas no gene para a proteína Beta-lactoglobulina validando assim as células MDBK como modelo para edição gênica em bovinos.

2.1 Objetivos específicos

- Desenhar e produzir construtos de DNA e segmentos de RNA requeridos para a utilização do sistema CRISPR/Cas9;
- Transfectar células bovinas MDBK com construtos de DNA e segmentos de RNA do sistema CRISPR/Cas9;
- Produzir células MDBK expressando a enzima Cas9;
- Analisar as células MDBK transfectadas por amplificação do *locus*, ensaio de mutação e sequenciamento, para a presença da mutação no gene BLG;

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

Na figura 2 está esquematizado um fluxograma para realização dos principais experimentos a serem descritos.

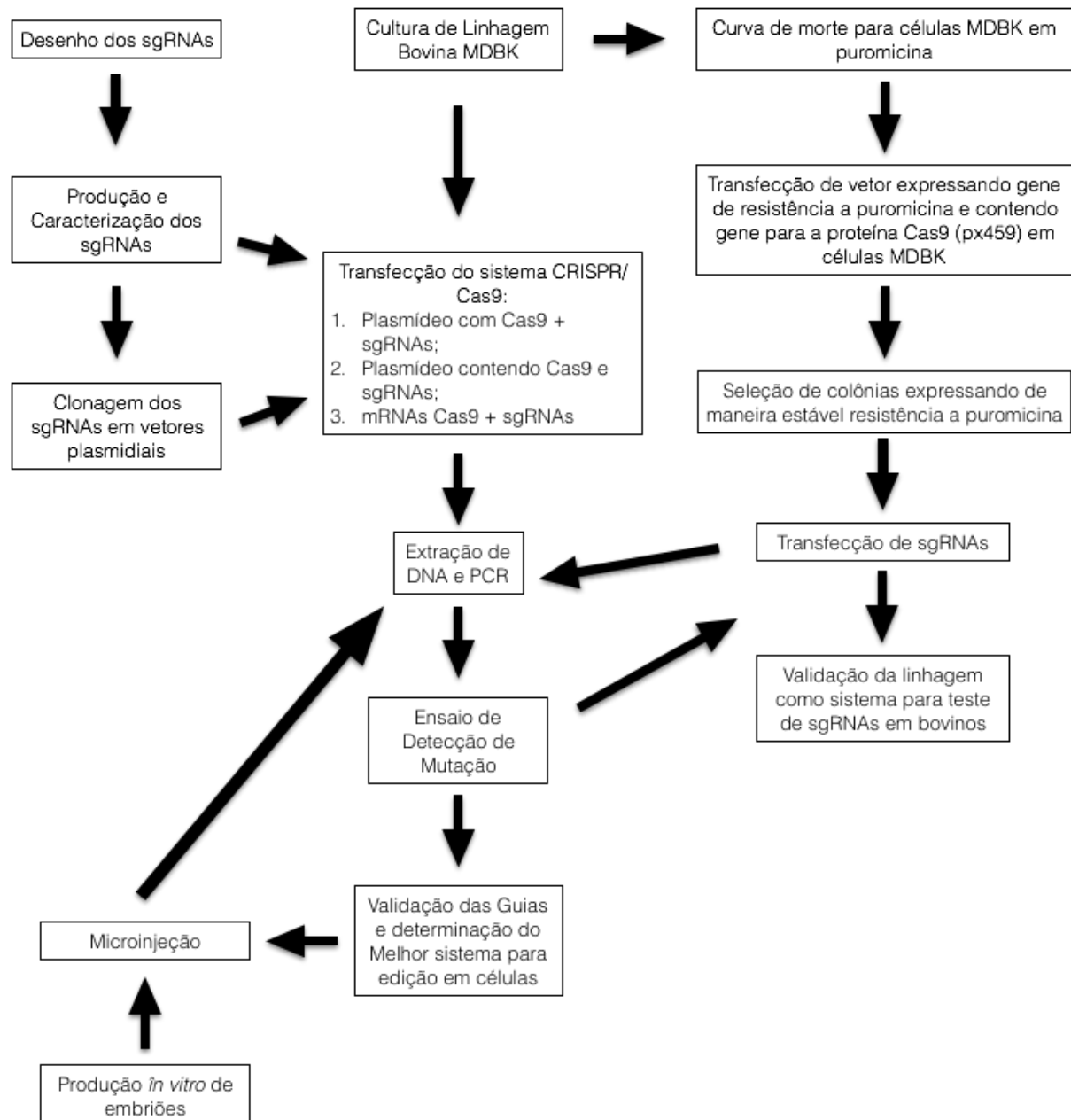


Figura 2: Fluxograma dos principais experimentos realizados

3.1 Desenho de RNAs guias para o sistema CRISPR/Cas9

Os sgRNAs foram desenhados com o auxílio de um algoritmo (Crispr RGEN Tools – disponível em <http://www.rgenome.net/>) para pesquisa de potenciais sítios *off-target* (fora da sequência). A sequência da beta-lactoglobulina utilizada está depositada no NCBI (X14710). Foram escolhidas apenas as sequências com o número mínimo de mismatches tolerados entre cada RNA guia e o DNA alvo, levando-se em consideração a sua posição e distribuição dentro da sequência. Para tanto, foi desenhado um *template* de DNA a ser transcrito *in vitro* para cada um dos sgRNA. Cada molde para sgRNA foi desenhado com 3 partes sequenciais: 1) a sequência do promotor T7 para a síntese *in vitro*; 2) a sequência complementar ao gene da beta-lactoglobulina (sendo uma sequência para o TATA box e outras duas sequências para o exon dois (E2), denominados aqui E2A e E2B); 3) a sequência estrutural necessária para a associação à proteína Cas. Esses fragmentos foram amplificados por PCR e utilizados para a transcrição *in vitro* dos sgRNA.

3.2 Produção de RNAs guias para o sistema CRISPR/Cas9

As sequências necessárias para a produção dos sgRNAs foram sintetizadas em primers, de maneira que as extremidades 3' de cada primer se anelasse e, após a extensão, fosse produzido um molde completo com os três requisitos listados em 3.1. Os primers foram anelados e estendidos por reação da polimerase em cadeia (PCR, do inglês *Polymerase Chain reaction*) de alta fidelidade (Gene Amp High Fidelity PCR System – Applied Biosystems) de acordo com recomendações do fabricante.

Os produtos de PCR foram, então, submetidos a reação de transcrição *in vitro* (Mega Short Script T7 – Ambion) e purificação do RNA obtido pelo método de fenol/clorofórmio e precipitação com álcool isopropílico. Os produtos de PCR foram, antes da reação de transcrição *in vitro* confirmados pelo seu tamanho por corrida em gel de agarose 2%.

3.3 Caracterização dos RNAs guia por Eletroforese

Após purificados, os sgRNAs foram desnaturados em formamida a 95°C por 5 minutos e, em seguida, aplicados em gel de acrilamida 6% (Ambion) na presença de ureia na concentração 6 mol/L para corrida eletroforética.

3.4 Cultura de Células MDBK

Foram utilizadas as células de linhagem estabelecida Madin-Dabin Bovine Kidney (MDBK – ATCC CCL-22) células modelo bovinas derivadas do epitélio renal bovino. As células foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas em incubadora com atmosfera húmida e com pressão de CO₂ de 5%, em plásticos para cultura com meio DMEM, suplementado com 1% aminoácidos não-essenciais, 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino.

3.5 Transfecção de Células MDBK com plasmídeos expressando Cas9

Foi realizada a transfecção de vetores contendo o gene para a proteína Cas9 e o molde para cada um dos sgRNAs, com o intuito de verificar a capacidade de

transfecção de DNA nas células empregadas visando saber a possibilidade de efetuar a edição gênica nesse sistema utilizando os elementos do sistema CRISPR/Cas9 na forma de DNA. Os plasmídeos utilizados para os experimentos foram: 1) pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458, addgene), que possui o gene codificante para a proteína Cas9 controlado pelo mesmo promotor que a proteína verde brilhante (eGFP – do inglês, *green fluorescent protein*), o Cbh; 2) pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459, addgene), que possui o gene para resistência eucariótica a puromicina controlado pelo mesmo promotor que o gene para a Cas9; 3) pCas-E2A; 4) pCas-E2B; 5) pCas-TATA, sendo os três últimos denominados assim por nós, uma vez que foram sintetizados com o kit Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Clontech) com a sequência para cada um dos sgRNAs (E2A; E2B e TATA), de acordo com as recomendações do fabricante. Esses plasmídeos tem a sequência codificante para a proteína Cas9 e da proteína fluorescente vermelha tdTomato

A transfecção das células MDBK foi feita em placas com 96 poços, tendo três placas sido utilizadas em replicatas: as três replicatas foram utilizadas para visualização sob microscópio de fluorescência e duas delas foram utilizadas para leitura em citômetro de fluxo. Ademais, cada tratamento estava em duplicata em cada placa. Foi utilizado, conforme recomendações do fabricante, para transfecção e otimização, o reagente FUGENE HD (Promega). A padronização foi com uma ampla variação de concentrações de proporções entre o reagente de transfecção e os plasmídeos px458 e pCas-E2B de acordo com a tabela 6. A linhagem de células HEK293FT, foi utilizada como controle positivo para atestar a expressão das proteínas reportadoras em células eucarióticas.

Tabela 6: Esquema da otimização da transfecção dos plasmídeos em células MDBK utilizando Fugene HD em placa de 96-poços.

Proporção (Fugene:Plasmídeo)	Coluna / Quantidade de Plasmídeo (µg)				
	2 e 3	4 e 5	6 e 7	8 e 9	10 e 11
A – 1:1	0,02	0,04	0,1	0,2	0,24
B – 2:1	0,02	0,04	0,1	0,2	0,24
C – 3:1	0,02	0,04	0,1	0,2	0,24
D – 3,5:1	0,02	0,04	0,1	0,2	0,24
E – 4:1	0,02	0,04	0,1	0,2	0,24
F – 6:1	0,02	0,04	0,1	0,2	0,24

As células foram visualizadas 48 horas após as transfecções por microscopia de fluorescência ou citometria. Os parâmetros de excitação e emissão do eGFP são 488nm e 509nm; e para a proteína vermelha (dtTomato): 554nm e 581nm.

Todos os plasmídeos foram clonados em linhagens quimicamente competentes de *Escherichia coli* STBL3, que foram, em seguida, selecionadas e crescidas em meio LB de seleção e os construtos de DNA foram extraídos com o Plasmid DNA purification kit Maxi-kit (Qiagen), de acordo com recomendações do fabricante.

3.6 Avaliação de Fluorescência por Citometria de Fluxo de Células Transfectadas

Após 48h das transfecções descritas em 3.5, conforme recomendação do fabricante, o meio das células foi retirado e lavado e foi procedida a desagregação enzimática com Tripsina/EDTA 0,25% (Gibco) e coleta das células em microtubos de 1,5 mL, seguida de centrifugação e lavagem com PBS.

Foi então, procedida a citometria de fluxo em citometro FACSVerse (BD) com parâmetros para leitura de eGFP e PE, de acordo com a proteína sendo analisada.

Foram lidos 10000 eventos para cada tubo.

3.7 Produção de Células MDBK Expressando Cas9 de Maneira Estável

Paralelamente as tentativas de edição gênica utilizando a transfecção de DNA, células MDBK foram submetidas ao protocolo de transfecção para a geração de linhagem estável de maneira que esperávamos que expressassem de maneira constitutiva a proteína Cas9 e servisse como plataforma para teste das transfecções apenas dos sgRNAs. A produção de linhagem MDBK expressando a nuclease Cas9 de maneira estável foi obtida a partir da transfecção de células MDBK com o plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459, addgene), que possui o gene para resistência eucariótica a puromicina controlado pelo mesmo promotor que o gene para a Cas9.

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placa de 24 poços de maneira que pudesse ser realizada a curva de morte para células não transfectadas ao serem expostas a diferentes concentrações de puromicina. As concentrações de puromicina (Sigma) variaram entre 0,5µg/mL a 5µg/mL, tendo sido definida a concentração de 1µg/mL como a mínima necessária para matar todas as células não transfectadas, conforme recomendações do fabricante.

Ainda de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante, as células a serem transfectadas foram plaqueadas em placa de 24 poços e submetidas a transfecção com Fugene HD em duplicata dos seguintes tratamentos por poço: 1) 0,5µg de px459 na proporção de 3:1 com Fugene HD; 2) 1 µg de px459 na proporção de 3:1 com Fugene HD; 3) 0,5µg de px459 na proporção de 6:1 com Fugene HD; 4) 1 µg de px459 na proporção de 6:1 com Fugene HD. Após 48 horas, foi feito o repique

das células transfectadas na proporção de 1 poço para 3 poços de placas de 24 poços, de maneira que as células foram colocadas agora em contato com o meio de seleção na concentração de puromicina determinada na curva de morte, 1 µg/mL. No total, 24 poços foram plaqueados com células repicadas a partir das transfectadas com px459. Em seguida, os poços foram acompanhados para o aparecimento de colônias isoladas resistentes à puromicina, o que indicaria a expressão estável do vetor transfectado. A linhagem isolada a partir desse protocolo foi denominada a partir de então como MDBK-Cas9.

3.8 Transfecção de Células MDBK e Células MDBK-Cas9 com o Sistema CRISPR/Cas9

O sistema de edição CRISPR/Cas9 foi transfectado em células MDBK na forma de: 1) DNA (px458) e sgRNAs; 2) apenas DNA (plasmídeos pCas contendo a sequência codificante para a nuclease Cas9 e para os sgRNAs); 3) apenas RNA (mRNA Cas9 e sgRNAs) de maneira que se pudesse avaliar o melhor meio de entrega do material genético do sistema CRISPR/Cas9 para as células alvo utilizadas. Ao passo que as células MDBK-Cas9 foram transfectadas apenas com os sgRNAs.

Ambas as linhagens foram repicadas para placas de 96 poços e transfectadas utilizando o reagente Lipofectamine MessengerMax (Invitrogen) para as transfecções apenas com RNA, e com reagente FugeneHD (Promega) para as transfecções empregando DNA, de acordo com as recomendações do fabricante. As quantidades de DNA e RNA utilizadas para transfecção de mRNA Cas9 e sgRNAs nas células MDBK e as de sgRNA nas células MDBK-Cas9 estão dispostas na tabela 7.

Tabela 7: Quantidade dos componentes do sistema CRISPR/Cas9 utilizados para transfecção de células MDBK e Células MDBK-Cas9

MDBK – Transfecções Utilizando Plasmídeos		
Nome da Amostra	sgRNA(s) Transfectado(s)	Quantidades dos Componentes por Poço
D1	E2A	px458 100ng; e sgRNA E2A 20ng
D2	E2B	px458 100ng; e sgRNA E2B 20ng
D3	TATA	px458 100ng; e sgRNA TATA 20ng
D4	E2A e TATA	px458 100ng; sgRNA TATA 20ng; e sgRNA E2A 20ng
D5	E2B e TATA	px458 100ng; sgRNA TATA 20ng; e sgRNA E2B 20ng
D6	E2A	pCas1 100ng
D7	E2B	pCas2 100ng
D8	TATA	pCas3 100ng
D9	E2A	px458 200ng; e sgRNA E2A 20ng
D10	E2B	px458 200ng; e sgRNA E2B 20ng
D11	TATA	px458 200ng; e sgRNA TATA 20ng
D12	E2A e TATA	px458 200ng; sgRNA TATA 20ng; e sgRNA E2A 20ng
D13	E2B e TATA	px458 200ng; sgRNA TATA 20ng; e sgRNA E2B 20ng
D14	E2A	pCas1 200ng
D15	E2B	pCas2 200ng
D16	TATA	pCas3 200ng
MDBK – Transfecções Utilizando Apenas RNA		
Nome da Amostra	sgRNA(s) Transfectado(s)	Quantidades dos Componentes por Poço
R1	E2A	mRNA Cas9 100ng; e sgRNA E2A 20ng
R2	E2B	mRNA Cas9 100ng; e sgRNA E2B 20ng
R3	TATA	mRNA Cas9 100ng; e sgRNA TATA 20ng
R4	E2A e TATA	mRNA Cas9 100ng; sgRNA TATA 20ng; e sgRNA E2A 20ng
R5	E2B e TATA	mRNA Cas9 100ng; sgRNA TATA 20ng; e sgRNA E2B 20ng
MDBK-Cas9		
Nome da Amostra	sgRNA(s) Transfectado(s)	Quantidades dos Componentes por Poço
R6	E2A	sgRNA E2A 20ng
R7	E2B	sgRNA E2B 20ng
R8	TATA	sgRNA TATA 20ng
R9	E2A e TATA	sgRNA TATA 20ng; e sgRNA E2A 20ng
R10	E2B e TATA	sgRNA TATA 20ng; e sgRNA E2B 20ng

As células MDBK-Cas9 foram ainda transfectadas em um ensaio adicional com quantidades variadas de sgRNA. Para esse ensaio foram utilizados os sgRNAs em *multiplex*, E2A+TATA e E2B+TATA, nas concentrações 10ng; 40ng; e 80ng de cada guia por poço, sendo essas amostras denominadas, de R11 a R16.

3.9 Cultura de Embriões

Ovários de vacas oriundos de rebanhos de gado de leite da região de Juiz de Fora, foram coletados no matadouro local para a obtenção dos oócitos imaturos. Os ovários foram obtidos logo após o abate e transportados para o laboratório em solução fisiológica, acrescida de penicilina e estreptomicina à temperatura de 35° C para a aspiração de oócitos imaturos e maturação *in vitro*. Foram aspirados folículos visíveis com diâmetro de 2 a 8 mm. Os oócitos foram distribuídos aleatoriamente em poços de placas tipo Nunc com 400 µl de meio Tissue culture medium 199 (TCM 199), suplementado com 2 µg ml⁻¹ de hormônio folículo estimulante (FSH; Pluset, Barcelona, Espanha) e soro de vaca em cio (10%) e mantidos em incubadora com 5% de CO₂, ar atmosférico e 38,5°C, por 24 h.

Após 24 h de MIV, os oócitos foram fecundados *in vitro* com sêmen descongelado de touro da raça Gir. O sêmen utilizado foi testado previamente no laboratório quanto à capacidade de desenvolvimento de embriões de fertilização *in vitro*, de modo que, utilizou-se a mesma partida de sêmen durante todo o experimento. Para a seleção dos espermatozoides foi usado o método do gradiente de Percoll (Nutricell) com as concentrações de 45% e 90% (PARRISH, KROGENAES e SUSKO-PARRISH, 1995).

A FIV foi realizada em gotas de 100 µl de meio Fert-Talp, acrescido de 10 UI ml⁻¹ de heparina. As gotas continham uma concentração espermática de 2,0 x 10⁶ espermatozoides ml⁻¹, e foram cobertas com óleo mineral e mantidas por período aproximado de 22 h em estufa incubadora com 5% de CO₂, umidade de 95%, a 38,5 °C. Após a fecundação, os possíveis zigotos foram transferidos para meio de cultivo embrionário CR2aa suplementado com 10% de soro fetal bovino, e mantidos em incubadora com 5% de CO₂, umidade de 95% a 38,5 °C, por 7 dias.

3.10 Microinjeção de Embriões com os RNAs do sistema CRISPR/Cas9

Inicialmente, foi estabelecido, de acordo com a capacidade instrumental de da agulha para micromanipulação, que seriam injetados entre 15pL e 25pL por embrião.

A partir do estabelecimento do volume da injeção, foram realizados ensaios com dos componentes do sistema de edição gênica. As injeções foram feitas com soluções (mixes) do mRNA da Cas9 (GeneArt CRISPR Nuclease mRNA – Invitrogen) e os sgRNAs ou com o plasmídeo pCas1 ou px458 de acordo com a Tabela 8. Para as injeções utilizando o mRNA da proteína Cas9, foram utilizadas as seguintes concentrações e proporções de acordo com o já encontrado na literatura e indicado pelo fabricante como parâmetro para padronização: 1) Concentração de mRNA Cas9 mantida em 100ng/µL; ou 50ng/µL e variação da concentração dos sgRNAs; 2) Variação da concentração do mRNA Cas9 mantendo-se a proporção em relação dos sgRNAs (SATO et al., 2015; THERMO, [s.d.]).

Tabela 8: Soluções preparadas para microinjeção nos embriões

Soluções preparadas com sgRNA e mRNA Cas9				
Solução	sgRNA TATA (ng/μL)	sgRNA E2A (ng/μL)	sgRNA E2B(ng/μL)	mRNA Cas9 (ng/μl)
1	10	10	-	100
2	10	-	10	100
3	15	15	-	100
4	50	-	50	100
5	50	-	-	100
6	-	-	50	100
7	-	50	-	100
8	25	-	-	50
9	50	-	-	100
10	-	12,5	-	25
11	-	25	-	50
12	-	50	-	100
Soluções preparadas com os Plasmídeos px458 e sgRNAs ou pCas1				
Solução	px458 (ng/μL)	pCas-E2A (ng/μL)	sgRNA (ng/μL)	
13	100	-	100 (TATA)	
14	500	-	250 (E2B)	
15	500	-	250 (E2B) + 250 (TATA)	
16	500	-	250 (TATA)	
17	500	-	250 (E2B)	
18	500	-	250 (E2A)	
19	-	500	-	

Foi analisada a taxa de clivagem e os embriões foram coletados e lisados em seguida conforme protocolo descrito em 3.12 para posterior análise de mutação.

3.11 Reação da Polimerase em Cadeia para Detecção do Alvo de Edição Génica

As amostras coletadas após a FIV e microinjeção nos sétimos dias serão submetidas a lise em solução de 100 mM Tris-HCl, pH 8.3 100 mM KCl, 0.02% gelatin, 0.45% Tween 20; 60ug/ml yeast tRNA, 125 ug/ml Proteinase K. Os embriões foram coletados em 10 μ L de água livre de RNases e DNases e, em seguida, foi adicionado 10 μ L da solução de lise descrita acima. Para as reações de PCR foram utilizados 3 μ L do lisado por reação.

As amostras obtidas a partir da transfecção em células serão submetidas a lise (em tampão de lise com 100mM NaCl; 10mM Tris; 25mM EDTA; 0,5% SDS; 0,2 μ g/ μ L Proteinase K) e purificação pelo método do fenol/clorofórmio.

As reações de PCR foram feitas com a enzima de alta fidelidade Gene Amp High Fidelity PCR System (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante para os seguintes primers descritos na Tabela 9.

Tabela 9: Desenho dos Primers para as reações de PCR no *locus* analisado do gene da beta-lactoglobulina

Nome	Alvo	Primer 5' – 3'	Tamanho do fragmento de amplificação (bp)	Temperatura de Melting predita (°C)
Surv2	TATA e Exon 2	Direto: CCTCGAATGGAAGAAGGC CT Reverso: GAAAGCCCTGGATAAGCA GC	1268	60
Surv3	Apenas TATA	Direto: CGTAGAGGAAGCAACCC CAG Reverso: AAGCAGGAGGCACTTCAT GG	193	60
Surv4	Apenas Exon 2	Direto: GGTGGGACAGAGAGCCC A Reverso: GGCTTCAGCTCCTCCACA TA	176	60

3.12 Detecção de Mutações no Alvo de Edição Gênica

Em conformidade com a literatura, as possíveis mutações em cada amostra foram detectadas preliminarmente através do ensaio de mutação em heteroduplexes com a enzima Surveyor (**Surveyor® Mutation Detection Kit** for Standard Gel Electrophoresis). Em seguida, as amostras foram enviadas para sequenciamento dos produtos de PCR gerados.

3.13 Produção de mRNAs da eGFP

Com o objetivo de avaliar a capacidade de expressão das células em teste sem que fosse necessária a etapa de transcrição pelas células, além da eficiência

dos sistemas de transfecção para essas células, foram produzidos segmentos de mRNA *in vitro* para transfecção e expressão da proteína reportadora. A produção desses transcritos foi feita em 3 etapas: 1) Amplificação por PCR do trecho contendo a sequência codificante para o gene eGFP adicionando o promotor T3 acima do quadro aberto de leitura; 2) Transcrição *in vitro* utilizando o mMESSAGING mMACHINE T3 Transcription Kit (Ambion); 3) Poliadenilação com o Poly(A) Tailing Kit (Ambion).

Afim de investigar a influência da sequência Kozak a 5' do transcrito, foram utilizados dois primers diretos distintos para a produção de dois produtos de PCR utilizado para a etapa de transcrição *in vitro*, de acordo com a tabela 10.

Tabela 10: Primers utilizados para a amplificação da sequência codificante da eGFP

Primer	Elementos Contidos no Produto de Amplificação	Temperatura de Melting predita (°C)	Tamanho do fragmento de amplificação quando amplificado com o Primer Reverso (bp)
eGFP – Direto 1: 5' AATTAACCCTCACTAAAG GGAGAATGGTGAGCAAG GGCGA 3'	Promotor T3	58	849
eGFP – Direto 2: 5' AATTAACCCTCACTAAAG GGAGAGCCACCATGGTG AGCAAG 3'	Promotor T3 e Sequência Kozak	58	855
eGFP – Reverso: 5' AAGCAGCGTATCCACAT AGC 3'	-	58	-

Dessa forma, foram obtidas, ao final do processo de transcrição *in vitro*, 4 sequências de mRNAs, nomeadas como segue: 1) mRNA eGFP; 2) mRNA eGFP-PoliA; 3) mRNA eGFP-Kozak; 4) mRNA eGFP-Kozak-PoliA.

3.14 Transfecção de mRNAs eGFP

Células MDBK em cultivo foram repicadas para placas de 24 poços e transfectadas no dia seguinte conforme as recomendações do fabricante, utilizando o reagente Lipofectamine MessengerMax (Invitrogen). Cada um dos segmentos de RNA descritos em **3.13** foi transfectado em duplicata empregando 0,5µg de cada um dos mRNAs por poço conforme previsto no protocolo disponibilizado pelo fabricante.

3.15 Avaliação da Fluorescência em Células Transfectadas com mRNA eGFP

As células foram visualizadas 24 horas após as transfecções por microscopia de fluorescência. Os parâmetros de excitação e emissão do eGFP são 488nm e 509nm, respectivamente.

4.0 RESULTADOS

4.1 Produção e Caracterização dos RNAs guia por Eletroforese

Foram desenhadas três sequências para oligonucleotídeos complementares a duas sequências no exon 2 da beta-lactoglobulina que foram chamados de E2A (exon 2A) e E2B (exon 2B) e o terceiro oligonucleotídeo complementar a região promotora TATA da beta-lactoglobulina que foi chamado de TATA-box. O exon 2 foi escolhido porque é conservado tanto nas variantes 1 e 2, por processamento alternativo do mRNA, da beta-lactoglobulina o que permite editar ambas. O mesmo oligonucleotídeo antisenso foi utilizado nas três reações, de maneira que anela com todos os outros primers e permite a construção do molde para dos sgRNAs. Os oligonucleotídeos utilizados como primers para as reações de PCR que geraram os moldes para a transcrição *in vitro* dos sgRNA foram resumidos na tabela 11.

Tabela 11: Desenho dos oligonucleotídeos para síntese dos sgRNAs

Primer e sgRNA correspondente	Sequência 5' – 3'
Direto – E2A	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGACTTGGTACTCCTTG GCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
Direto – E2B	GAAAT GGCGGGGACTTGGTACTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAG C
Direto – TATA	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGCTGGCCCTCCTCCTG TATAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
Reverso	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACG GACTAGCTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC

Os oligonucleotídeos foram utilizados em reação de PCR anelando cada um dos primers diretos com o reverso, de maneira que foram gerados três produtos de reação de PCR, respectivamente, E2A, E2B e TATA. São mostrados na tabela 12

apenas as fitas no sentido 5'-3', de maneira a facilitar o entendimento da construção e funcionamento dos sgRNAs.

Tabela 12: Fitas 5'-3' dos produtos de amplificação obtidos com as reações de PCR utilizando os Primers resumidos acima.

Produto	Sequência da Fita 5'-3'	Tamanho do produto de amplificação (bp)
E2A	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGACTTGGTA CTCCTTGGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT	122
E2B	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGCGGGGA CTTGGTACTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA AGTTAAAATAGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA AAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT	122
TATA	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGCTGGCCC TCCTCCTGTATAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA AGTTAAAATAGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA AAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT	122

As reações de transcrição *in vitro* foram, então, realizadas utilizando-se como molde, os produtos de PCR descritos na Tabela 9, de forma que os transcritos produzidos seguem o esquema representado na Figura 3.

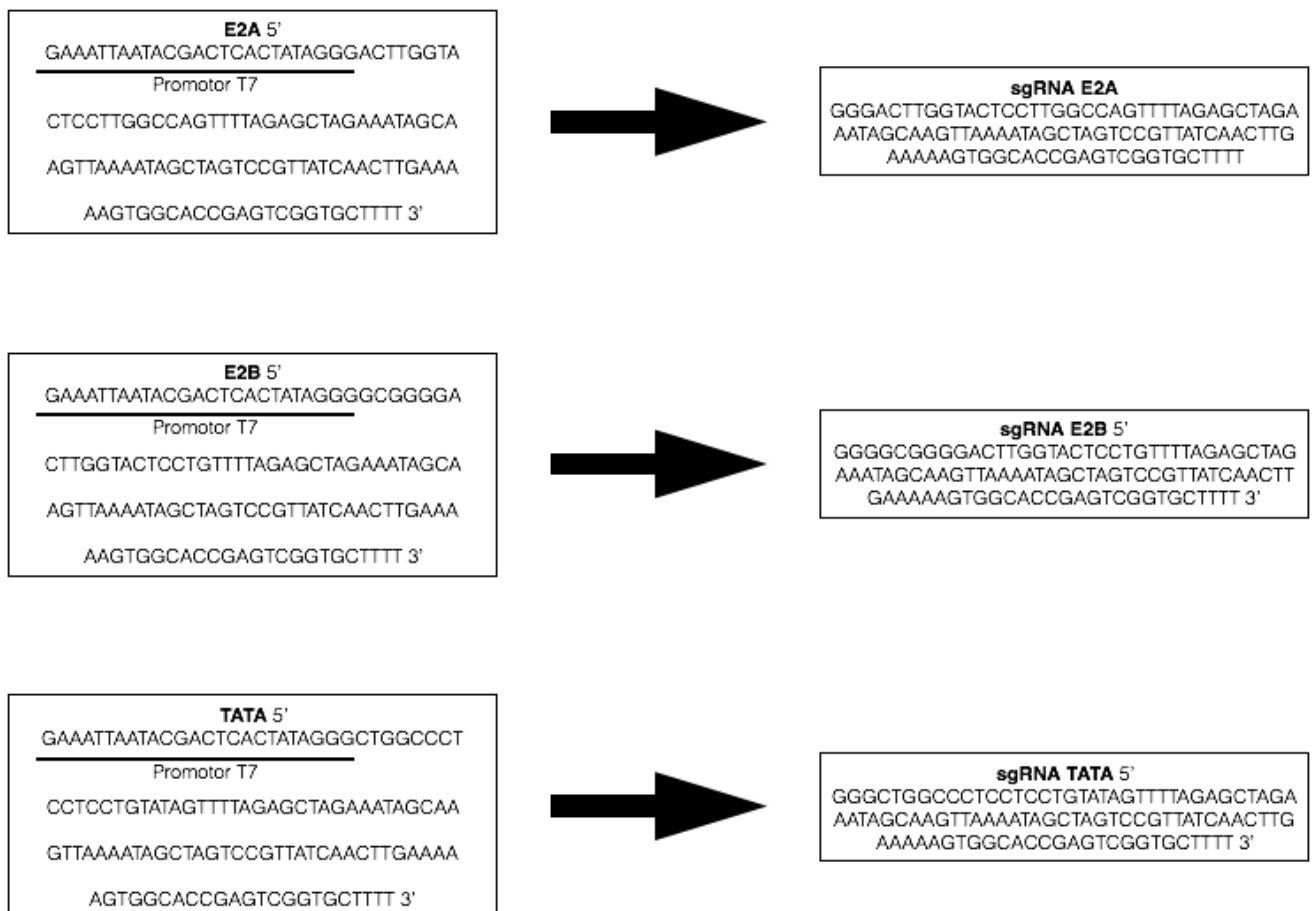


Figura 3: Esquema da transcrição *in vitro* dos sgRNAs E2A, E2B e TATA.

Estão dispostos na figura 4 as corridas eletroforéticas referentes aos produtos de PCR contendo os moldes para transcrição *in vitro* (em agarose 2%) e aos sgRNAs (poliacrilamida 6% com 6mol/L de ureia).

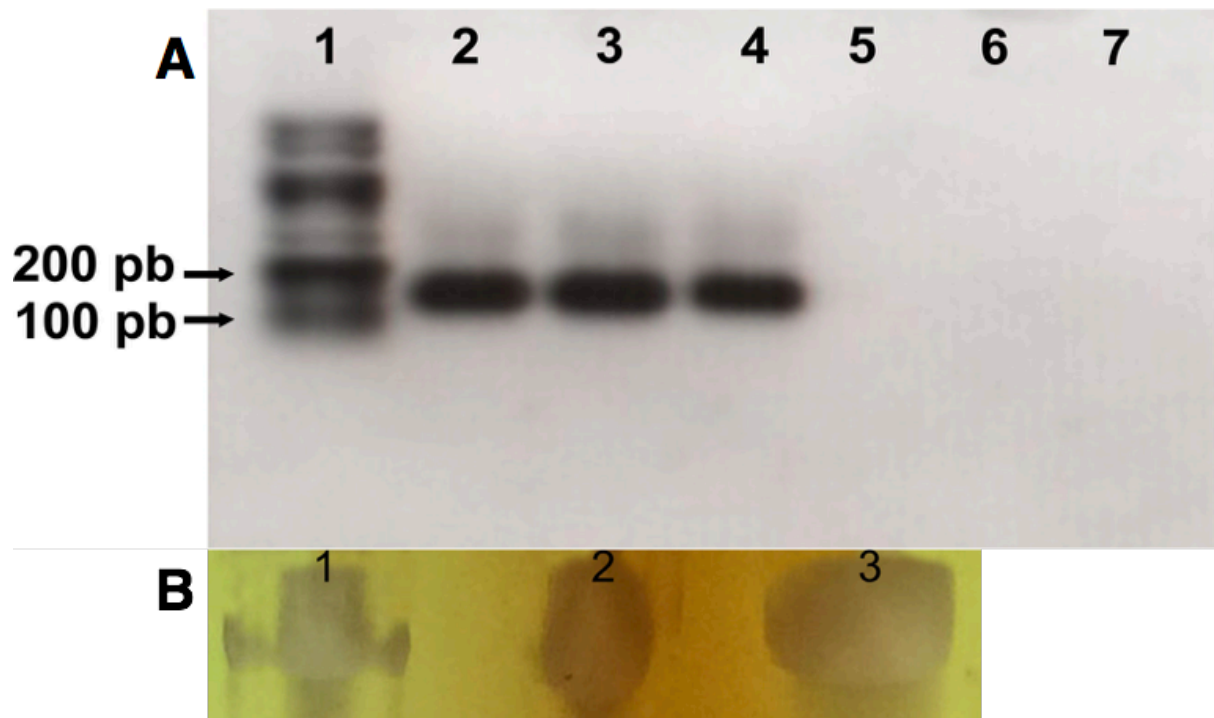


Figura 4: Corridas eletroforéticas em agarose 2% (A) dos produtos de PCR utilizados para transcrição *in vitro* e dos sgRNAs E2A, E2B, TATA em poliacrilamida 6% (B) com ureia 6mol/L.

A pureza e concentração dos sgRNAs transcritos *in vitro* e purificados pelo protocolo de fenol/clorofórmio conforme descrito no manual do fabricante foi medida por espectrofotometria em NanoDrop. As concentrações obtidas foram de 1820ng/ μ L para o E2A; 1790ng/ μ L para E2B; e 1530ng/ μ L para o TATA.

Em análise de alinhamento (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), os sgRNAs transcritos *in vitro* pareiam com as regiões de interesse no gene BLG de acordo com a figura 5.

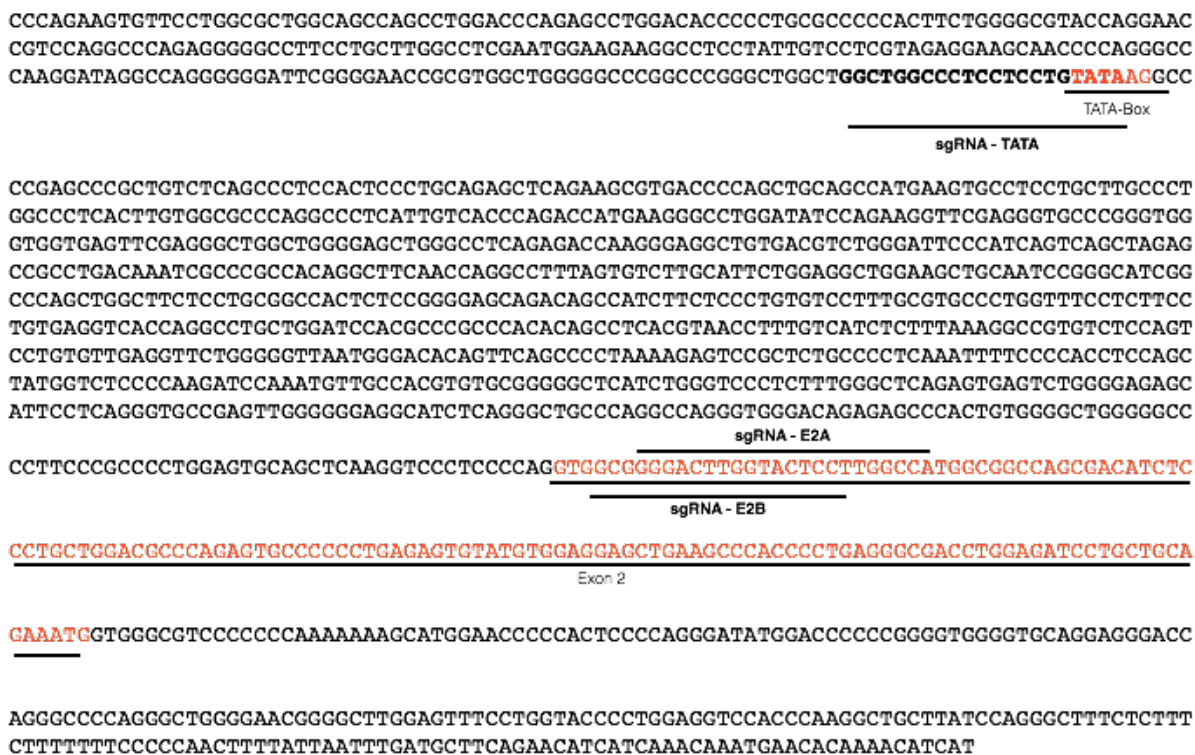


Figura 5: Alinhamento dos sgRNAs com a sequência do gene da beta-lactoglobulina e elementos do gene (TATA-box e Exon 2)

4.2 Avaliação da fluorescência em células MDBK transfectadas com plasmídeo px458 e pCas

Serão apresentados aqui os resultados obtidos por microscopia de fluorescência 48 horas após as transfecções com os plasmídeos px458 e pCas. Devido à baixa fluorescência obtida para todos os tratamentos feitos durante a otimização da transfecção, os resultados foram dados na tabela 15 de acordo com a avaliação visual da fluorescência. Os tratamentos foram feitos em duplicatas em duas placas de 96-poços e estão resumidos juntamente com os resultados na tabela 13.

Tabela 13: Avaliação visual da fluorescência em células MDBK transfectadas com os vetores px458 e pCas.

Proporção de FugeneHD e plasmídeo utilizada (Fugene : plasmídeo) com 1,3µg do plasmídeo por Mix	Quantidade do Plasmídeo aplicado				
	0,02µg	0,04µg	0,1µg	0,2µg	0,24µg
1:1	0	0	0	0	0
2:1	0	0	0	0	0
3:1	0	0	0	Menos de 5 células por campo	Menos de 5 células por campo
3,5:1	0	0	0	0	0
4:1	0	0	0	0	0
6:1	0	0	0	Menos de 5 células por campo	0

A figura 6 apresenta imagens representativas das células MDBK fluorescentes expressando GFP a partir do plasmídeo px458. Não foram observadas células fluorescentes transfectadas com o pCas2

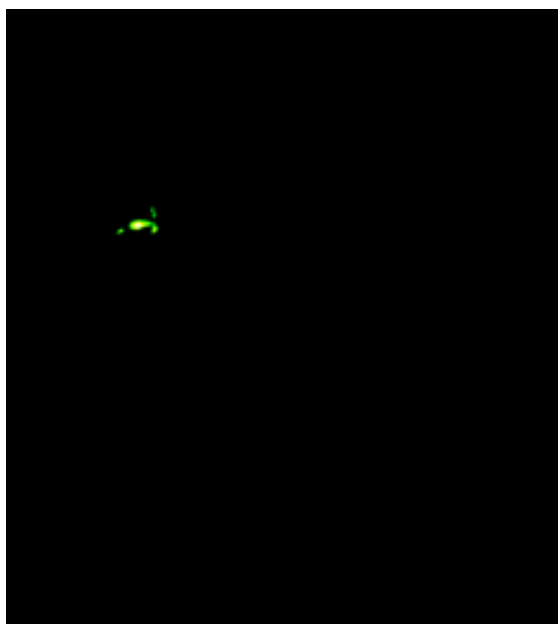


Figura 6: Imagem representativa (produzida com as células transfectadas com 12µL do mix em proporção 3:1) das células MDBK transfectadas com o vetor px458 visualizadas em microscópio invertido.

As células HEK293FT foram também transfectadas com o mesmo construto de

DNA de maneira a atestar o funcionamento do cassete de expressão e fluorescência da proteína reportadora conforme visto na figura 7. Essa comparação foi feita, uma vez que essa linhagem permite fácil transfecção e expressão de proteínas recombinantes (LIANG et al., 2015).

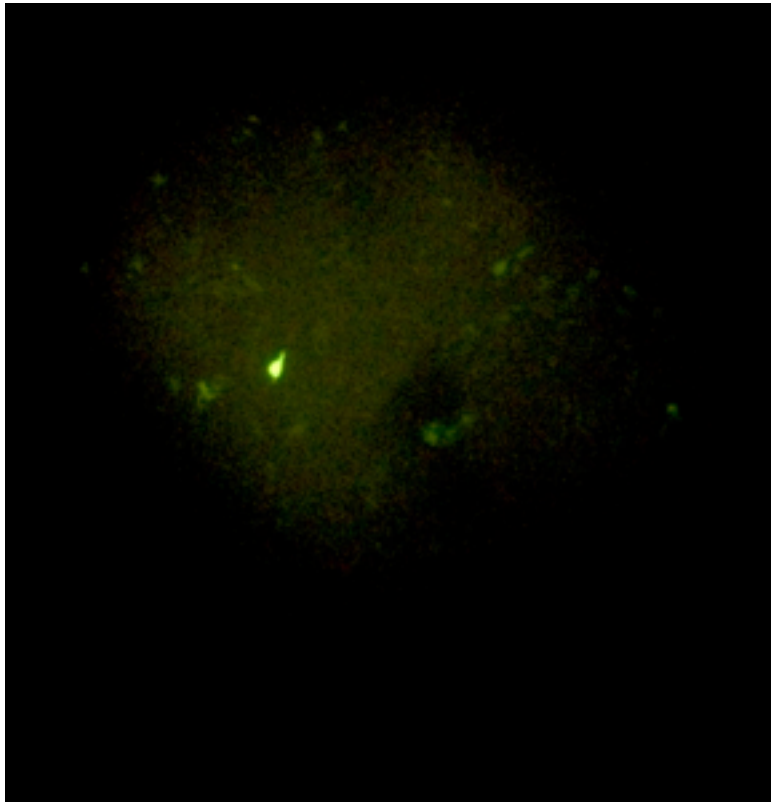


Figura 7: Imagem representativa das células HEK293FT transfectadas com o vetor px458 visualizadas em microscópio invertido.

4.3 Avaliação de Fluorescência por Citometria de Fluxo de Células Transfectadas com os Plasmídeos px458 e pCas

A avaliação citométrica, foi realizada a partir das células transfectadas com os mesmos parâmetros de quantidade de plasmídeo e proporções de reagente de transfecção utilizados para visualização sob microscopia de fluorescência. As células HEK 293 FT foram transfectadas apenas na concentração e proporção previstas no

manual do produto de maneira a atestar o funcionamento dos cassetes de expressão e parâmetros de citometria.

Resultados representativos obtidos com as análises por citometria de fluxo estão resumidos na figura 8.

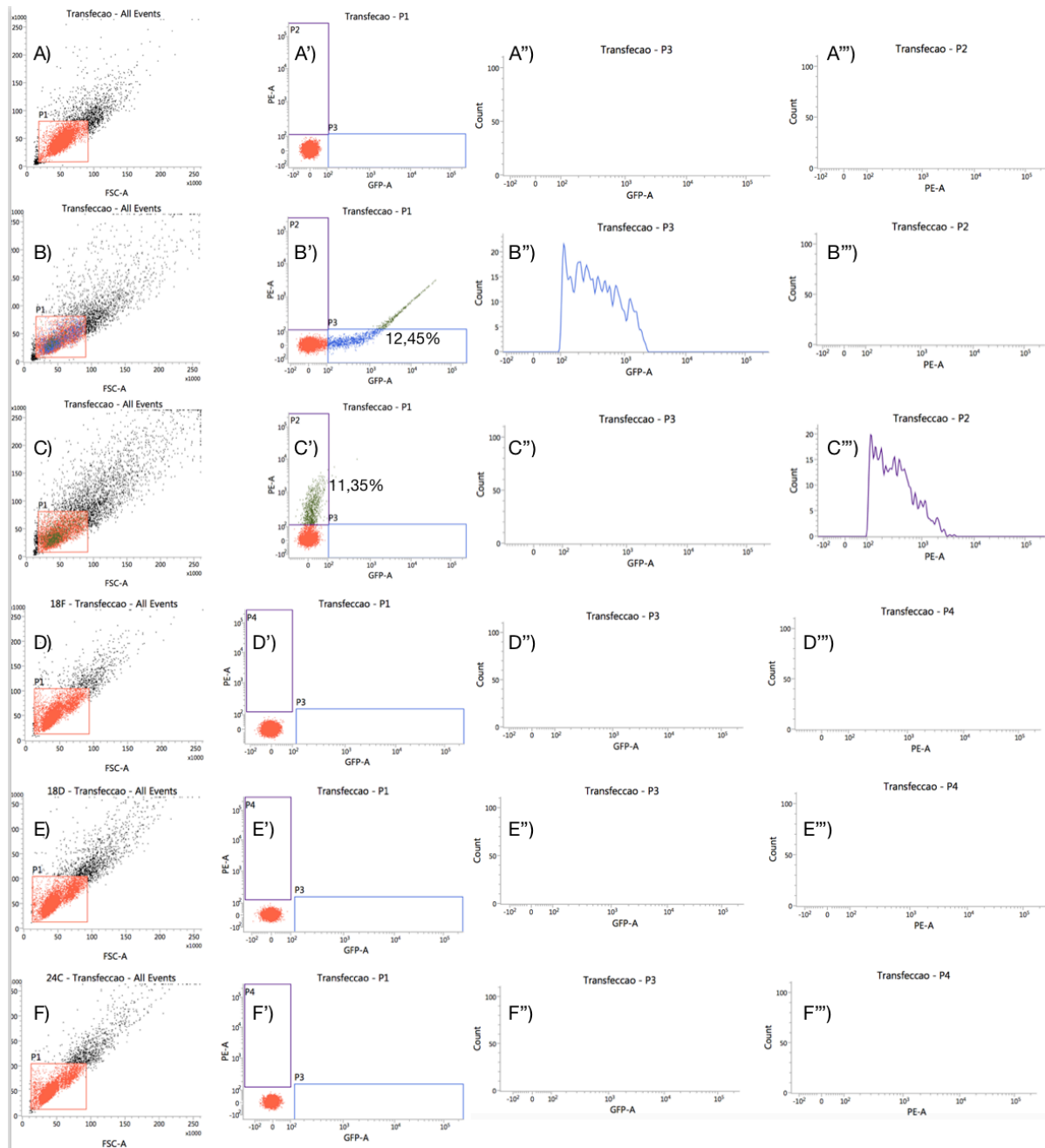


Figura 8: A) Gráfico de dispersão de tamanho por granulosidade de células HEK293FT não transfectadas; A') Gráfico de dispersão de intensidade de fluorescência no canal GFP e PE para células HEK293FT não transfectadas; A'') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal GFP; A''') Histograma de número de células por

intensidade relativa de emissão no canal PE; B) Gráfico de dispersão de tamanho por granulosidade de células HEK293FT transfectadas com px458; B') Gráfico de dispersão de intensidade de fluorescência no canal GFP e PE para células HEK293FT transfectadas com px458; B'') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal GFP; B''') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal PE; C) Gráfico de dispersão de tamanho por granulosidade de células HEK293FT transfectadas com pCas2; C') Gráfico de dispersão de intensidade de fluorescência no canal GFP e PE para células HEK293FT transfectadas com pCas2; C'') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal GFP; C''') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal PE; D) Gráfico de dispersão de tamanho por granulosidade de células MDBK não transfectadas; D') Gráfico de dispersão de intensidade de fluorescência no canal GFP e PE para células MDBK não transfectadas; D'') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal GFP; D''') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal PE; E) Gráfico de dispersão de tamanho por granulosidade de células MDBK transfectadas com px458; E') Gráfico de dispersão de intensidade de fluorescência no canal GFP e PE para células MDBK transfectadas com px458; E'') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal GFP; E''') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal PE; F) Gráfico de dispersão de tamanho por granulosidade de células MDBK transfectadas com pCas2; F') Gráfico de dispersão de intensidade de fluorescência no canal GFP e PE para células MDBK transfectadas com pCas2; F'') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal GFP; F''') Histograma de número de células por intensidade relativa de emissão no canal PE;

As células HEK293FT demonstraram fluorescência após transfectadas com ambos os plasmídeos, tendo sido a proporção de células emitindo fluorescência comparável nos grupos transfectados com ambos os plasmídeos. As células MDBK não apresentaram fluorescência em nenhum dos tratamentos empregados, de forma que as imagens resumidas na figura 6 são representativas de todo o experimento. Ao todo, foram realizados 30 tratamentos diferentes, de acordo com o exposto na tabela 6.

4.4 Avaliação da Fluorescência de Células MDBK Transfectadas com os mRNAs eGFP

As células MDBK foram transfectadas com quatro segmentos de mRNAs da eGFP como previamente elucidado: 1) mRNA eGFP; 2) mRNA eGFP-PoliA; 3) mRNA eGFP-Kozak; 4) mRNA eGFP-Kozak-PoliA. Células transfectadas com os mRNAs que passaram pelo passo de poliadenilação demonstraram fluorescência consistente com a presença da proteína eGFP, de acordo com as imagens representativas dispostas na figura 9. Células transfectadas com o mRNA-Kozak-PoliA demonstraram fluorescência visualmente mais intensa que as transfectadas com mRNA-PoliA, entretanto foi utilizada apenas a avaliação subjetiva visual sob microscopia.

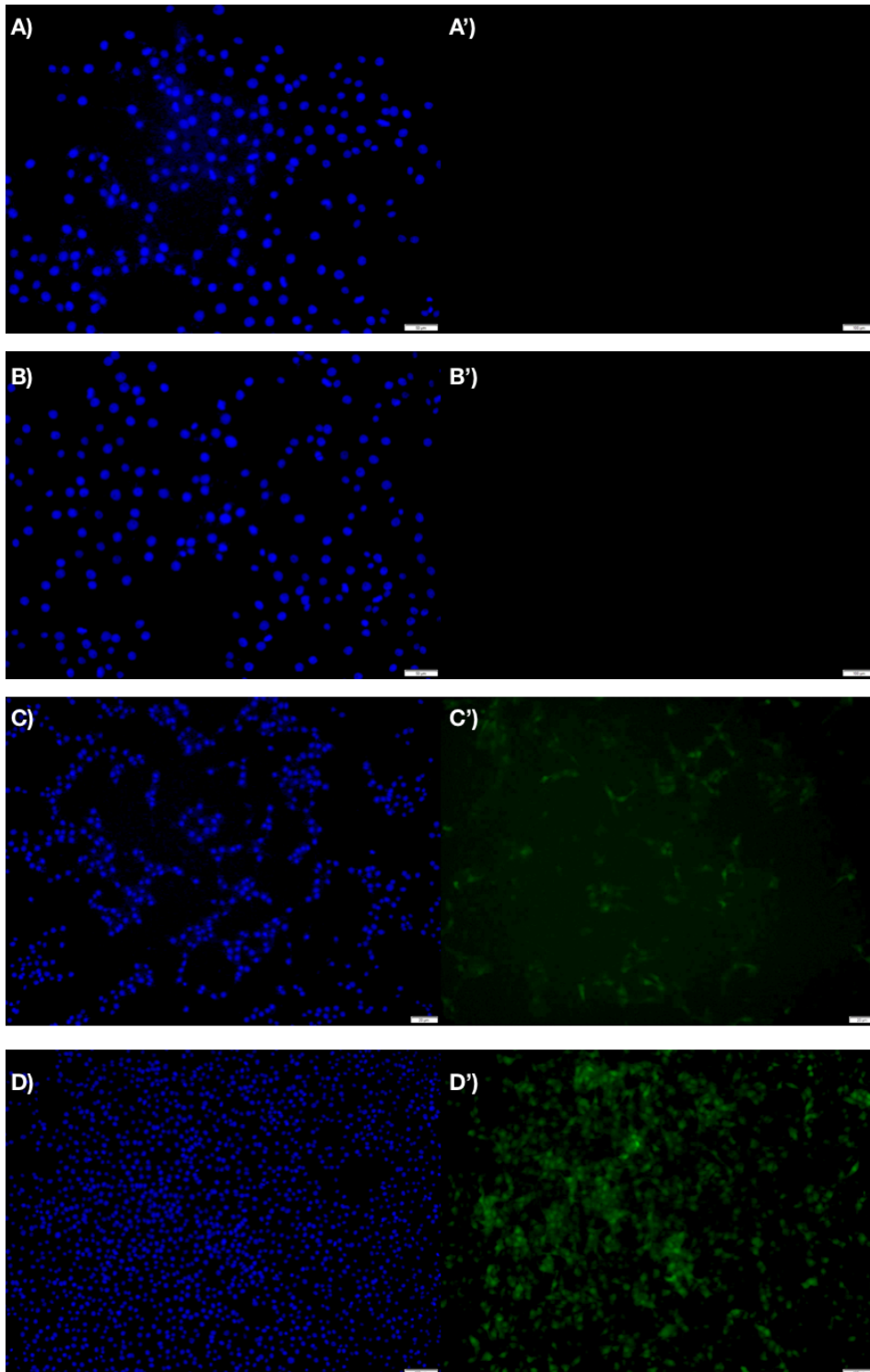


Figura 9: A (contra-coloração DAPI-núcleo) e A') Células MDBK transfetadas com mRNA eGFP; B (contra-coloração DAPI-núcleo) e B') Células MDBK transfetadas com mRNA eGFP-Kozak; C (contra-coloração DAPI-núcleo) e C') Células MDBK transfetadas com mRNA eGFP-PoliA; D (contra-coloração DAPI-núcleo) e D') Células MDBK transfetadas com mRNA eGFP-Kozak-PoliA;

4.5 Produção de Linhagem de Células MDBK Expressando Estavelmente a Proteína Cas9

Após a transfecção e repique das células transfectadas para meio contendo antibiótico de seleção, as placas foram acompanhadas sob microscópio invertido para o aparecimento de colônias isoladas. Nas duas semanas seguintes, foram encontradas 4 colônias resistentes ao antibiótico, sendo essas colônias produzidas por células transfectadas com as seguintes quantidade do plasmídeo e proporção de EugeneHD para plasmídeo px459: 1) 1 μ g do plasmídeo na proporção 3:1 (duas colônias isoladas em poços diferentes); 2) 0,5 μ g do plasmídeo na proporção 6:1; 3) 1 μ g do plasmídeo na proporção 6:1. Não pôde ser observada maior propensão a produção de colônias resistentes em nenhum dos tratamentos de transfecção realizados. As imagens das colônias obtidas nesse passo estão dispostas na figura 10.

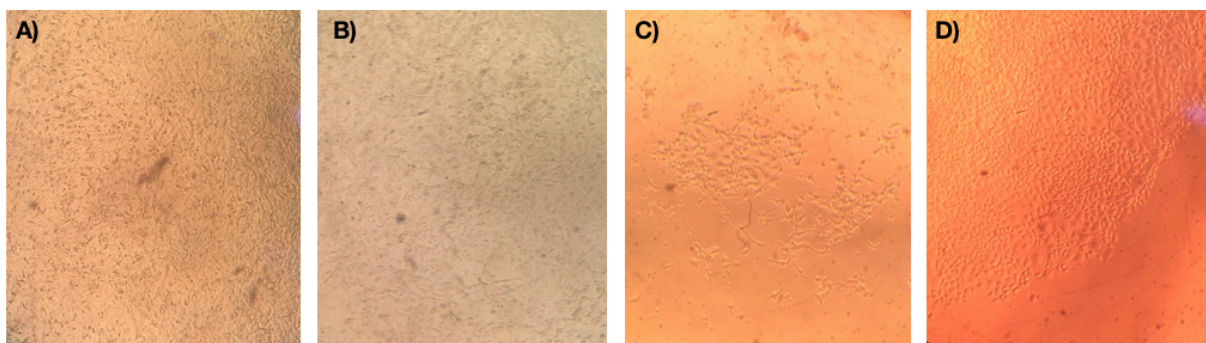


Figura 10: A e B) Colônias obtidas a partir de células MDBK transfectadas com 1 μ g do plasmídeo px459 na proporção 3:1; C) Colônia obtida a partir de células transfectadas com 0,5 μ g do plasmídeo na proporção 6:1; D) Colônia obtida a partir de células transfectadas com 1 μ g do plasmídeo na proporção 6:1.

Foram obtidas poucas colônias em relação ao grande número de células transfectadas inicialmente. As colônias produzidas foram repicadas de maneira a expandir o número de células e verificar a capacidade replicativa dessas. Foi notado que, com exceção das células da colônia obtida pela transfecção de 1µg do plasmídeo na proporção 6:1, todas demonstraram-se senescentes após a passagem. De forma que apenas essa linhagem foi utilizada nos experimentos seguintes, tendo sido denominada MDBK-Cas9. Essas células foram expandidas e congeladas em nosso banco de células para os experimentos aqui descritos e análises posteriores.

4.6 Amplificação do alvo da edição gênica por PCR e Análise de Mutações

O funcionamento da reação de PCR para os primers surv 2, surv 3 e surv 4 foi confirmado através de reação utilizando-se gDNA controle previamente extraído de fibroblastos primários bovinos disponíveis no banco de células do laboratório de reprodução animal. Na figura 11, estão os géis das corridas eletroforéticas em agarose 2% para os produtos gerados nessas reações.

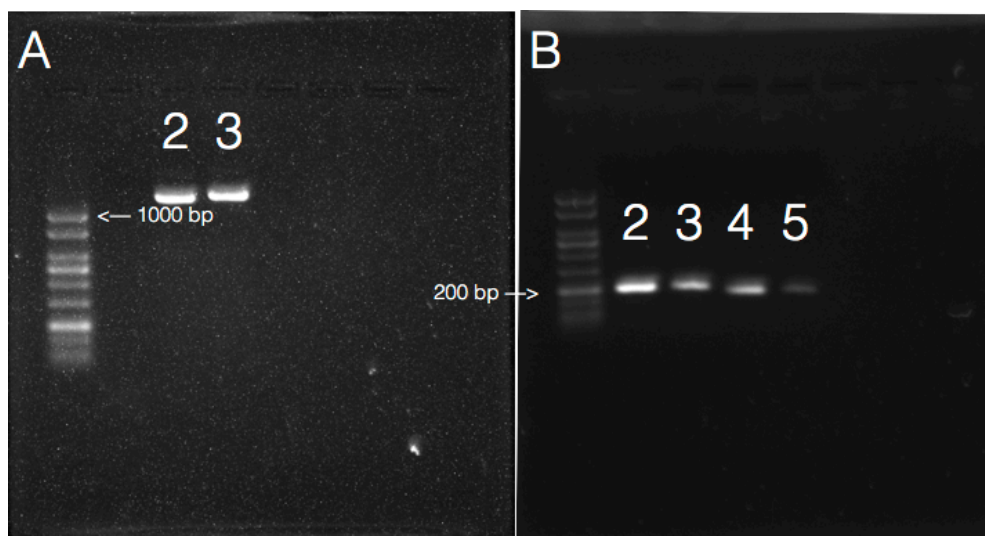


Figura 11: A) Corrida eletroforética em agarose 2% do produto gerado em reação de PCR com gDNA controle com o par de primers surv 2, cujo alvo esperado tem 1268bp. Poços 2 e 3: duplicata da reação; B) Corrida eletroforética em agarose 2% do produto gerado em reação

de PCR com gDNA controle com o par de primers surv 3 e 4, cujos produtos esperados eram de, respectivamente, 193bp e 176bp. Poços 2 e 3: duplicata da reação com surv 3; poços 4 e 5: duplicata da reação com surv 4.

Para as análises em embrião, as reações de PCR foram feitas a partir do lisado de embriões conforme descrito. Para a confirmação do funcionamento da reação nessas condições, as reações de PCR foram feitas sob as mesmas condições utilizadas para gDNA obtido dos fibroblastos. Com as amostras de embrião, o padrão da corrida eletroforética permaneceu o mesmo, entretanto com menor rendimento.

O funcionamento do kit de detecção de mutação foi verificado antes que fosse dado andamento aos experimentos. Para tanto, foram amplificadas amostras controle disponibilizadas pelo fabricante, que contém diferenças de apenas um par de base de uma para outra, com a polimerase utilizada em nossos experimentos. Em seguida, as amostras controle foram tratadas de acordo com o protocolo do fabricante. Foi realizada a reação de detecção de mutação para apenas uma das amostras, controle negativo, e para a mistura das amostras, controle positivo. Os resultados estão dispostos na figura 12.

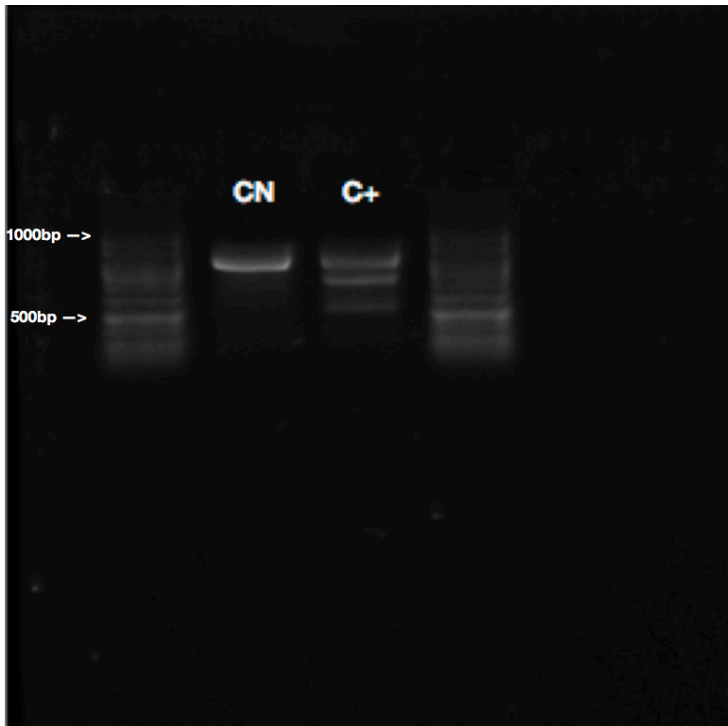


Figura 12: Corrida eletroforética em gel de agarose 2% atestando o funcionamento do kit de detecção de mutação

A reação controle positivo com o kit de detecção de mutação que continha ambas as amostras fornecidas pelo fabricante apresentaram o padrão de clivagem pela enzima Surveyor previsto pelo manual determinando a presença de mutação. Por outro lado, naquela que continha apenas uma das amostras, controle negativo, não foi observada clivagem.

As células MDBK e MDBK-Cas9 foram transfectadas de acordo com os componentes do sistema CRISPR/Cas9 e proporções resumidas na tabela 9, sendo as amostras denominadas, conforme na tabela, de D1 a D16 e de R1 a R10.

Todas as amostras tiveram gDNA extraído e o *locus* de interesse foi amplificado utilizando o par de primers *surv2*. gDNA de células MDBK não transfectadas foi utilizado como controle negativo para a reação de detecção de mutação. O sucesso das reações de PCR foi confirmado por corrida eletroforética

conforme ilustrado na figura 12, para as amostras de R1 a R10. Todas as outras amostras também puderam ser amplificadas por PCR utilizando o primer Surv2.



Figura 12: Corrida eletroforética em gel de agarose 2% dos produtos de amplificação obtidos por PCR com primer Surv2 da gDNA das amostras de R1 a R10.

Nenhuma das amostras de gDNA obtido a partir de células MDBK transfectadas com o sistema CRISPR/Cas9 com os componentes apenas na forma de DNA ou DNA e sgRNAs, amostras D1 a D16, apresentou edições gênicas detectáveis pelo método empregado, conforme foi confirmado em corrida eletroforética, figura 13.

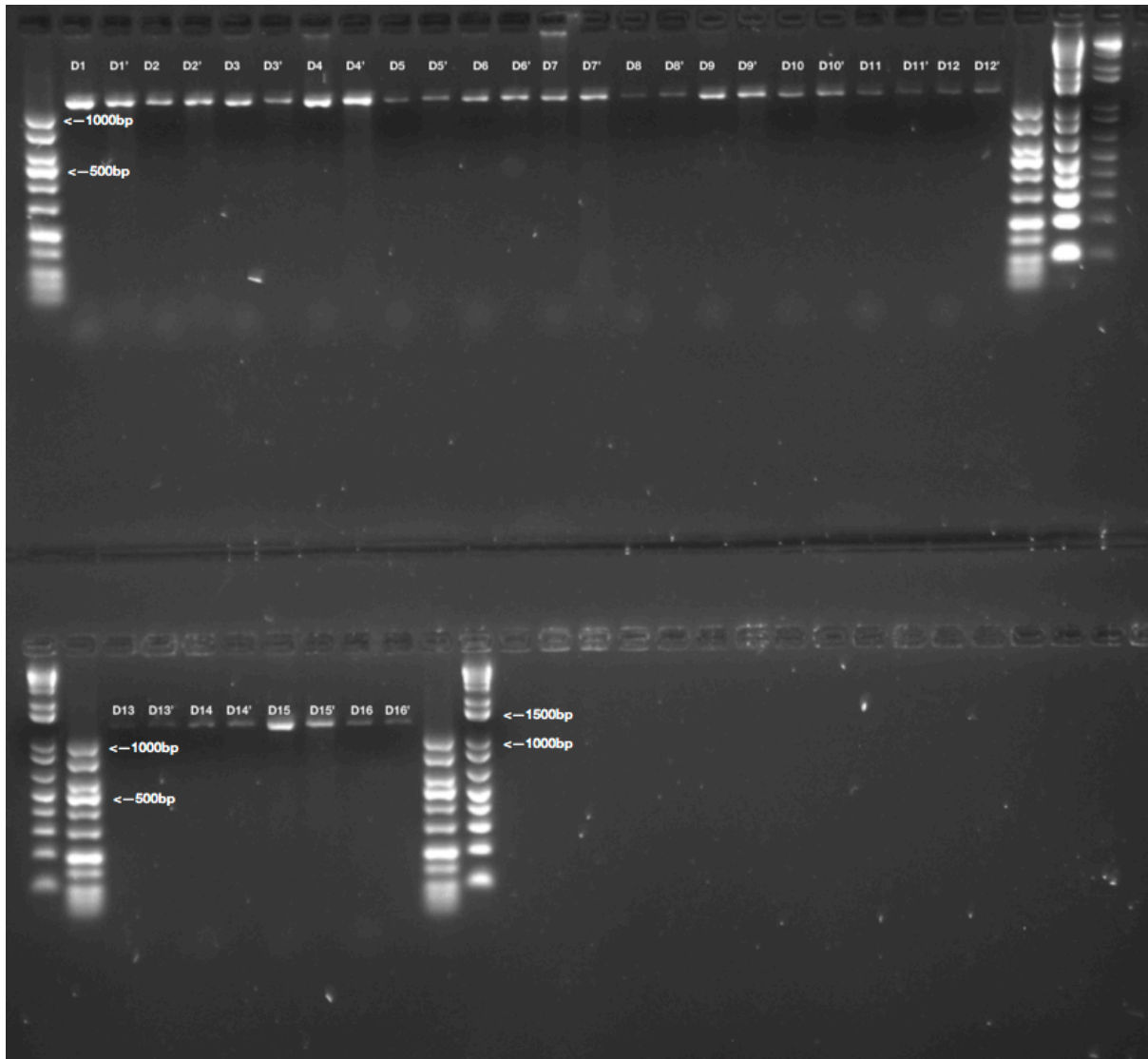


Figura 13: Corrida eletroforética em gel de agarose 2% dos produtos de amplificação obtidos por PCR com primer Surv2 e tratados posteriormente com o protocolo de detecção de mutação. Foram aplicados nos poços adjacentes as amostras não-tratadas com a enzima Surveyor seguidas das tratadas. As amostras foram denominadas como segue o exemplo: D1: não-tratada; D1': tratada com a enzima

Foi possível detectar edição gênica em todas as amostras de gDNA obtidas de células MDBK e MDBK-Cas9 transfectadas com os componentes do sistema CRISPR/Cas9 na forma de RNA, conforme confirmado em gel de eletroforese (Figura 14 e 15).

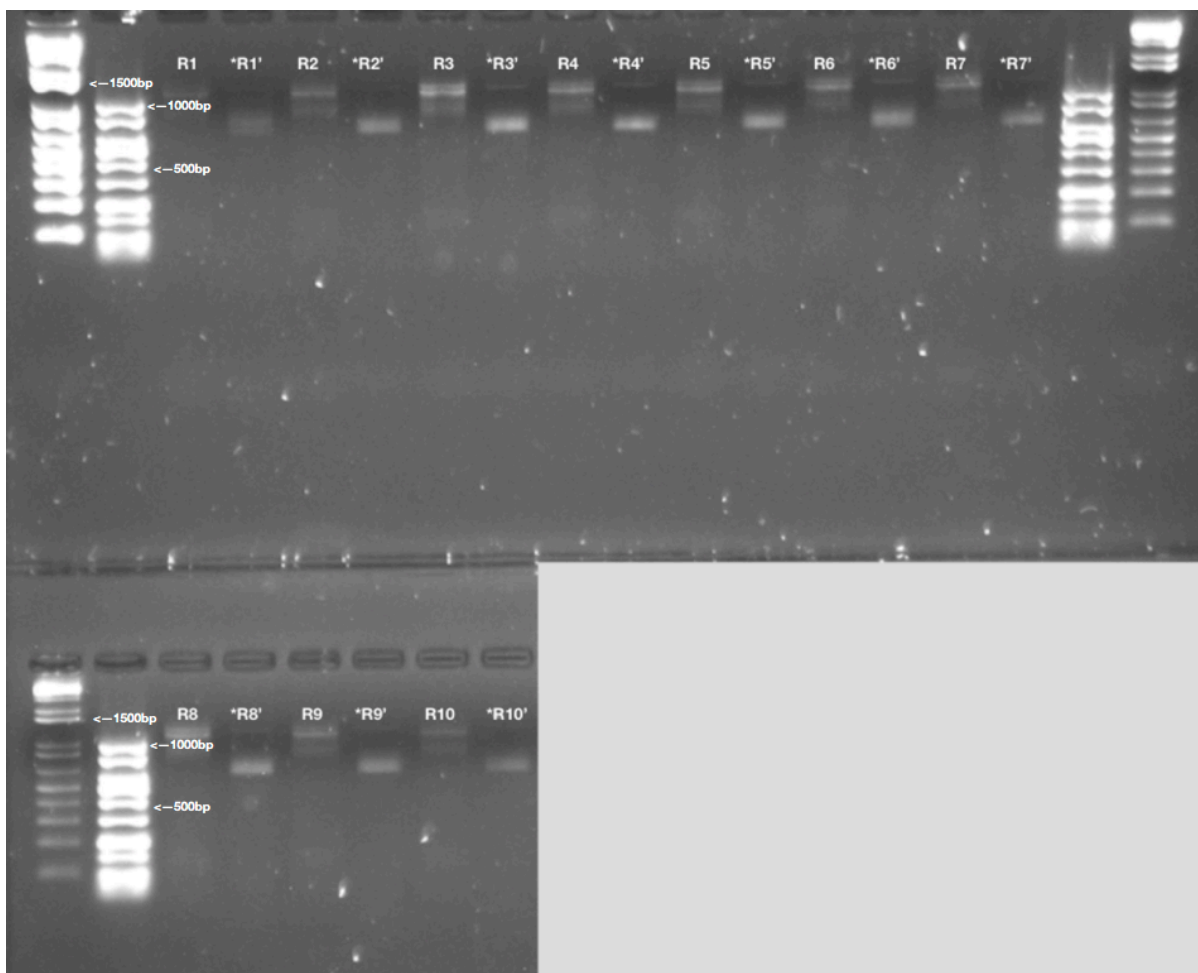


Figura 14: Corrida eletroforética em gel de agarose 2% para detecção de mutação nas amostras de R1 a R10. Foram aplicados nos poços adjacentes as amostras não-tratadas com a enzima Surveyor seguidas das tratadas. As amostras foram denominadas como segue o exemplo: R1: não-tratada; R1': tratada com a enzima. *As amostras não-tratadas com as enzimas foram diluídas em água, o que alterou o padrão de migração eletroforética.

As células MDBK-Cas9 foram transfectadas com quantidades variadas dos pares de sgRNAs conforme esclarecido previamente, sendo possível notar edição gênica no *locus* para todas as concentrações testadas (figura 15).

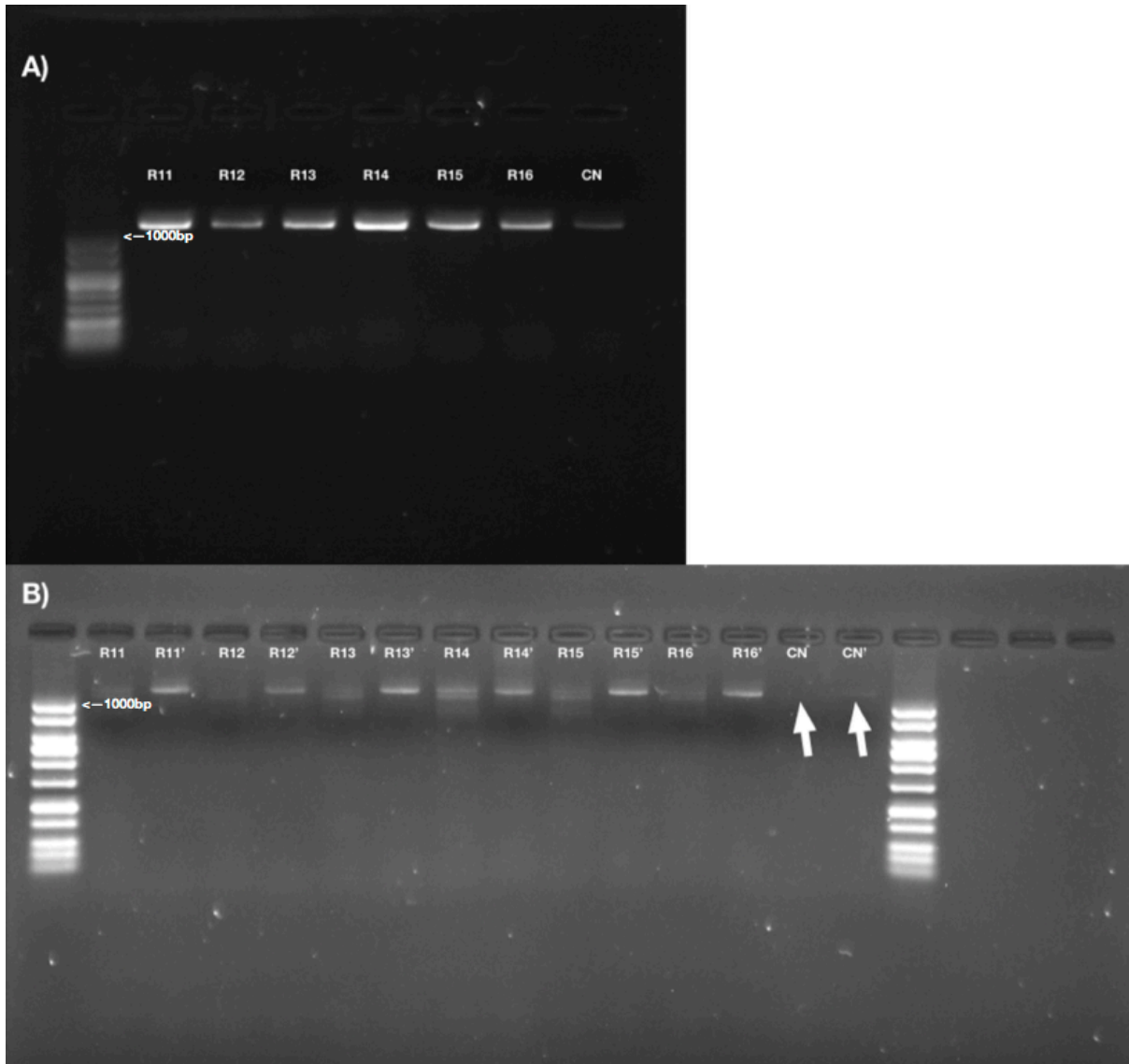


Figura 15: A) Corrida eletroforética em gel de agarose 2% confirmando a presença das bandas obtidas pela amplificação em PCR com o primer *surv2* para as amostras de R11 a R16, de células MDBK-Cas9, e controle negativo (CN), para o qual foi utilizado o gDNA de células MDBK não-transfectadas; B) Corrida eletroforética em gel de agarose 2% para detecção de mutação nas amostras de R11 a R16. Foram aplicados nos poços adjacentes as amostras não-tratadas com a enzima Surveyor seguidas das tratadas. As amostras foram denominadas como segue o exemplo: R11: não-tratada; R11': tratada com a enzima.

Em resumo, todas as células transfectadas com os componentes do sistema CRISPR/cas9 na forma de RNA apresentarem alguma proporção de edição no *locus* de interesse conforme pôde ser observado pelo ensaio de mutações pela enzima surveyor. Foram observadas clivagens em todas as bandas tratadas dessa forma.

4.7 Avaliação das taxas de clivagem e blastocistos de embriões injetados com RNAs do sistema CRISPR/Cas9

Os resultados de clivagem e formação de blastocistos não serão mostrados aqui, em vista de que em nenhum dos experimentos foi possível a obtenção de uma taxa aceitável de blastocistos, Considerando que a literatura vigente que propõe ~30% como uma taxa de produção esperada para produção *in vitro* de embriões bovinos (LONERGAN et al., 2001). Foram realizadas 19 injeções com concentrações e proporções diferentes dos componentes do sistema CRISPR/Cas9 na forma de RNA apenas ou DNA e sgRNAs, entretanto, os experimentos serão refeitos.

Considerando dos problemas quanto a produção de embriões tanto controle quando injetados, não foi possível fazer nenhuma correlação entre as taxas de clivagem e produção de blastocisto com as soluções injetadas.

5.0 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os protocolos empregados para a produção dos sgRNAs permitiram a produção desses oligonucleotídeos com o tamanho esperado além de pureza e quantidade adequadas. A partir das análises *in silico*, foi possível que fossem encontradas sequências que puderam ser utilizadas como alvo para sgRNAs nos *loci* de interesse para a promoção da edição gênica de acordo com o objetivo de interferir na expressão da proteína BLG.

Os resultados obtidos com as transfecções em células MDBK permitiram observar que a eficiência da transfecção em células bovinas, com os construtos de DNA por nós empregados, é baixa, o que obstaculou a edição gênica por essa abordagem. Foi elucubrado que a baixa detecção das proteínas fluorescentes reportadoras pode ser devida à 1) baixa expressão dos promotores utilizados presentes nos construtos (Cbh no px458 e CMV no pCas E2A); 2) a não-otimização dos códons para a espécie bovina; ou ainda 3) baixa taxa de transfecção ou alta de degradação dos vetores por sistemas intracelulares (KIM; EBERWINE, 2010). A expressão de eGFP regulada pelo promotor CMV em DNA plasmidial em células eucarióticas foi correlacionada com êxito com dados de citometria de fluxo (SOBOLESKI, 2004). Entretanto, o sucesso na expressão da proteína eGFP e da edição gênica utilizando-se mRNA da proteína Cas9 leva a inferir que a transfecção ocorre nessas células, entretanto, a transcrição regulada pelos promotores presentes nos construtos é ineficiente.

A utilização do mRNA eGFP demonstrou um método simples para a produção de mRNAs reportadores com a utilização de vetores de expressão contendo o gene para a proteína reportadora, configurando um protocolo de grande importância para

futuros trabalhos que necessitem de confirmação da transfecção ou microinjeção de RNAs sem a necessidade de importação desse oligonucleotídeo. Ademais, esses mRNAs foram essenciais para a determinação da capacidade das células modelo utilizadas serem transfectadas.

Apesar da baixa taxa de expressão dos genes contidos nos plasmídeos, foi possível a produção da linhagem MDBK-Cas9, que apresentou eficiência para edição gênica sem a utilização do mRNA Cas9 comparável a das células MDBK transfectadas com todos os componentes do sistema CRISPR/Cas9. Essa linhagem de células será de grande relevância para futuros testes de sgRNAs que objetivem o genoma bovino.

Por motivos técnicos, as taxas de produção de blastocisto, obtidas até então, resumidas na tabela 11 foram inconsistentes e muito mais baixas que as previstas na literatura (LONERGAN et al., 2001). O que pode dever-se às diversas interferências possíveis no processo de produção de embrião, tornando a técnica sensível a vários fatores (CAMARGO, L S A, 2006; LONERGAN et al., 2001). Dessa forma, não foi possível que fosse analisada a interferência da microinjeção com os componentes do sistema CRISPR/Cas9.

Os embriões utilizados para o teste da reação de detecção de mutações com a enzima Surveyor não apresentaram a edição gênica esperada. O observado pode advir da diminuída viabilidade das estruturas que analisamos, uma vez que, na maioria dos experimentos, as estruturas não chegaram na fase de blastocisto, tendo apenas havido clivagem. Nesse âmbito, é possível inferir que o meio intracelular dessas estruturas não fosse propício para o funcionamento do sistema CRISPR/Cas9, que é dependente de mecanismos de reparo, que pode estar prejudicado (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016; SATO et al., 2016).

Foi possível que amplificássemos os alvos de edição tanto em genomas controle quanto nos genomas dos embriões contido nos lisados, de maneira que é esperado que seja possível a análise das edições gênicas adequadamente pelos três testes propostos: 1) sequenciamento; 2) ensaio de heteroduplexes com a enzima surveyor; e 3) SSCP-PCR.

Em vista da escassa literatura reportando a edição gênica eficiente em embriões bovinos (BEVACQUA et al., 2016; GAO et al., 2017) e a inexistência de um protocolo otimizado para tanto, os resultados obtidos contribuirão para o avanço do estado da arte da engenharia genética. Conclui-se que os sgRNAs desenhados permitem a edição gênica do *locus* de interesse e, em última instância, que o emprego do sistema de edição gênica em linhagens de células bovinas MDBK pode ser realizado com a utilização dos RNAs componentes do sistema, demonstrando assim a otimização de um modelo para edição gênica em células bovinas. Desse modo, células MDBK e células MDBK-Cas (modificadas para expressão da enzima Cas9) podem ser usadas como modelos em estudos com edição do genoma bovina usando o sistema CRISPR/Cas9. O gene da BLG já foi editado com sucesso utilizando as TALENs e NDZs (WEI et al., 2015), de forma que o alvo objetivado nesse trabalho permitirá comparação adequada com os outros sistemas de edição gênica. Destarte, os resultados obtidos agregarão ao conhecimento disponível sobre edição gênica.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, D. V. et al. Fluorescent transgenic zebrafish as a biosensor for growth-related effects of methyl parathion. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 147–151, jul. 2014.
- BARRANGOU, R. et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1709–1712, 23 mar. 2007.
- BEARDMORE, J. Transgenics: autotransgenics and allotransgenics. **Transgenic Research**, v. 6, n. 1, p. 107–108, 1997.
- BEVACQUA, R. J. et al. Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. **Theriogenology**, v. 86, n. 8, p. 1886–1896.e1, nov. 2016.
- BLECK, G. T. et al. Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 12, p. 3072, 1998.
- BOCH, J. et al. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. **Science**, v. 326, n. 5959, p. 1509–1512, 11 dez. 2009.
- BOLOTIN, A.; QUINQUIS, B.; SOROKIN, A.; EHRLICH, S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 2551–2561, 1 ago. 2005.
- BOUABE, H.; OKKENHAUG, K. Gene Targeting in Mice: A Review. In: [s.l.: s.n.]. p. 315–336.
- BU, G. et al. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. **Dairy science & technology**, v. 93, n. 3, p. 211–223, maio 2013.
- CAMARGO, L S A; VIANA, J H M; SÁ, W F; FERREIRA, A M; RAMOS, A A; VALE FILHO, V. R. Factors influencing in vitro embryo production. **Animal Reproduction**, v. 3, n. 1, p. 19–28, 2006.
- CARLSON, D. F. et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 43, p. 17382–17387, 23 out. 2012.
- CARLSON, D. F. et al. Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 479–481, 6 maio 2016.
- CHANDRASEGARAN, S.; CARROLL, D. Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 5, p. 963–989, fev. 2016.
- CHO, S. W. et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 230–232, 29 jan. 2013.
- CHRISTIAN, M. et al. Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. **Genetics**, v. 186, n. 2, p. 757–761, 1 out. 2010.
- CONG, L. et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819–823, 15 fev. 2013.
- CRITTENDEN, R. G.; BENNETT, L. E. Cow's milk allergy: a complex disorder. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 24, n. 6 Suppl, p. 582S–91S, dez. 2005.
- DAMAK, S. et al. Improved Wool Production in Transgenic Sheep Expressing Insulin-like Growth Factor 1. **Bio/Technology**, v. 14, n. 2, p. 185–188, fev. 1996.
- DENNING, C. et al. No Title. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 559–562, 1 jun. 2001.
- DEVLIN, R. H. et al. Domestication and growth hormone transgenesis cause similar changes in gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Proceedings**

of the **National Academy of Sciences**, v. 106, n. 9, p. 3047–3052, 3 mar. 2009.

FIOCCHI, A; BROZEK, J; SCHÜNEMANN, H; BAHNA, S L; VON BERG, A; BEYER, K; BOZZOLA, M; BRADSHER, J; COMPALATI, E; EBISAWA, M; MARIA ANTONIETA GUZMMN, HAIQI LI, RALF G. HEINE, PAUL KEITH, GIDEON LACK, MASSIMO LANDI, ALBERTO MARTE, L. T. AND S. V. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 21, p. 1–125, 1 jul. 2010.

FUJIHARA, Y.; IKAWA, M. CRISPR/Cas9-Based Genome Editing in Mice by Single Plasmid Injection. In: [s.l: s.n.]. p. 319–336.

GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 397–405, jul. 2013.

GAMA SOSA, M. A.; DE GASPERI, R.; ELDER, G. A. Animal transgenesis: an overview. **Brain Structure and Function**, v. 214, n. 2–3, p. 91–109, 25 mar. 2010.

GAO, Y. et al. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 13, 1 dez. 2017.

GORDON, J W; RUDDLE, F. H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. **Science**, v. 214(, n. 4526, p. 1244–1246., 1981.

GORDON, J. W. et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 12, p. 7380–4, dez. 1980.

GRISSA, I.; VERGNAUD, G.; POURCEL, C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server, p. W52–W57, 8 maio 2007.

HAMMER, R. E. et al. Expression of human growth hormone-releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth. **Nature**, v. 315, n. 6018, p. 413–6, [s.d.].

HE, Z. et al. Comparison of CRISPR/Cas9 and TALENs on editing an integrated EGFP gene in the genome of HEK293FT cells. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 814, 21 dez. 2016.

HIROSE, M. et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in wild-derived mice: generation of tamed wild-derived strains by mutation of the a (nonagouti) gene. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42476, 14 fev. 2017.

HUTCHINSON, J. N.; MULLER, W. J. Transgenic mouse models of human breast cancer. **Oncogene**, v. 19, n. 53, p. 6130–6137, 11 dez. 2000.

HWANG, W. Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 227–229, 29 jan. 2013.

IRION, U.; KRAUSS, J.; NUSSLEIN-VOLHARD, C. Precise and efficient genome editing in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. **Development**, v. 141, n. 24, p. 4827–4830, 15 dez. 2014.

ISHINO, Y. et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429–5433, dez. 1987.

J. M. ADAMS; A. W. HARRIS, C. A. PINKERT, L. M. CORCORAN, W. S. ALEXANDER, S. CORY, R. D. PALMITER, R. L. B. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. **Nature**, v. 318, p. 533–538, 1985.

JABED, A. et al. Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of -lactoglobulin-free, high-casein milk. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences, v. 109, n. 42, p. 16811–16816, 16 out. 2012.

JIN, L.-F.; LI, J.-S. Generation of genetically modified mice using CRISPR/Cas9 and haploid embryonic stem cell systems. **Dong wu xue yan jiu = Zoological research**, v. 37, n. 4, p. 205–13, 18 jul. 2016.

JINEK, M. et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 17 ago. 2012.

JINEK, M. et al. RNA-programmed genome editing in human cells. **eLife**, v. 2, 29 jan. 2013.

KIM, Y G; CHANDRASEGARAN, S. Chimeric restriction endonuclease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 4, p. 883–887, 1994.

KIM, T. K.; EBERWINE, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 8, p. 3173–3178, 13 ago. 2010.

KIM, Y. G.; CHA, J.; CHANDRASEGARAN, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 3, p. 1156–60, 6 fev. 1996.

KLEINSTIVER, B. P. et al. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. **Nature**, v. 529, n. 7587, p. 490–495, 6 jan. 2016.

KLUG, A; CHOO, Y. Selection of DNA binding sites for zinc fingers using rationally randomized DNA reveals coded interactions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 23, p. 11168–11172, 1994a.

KLUG, A; CHOO, Y. Toward a code for the interactions of zinc fingers with DNA: selection of randomized fingers displayed on phage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 23, p. 11163–11167, 1994b.

KUES, W. A.; NIEMANN, H. Advances in farm animal transgenesis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, n. 2, p. 146–156, nov. 2011.

LAI, L. et al. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 435–436, 26 mar. 2006.

LAZZERINI-DENCHI, E.; SFEIR, A. Stop pulling my strings — what telomeres taught us about the DNA damage response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 6, p. 364–378, 11 maio 2016.

LEDFORD, H. Transgenic salmon nears approval. **Nature**, v. 497, n. 7447, p. 17–18, 1 maio 2013.

LEDFORD, H. Salmon is first transgenic animal to win US approval for food. **Nature**, 19 nov. 2015.

LIANG, X. et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. **Journal of Biotechnology**, v. 208, p. 44–53, ago. 2015.

LIEVENS, A. et al. Genetically modified animals: Options and issues for traceability and enforcement. **Trends in Food Science & Technology**, v. 44, n. 2, p. 159–176, ago. 2015.

LIU, Q.; XIA, Z.; CASE, C. C. Validated Zinc Finger Protein Designs for All 16 GNN DNA Triplet Targets. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 6, p. 3850–3856, 8 fev. 2002.

LONERGAN, P. et al. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction, nutrition, development**, v. 41, n. 5, p. 427–37, [s.d.].

LONERGAN, P. et al. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction, nutrition, development**, v. 41, n. 5, p. 427–37, 2001.

LOTTI, S. N. et al. Modification of the Genome of Domestic Animals. **Animal Biotechnology**, p. 1–13, 19 jan. 2017.

LYALL, J. et al. Suppression of Avian Influenza Transmission in Genetically Modified

Chickens. **Science**, v. 331, n. 6014, p. 223–226, 14 jan. 2011.

MAKSIMENKO, O. G. et al. Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems. **Acta naturae**, v. 5, n. 1, p. 33–46, jan. 2013.

MALI, P. et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 823–826, 15 fev. 2013.

MELO, E. O. et al. Animal transgenesis: state of the art and applications. **Journal of applied genetics**, v. 48, n. 1, p. 47–61, 2007.

MILLER, J.; MCLACHLAN, A. D.; KLUG, A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. **The EMBO journal**, v. 4, n. 6, p. 1609–14, jun. 1985.

MOHIUDDIN, M. M. et al. Genetically engineered pigs and target-specific immunomodulation provide significant graft survival and hope for clinical cardiac xenotransplantation. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 148, n. 3, p. 1106–1114, set. 2014.

MOJICA, F. J. M. et al. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60, n. 2, p. 174–182, fev. 2005.

MOSCOU, M. J.; BOGDANOVA, A. J. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. **Science**, v. 326, n. 5959, p. 1501–1501, 11 dez. 2009.

MOURA, R. R. et al. Dynamics of Recombinant hG-CSF in Transgenic Goat: Preliminary Study in the Founder during Hormonally Induced Lactation. **Animal Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 10–14, jan. 2013.

NAKAGAWA, Y. et al. Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized oocytes. **BMC Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 33, 22 dez. 2015.

PAVLETICH, N. P.; PABO, C. O. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. **Science (New York, N.Y.)**, v. 252, n. 5007, p. 809–17, 10 maio 1991.

PINNAPUREDDY, A. R. et al. Large animal models of rare genetic disorders: sheep as phenotypically relevant models of human genetic disease. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 10, n. 1, p. 107, 2 dez. 2015.

POURCEL, C.; SALVIGNOL, G.; VERGNAUD, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology (Reading, England)**, v. 151, n. Pt 3, p. 653–63, 1 mar. 2005.

PROUDFOOT, C. et al. Genome edited sheep and cattle. **Transgenic Research**, v. 24, n. 1, p. 147–153, 10 fev. 2015.

QIAN, X. et al. Production of recombinant human proinsulin in the milk of transgenic mice. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 6465, 30 maio 2015.

RAMALINGAM, S. et al. Generation and Genetic Engineering of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Designed Zinc Finger Nucleases. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 4, p. 595–610, 15 fev. 2013.

RAMALINGAM, S. et al. TALEN-mediated generation and genetic correction of disease-specific human induced pluripotent stem cells. **Current gene therapy**, v. 14, n. 6, p. 461–72, 2014.

RAN, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281–2308, 24 out. 2013.

REARDON, S. Gene-editing record smashed in pigs. **Nature**, 6 out. 2015.

REBAR, E. J.; PABO, C. O. Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities. **Science (New York, N.Y.)**, v. 263, n. 5147, p. 671–3, 4

fev. 1994.

RICHT, J. A. et al. Production of cattle lacking prion protein. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 132–138, fev. 2007.

ROGERS, C. S. Engineering Large Animal Species to Model Human Diseases. In: **Current Protocols in Human Genetics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2016. p. 15.9.1-15.9.14.

SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 347–355, 2 mar. 2014.

SATO, M. et al. Direct Injection of CRISPR/Cas9-Related mRNA into Cytoplasm of Parthenogenetically Activated Porcine Oocytes Causes Frequent Mosaicism for Indel Mutations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 17838–17856, 3 ago. 2015.

SATO, M. et al. Nucleic acids delivery methods for genome editing in zygotes and embryos: the old, the new, and the old-new. **Biology Direct**, v. 11, n. 1, p. 16, 31 dez. 2016.

SAUNDERS, R. L.; FLETCHER, G. L.; HEW, C. L. Smolt development in growth hormone transgenic Atlantic salmon. **Aquaculture**, v. 168, n. 1–4, p. 177–193, out. 1998.

SCHEENEN, W. J. J. M. et al. Using Transgenic Animal Models in Neuroendocrine Research. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1163, n. 1, p. 296–307, abr. 2009.

SMITH, J.; BERG, J. M.; CHANDRASEGARAN, S. A detailed study of the substrate specificity of a chimeric restriction enzyme. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 2, p. 674–81, 15 jan. 1999.

SOBOLESKI, M. R. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. **The FASEB Journal**, 13 dez. 2004.

SWARTHOUT, J. T.; RAISINGHANI, M.; CUI, X. Zinc Finger Nucleases: A new era for transgenic animals. **Annals Of Neurosciences**, v. 18, n. 1, 2 jan. 2011.

THERMO. **Demonstrated Protocol: Embryo Microinjection With CRISPR-Cas9 in Mice and Zebrafish**. Disponível em:

<<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/genome-editing/genome-editing-learning-center/genome-editing-resource-library/genome-editing-application-notes/protocol-embryo-microinjection-crispr-cas9-mice-zebrafish.html>>.

TONG, J. et al. Production of recombinant human lysozyme in the milk of transgenic pigs. **Transgenic Research**, v. 20, n. 2, p. 417–419, 12 abr. 2011.

VANDENPLAS, Y.; DE GREEF, E.; DEVREKER, T. Treatment of Cow's Milk Protein Allergy. **Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition**, v. 17, n. 1, p. 1, 2014.

WANG, H.; LA RUSSA, M.; QI, L. S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, n. 1, p. 227–264, 2 jun. 2016.

WARINNER, C. et al. Direct evidence of milk consumption from ancient human dental calculus. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 7104, 27 maio 2015.

WEI, J. et al. Efficient introgression of allelic variants by embryo-mediated editing of the bovine genome. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11735, 9 dez. 2015.

WHEELER, M. B.; BLECK, G. T.; DONOVAN, S. M. Transgenic alteration of sow milk to improve piglet growth and health. **Reproduction (Cambridge, England) Supplement**, v. 58, p. 313–24, 2001.

WHITELAW, C. B. A. et al. Engineering large animal models of human disease. **The Journal of Pathology**, v. 238, n. 2, p. 247–256, jan. 2016.

WU, H. et al. TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased

resistance to tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 13, p. E1530–E1539, 31 mar. 2015.

WU, X. et al. Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids. **Transgenic Research**, v. 21, n. 3, p. 537–543, 15 jun. 2012.

YU, S. et al. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. **Cell Research**, v. 21, n. 11, p. 1638–1640, 13 nov. 2011.

ZHANG, X.-H. et al. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 4, p. e264, 2015.