

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

Gustavo Torres de Souza

**Produção e Avaliação de Modelos de Cultivo Celular para Teste de RNAs Guia
para o Sistema CRISPR-Cas9**

Juiz de Fora

2023

Gustavo Torres de Souza

Produção e Avaliação de Modelos de Cultivo Celular para Teste de RNAs Guia para o Sistema CRISPR-Cas9

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas. Área de concentração: Genética e Biotecnologia

Orientador: Professor Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Coorientadora: Dra. Rafaela Chitarra Rodrigues Hell

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Torres de Souza, Gustavo.

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE MODELOS DE CULTIVO CELULAR PARA TESTE DE RNAs GUIA PARA O SISTEMA CRISPR-CAS9 / Gustavo Torres de Souza. -- 2023.

83 p.

Orientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Coorientadora: Rafaela Chitarra Rodrigues Hell

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2023.

1. Edição Gênica. 2. Transfênia. 3. CRISPR-Cas9. I. de Almeida Camargo, Luiz Sérgio, orient. II. Chitarra Rodrigues Hell, Rafaela, coorient. III. Título.

Gustavo Torres de Souza

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE MODELOS DE CULTIVO CELULAR PARA TESTE DE RNAs
GUIA PARA O SISTEMA CRISPR-CAS9**

Tese apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciências Biológicas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Doutor em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Genética &
Biotecnologia.

Aprovada em 30 de janeiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof^a. Dr^a. Naiara Zoccal Saraiva
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA GADO DE LEITE

Prof. Dr. Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista

Universidade Federal Fluminense - UFF

Juiz de Fora, 17/01/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Naiara Zoccal Saraiva, Usuário Externo**, em 30/01/2023, às 18:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Sergio de Almeida Camargo, Usuário Externo**, em 30/01/2023, às 18:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo de Oliveira Santos, Professor(a)**, em 30/01/2023, às 18:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Magno da Costa Maranduba, Professor(a)**, em 01/02/2023, às 09:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista, Usuário Externo**, em 06/02/2023, às 08:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj (www2.uffj.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1114459** e o código CRC **C60BBE30**.

Dedico este trabalho aos meus pais e avós que me inspiram e me auxiliaram na realização...

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 orientador Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo, por todos os ensinamentos, paciência, ajuda e incentivo desde o início da minha estada no LRA.

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

Diana pela amizade e ajuda sem precedentes em todos os momentos. Jéssica, Vanessa, Carol David, Lilian Judith e Eliza por toda o suporte e companheirismo nesses 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.

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

Contexto: O sistema de edição gênica CRISPR-Cas9 tem se mostrado uma ferramenta poderosa para modificações genéticas direcionadas. Esta tese de doutorado buscou otimizar o sistema CRISPR-Cas9 para utilização em linhagens celulares bovinas e embriões. Métodos: Foram desenhados e produzidos sgRNAs específicos visando loci de interesse para edição gênica em células epiteliais mamárias bovinas (MDBK). Adicionalmente, células MDBK expressando estavelmente a proteína Cas9 foram geradas. A atividade dos sgRNAs foi avaliada in vitro, e RNA mensageiros (mRNA) reportadores foram utilizados para confirmar a eficiência da transfeção. A seleção por antibiótico foi empregada para promover a expressão estável da Cas9 em linhagens celulares humanas e bovinas. A eficiência da edição gênica em embriões também foi avaliada por meio de PCR e sequenciamento. Resultados: A avaliação in vitro da atividade dos sgRNAs em células MDBK demonstrou variações na eficiência de edição, destacando a necessidade de linhagens celulares expressando a Cas9 com genomas relevantes. O método do mRNA reportador demonstrou sua utilidade para confirmar a eficiência da transfeção. A seleção por antibiótico promoveu com sucesso a expressão estável da Cas9 em linhagens celulares humanas e bovinas. A edição gênica em embriões resultou em uma proporção total de edição de 48%, sendo a maioria das células mutantes (35,5%) apresentando uma deleção de um nucleotídeo. Conclusão: Os sgRNAs desenhados permitiram a edição gênica em linhagens celulares bovinas MDBK, e o modelo otimizado do sistema CRISPR-Cas9 mostrou-se eficaz para editar os loci alvo em embriões. Esses resultados contribuem para o avanço da engenharia do genoma bovino, oferecendo aplicações potenciais em futuros estudos envolvendo o sistema CRISPR-Cas9 para a edição do genoma bovino.

Palavras-chave: Edição Gênica; Engenharia Genética; Transgenia animal; AGMs; CRISPR-Cas9; Beta-lactoglobulina; Receptor de prolactina; Embriões.

ABSTRACT

Background: The CRISPR-Cas9 gene editing system has emerged as a powerful tool for targeted genetic modifications. This doctoral thesis aimed to optimize the CRISPR-Cas9 system for use in bovine mammary epithelial cells (MDBK) and embryos. **Methods:** Specific sgRNAs were designed and produced to target loci of interest for gene editing in MDBK cells. Additionally, stable Cas9-expressing MDBK cells were generated. In vitro evaluation of sgRNA activity was conducted, and mRNA reporters were utilized for transfection efficiency confirmation. Antibiotic selection was employed to promote stable Cas9 expression in human and bovine cell lines. The efficiency of gene editing in embryos was also evaluated through PCR and sequencing. **Results:** The in vitro evaluation of sgRNA activity in MDBK cells showed variations in editing efficiency, emphasizing the need for cell lines expressing Cas9 with relevant genomes. The mRNA reporter method demonstrated its usefulness for confirming transfection efficiency. Antibiotic selection successfully promoted stable Cas9 expression in human and bovine cell lines. Gene editing in embryos resulted in a total editing proportion of 48%, with the majority of mutant cells (35.5%) exhibiting a single-nucleotide deletion. **Conclusion:** The designed sgRNAs enabled gene editing in MDBK bovine cell lines, and the optimized CRISPR-Cas9 model was effective for editing the target loci in embryos. These findings contribute to the advancement of bovine genome engineering, offering potential applications in future studies involving the CRISPR-Cas9 system for bovine genome editing.

Keywords: Gene Editing; genetic engineering; animals; transgenics; GMAs; CRISPR-Cas9; Beta-lactoglobulin; prolactin receptor; Embryos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	– Esquema das Ferramentas de Edição Gênica.....	5
Figura 2	– Gel de agarose 2% indicando a presença dos três segmentos de sgRNA sintetizados <i>in vitro</i> com tamanho igual.....	34
Figura 3	– Locais de clivagem previstos para corte pela Cas9 complexada com cada um dos sgRNAs utilizados.....	35
Figura 4	– Corrida eletroforética dos produtos de clivagem da nuclease Cas9 complexada com cada um dos sgRNAs empregados	36
Figura 5	A e B) Colônias obtidas a partir de células MDBK transfectadas com 1µg do plasmídeo px459 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.....	38
Figura 6	Corrida eletroforética em gel de agarose 2% de produtos de PCR convencional, indicando a presença do gene da Cas9 na linhagem de células MDBK-Cas9 produzida.....	39
Figura 7	A) Proporção de edição segundo análise pelo algoritmo Tide; B) Eletroferograma controle ; e C) Eletroferograma demonstrando sítio de clivagem e presença de ruído referente às sequências editadas em células MDBK-Cas9 transfectadas apenas com o sgRNA PRLR 3. Sequências complementares ao sgRNA em azul. Seta vermelha indicando sítio de clivagem esperado.....	43
Figura 8	Distribuição de sequências detectadas indicando uma proporção total de 48%, sendo a maioria (35,5%) das células mutantes apresentando a deleção de um nucleotídeo.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Resumo das modificações genéticas implementadas em animais de grande porte de interesse pecuário.....	1
Tabela 2	– Informações principais sobre as técnicas de edição gênica NDZ; TALENs e CRISPR-Cas9.....	4
Tabela 3	– Correspondência entre resíduos de aminoácidos 12 e 13 nos motivos TALE e nucleotídeos.....	7
Tabela 4	– Esquema do funcionamento biológico do sistema CRISPR-Cas9.....	9
Tabela 5	Esquema para condução de experimento com o sistema CRISPR-Cas9.....	11
Tabela 6	Primers para as reações de PCR no <i>locus</i> analisado do exon 2 do gene da beta-lactoglobulina ou do receptor de prolactina.....	28
Tabela 7	Primers utilizados para a amplificação da sequência codificante da eGFP.....	30
Tabela 8	Primers utilizados para a amplificação e detecção do gene da Cas9..	32
Tabela 9	Desenho dos oligonucleotídeos para síntese dos sgRNAs.....	33
Tabela10	Proporção de células editadas em cada uma das linhagens celulares para cada sgRNA e resumo dos experimentos.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GM - Geneticamente Modificado

DNA - Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Desoxirribonucleic acid*

RNA - Ácido Ribonucleico, 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 inter espaçadas 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

SUMÁRIO

1.0 Introdução	1
1.1 Edição Genômica	4
1.1.1 Nucleases Dedos de Zinco	6
1.1.2 TALENs	7
1.1.3 O Sistema CRISPR-Cas9	9
1.1.3.1 Funcionamento Biológico do Sistema CRISPR-Cas9	9
1.1.3.2 Aspectos Práticos da Edição Gênica com o Sistema CRISPR-Cas9	11
1.1.4 Estado da Arte da Edição Gênica com o Sistema CRISPR-Cas9	14
1.1.5 Eficiência da Edição Gênica com o Sistema CRISPR- Cas9	18
1.1.5.1 Eficiência dos sgRNAs	19
1.1.5.2 Modelos de Teste de sgRNAs	21
1.1.5.3 Produção de Células Expressando a nuclease Cas9 Constitutivamente	23
2.0 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos Específicos	24
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Desenho de RNAs Guia para o Sistema CRISPR-Cas9	25
3.2 Obtenção dos RNAs Guia para o Sistema CRISPR-Cas9	25
3.3 Caracterização dos RNAs Guia por Eletroforese	26
3.4 Avaliação in vitro da atividade dos RNAs Guia	26
3.5 Cultura de Células	27
3.6 Produção e Cultura de Embriões	27
3.7 Transfecção dos Componentes do Sistema CRISPR-Cas9 ou sgRNAs nas linhagens celulares	27
3.8 Microinjeção de Zigotos com os RNAs do Sistema CRISPR-Cas9	28
3.9 Sincronização de Receptoras e Transferência de Embriões	28
3.10 Reações de PCR e Sequenciamento e Detecção de Mutações no Alvo de Edição Gênica	29
3.11 Produção do mRNA da eGFP e Transfecção	31
3.12 Produção de Células Expressando Cas9 de Maneira Estável	33
3.13 Detecção do Gene da Nuclease Cas9 por PCR convencional e qPCR	34
4.0 RESULTADOS	35
4.1 Produção e Caracterização Eletroforética dos RNAs Guia e Avaliação da Atividade in vitro	35
4.2 Determinação da Capacidade de Produção de eGFP a	39

partir da transfecção do mRNA eGFP	
4.3 Produção e Avaliação da Atividade de Linhagem de Células Expressando Estavelmente a Proteína Cas9	39
4.4 Análise da Proporção de Células MDBK e MDBK-Cas9 Editadas	42
4.5 Detecção da Edição Gênica em Embriões Produzidos após Microinjeção do Sistema CRISPR-Cas9	44
5.0 DISCUSSÃO e CONCLUSÃO	47
REFERENCIAS	50
Anexo I – Produção de eGFP (Artigo publicado)	80
Anexo II – Artigo publicado por orientados	81

1 INTRODUÇÃO

A implementação das técnicas de modificação genética em animais surgiu em 1980 e 1981 com as pesquisas de Gordon e Ruddle, que resultaram na produção de embriões murinos geneticamente modificados (GMs). Foi, portanto, comprovado que a estratégia de microinjeção de DNA pronuclear na etapa do pronúcleo viabilizava a integração estável de construções de DNA no genoma (GORDON, J W; RUDDLE, 1981). Nesse mesmo período, essa tecnologia habilitou a fabricação de animais geneticamente modificados (AGMs) com deleções e inserções de genes de interesse, buscando criar animais-modelo para estudos (J. M. ADAMS; A. W. HARRIS, C. A. PINKERT, L. M. CORCORAN, W. S. ALEXANDER, S. CORY, R. D. PALMITER, 1985; Beardmore, 1997). Embora a eficiência dessa técnica seja baixa, as sequências adicionadas eram herdadas pela prole dos animais produzidos seguindo padrões mendelianos.

Atualmente, o objetivo da tecnologia transgênica aplicada a animais é produzir organismos que permitam: 1) modelar a patogênese e comportamento de doenças de interesse (HUTCHINSON; MULLER, 2000; PINNAPUREDDY et al., 2015), especialmente de doenças complexas, como as neurológicas (YANG et al., 2021); 2) investigar eventos celulares e moleculares (ex.: regulação gênica; vias biossintéticas) (SCHEENEN et al., 2009); 3) aumentar a produtividade de animais de relevância pecuária (LIEVENS et al., 2015a; WANG, H. et al., 2020) e detectar alterações ambientais (ALMEIDA et al., 2014); 5) produção de órgãos para transplante humano (MOHIUDDIN et al., 2014; REARDON, 2015); 6) fabricar proteínas recombinantes de alta qualidade para uso biotecnológico e medicinal (MOURA et al., 2013; QIAN et al., 2015).

Nesse contexto, os animais de produção se destacam, uma vez que as modificações genéticas neles são de grande valor tanto na esfera pecuária quanto na científica. No tocante ao impacto econômico, várias características puderam ser modificadas em animais de grande porte para incrementar sua produtividade ou minimizar perdas inerentes ao processo de produção, como resumido na Tabela 1 e extensivamente revisado por Lievens et al. (LIEVENS et al., 2015b).

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 <i>et al.</i> , 1998; TONG <i>et al.</i> , 2011; WHEELER; BLECK; DONOVAN, 2001)
Resistência a Doenças	Ovelhas, Galinhas, Bovinos	SP110	(DENNING <i>et al.</i> , 2001; LYALL <i>et al.</i> , 2011; RICHT <i>et al.</i> , 2007; WU <i>et al.</i> , 2015)
Aumento da Taxa de Crescimento	Salmão, Suínos	Hormônio do Crescimento	(Saunders, Fletcher and Hew, 1998; Devlin <i>et al.</i> , 2009; Proudfoot <i>et al.</i> , 2015)
Melhora na Carne	Suínos	Fat-1	(LAI <i>et al.</i> , 2006)
Alteração na Composição do Leite	Bovinos	Fat-1	(WU <i>et al.</i> , 2012)
Aumento na Produção de Lã	Ovelhas	IGF-1	(DAMAK <i>et al.</i> , 1996)
Melhora no Manejo (Descorna Genética)	Bovinos	POLLED	(Carlson <i>et al.</i> , 2016)

Dentre os animais geneticamente modificados (AGMs) citados anteriormente, o salmão, comercializado sob a marca AquaAdvantage®, recebeu grande destaque em 2015 ao ser aprovado para consumo humano, sendo assim o primeiro AGM a obter tal reconhecimento pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos (LEDFORD, 2015). É importante salientar que os requisitos regulatórios para que o animal fosse comercializado como alimento se estenderam por duas décadas, evidenciando a complexidade do processo de aprovação da técnica para esse fim (LEDFORD, 2013). Não obstante, o forte apelo econômico da pecuária impulsiona a melhoria dos animais de produção por meio de diversas técnicas que serão elucidadas aqui.

Além do interesse em aumentar a produção, animais de grande porte também foram vistos como potenciais modelos para doenças humanas. A utilização desses animais para tal finalidade oferece a possibilidade de estudar disfunções para as quais os modelos em pequenos animais não são satisfatórios (ROGERS, 2016; WHITELAW et al., 2016).

Diante da importância das modificações genéticas em animais, é imperativo aprimorar o conjunto de ferramentas biotecnológicas utilizadas para sua produção. Nesse contexto, a ascensão da edição genômica, especialmente a redução na complexidade da aplicação dessas técnicas, tem se revelado extremamente valiosa.

Além disso, análises de impacto relacionadas à liberação regulatória de animais geneticamente modificados demonstraram efeitos econômicos significativos decorrentes do atraso na regulamentação e permissão para comercialização desses animais. O impacto da não comercialização de três tipos de AGMs - gado resistente à mastite, porcos com alterações no sistema reprodutivo e resistência a vírus respiratório e o salmão AquaAdvantage - foi analisado, revelando perdas na ordem de bilhões de dólares anualmente devido a atrasos de 5 e 10 anos nas aprovações (VAN EENENNAAM et al., 2021). Tal impacto ressalta a necessidade de um conhecimento mais profundo sobre os mecanismos pelos quais as modificações genéticas em animais ocorrem, bem como seus impactos, além de determinar formas de avaliar e rastrear os AGMs (LIEVENS et al., 2015c). Portanto, esforços para modelar e aprimorar a produção de AGMs são relevantes tanto para a literatura científica quanto para o avanço da pecuária com esses animais.

1.1. EDIÇÃO GENÔMICA

O termo "edição genômica" (EG) foi estabelecido para designar as técnicas que permitem a realização de quebras cromossômicas com inserções ou deleções em regiões predefinidas de genomas selecionados com precisão relativa. Quanto ao mecanismo básico, as tecnologias de EG a serem detalhadas aqui operam com base no princípio de que deve ocorrer a quebra de dupla fita (QDF) do segmento de DNA, seguida pela reparação por junção de extremidades não homólogas (JENH) (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013; KHALIL, 2020) iniciada pela própria célula ou induzida (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016).

O funcionamento dos sistemas de edição genômica está vinculado a dois requisitos básicos: 1) habilidade para reconhecer uma sequência alvo no genoma e 2) capacidade para clivar o DNA no local reconhecido (CHANDRASEGARAN; CARROLL, 2016). Na prática, a edição genômica necessita de uma nuclease acoplada a uma macromolécula capaz de reconhecer nucleotídeos, ou seja, um domínio de ligação ao DNA. Além disso, é essencial que a parte do sistema que reconhece a sequência consiga ligar-se a um trecho longo o suficiente para ter ocorrência única em um genoma eucariótico.

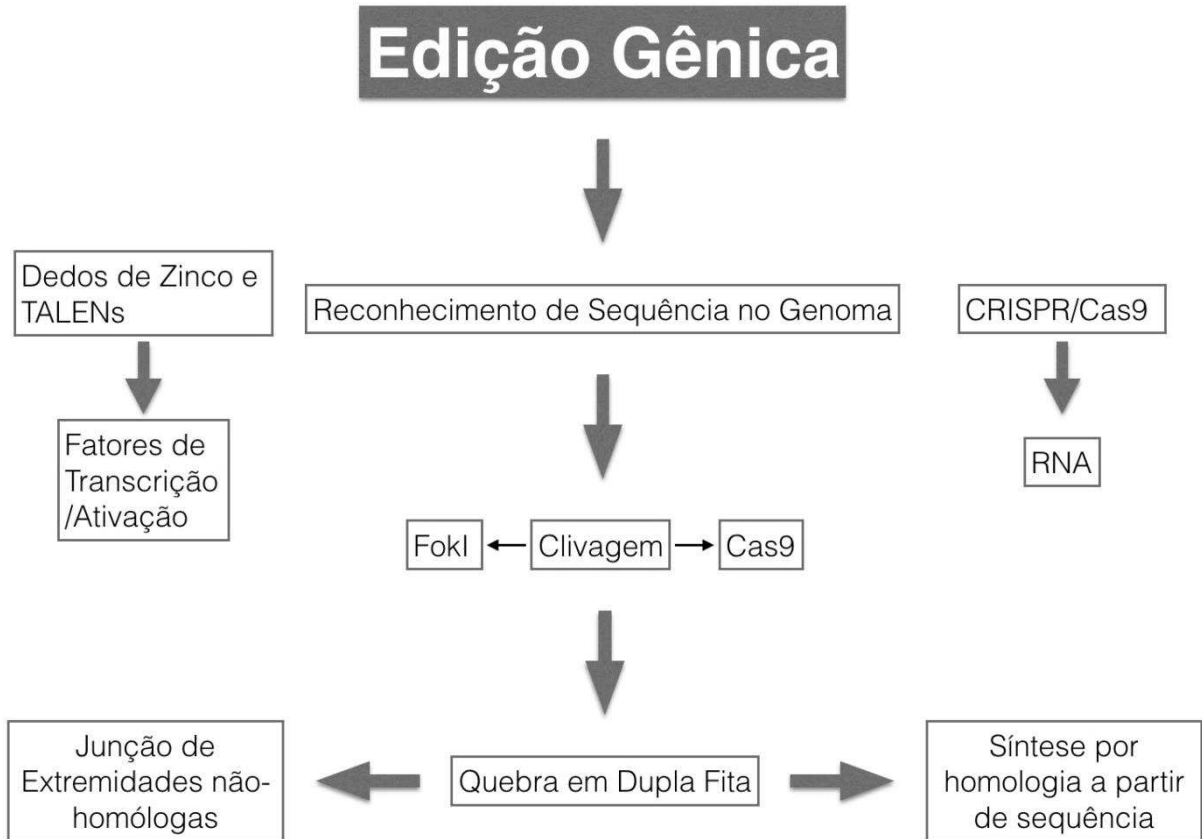
Vários sistemas foram desenvolvidos com o objetivo de possibilitar a edição genômica e eles diferem consideravelmente tanto na capacidade de clivar o DNA quanto na especificidade com que essa quebra ocorre (CHANDRASEGARAN; CARROLL, 2016). Abordaremos a seguir os aspectos técnicos e biológicos dos sistemas conhecidos como: Nucleases de 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 fundamentais 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 efectoras semelhantes a fatores de ativação	FokI	Natureza proteica, capaz de reconhecer entre 14 e 20bp por monômero da proteína	2010	(CHRISTIAN <i>et al.</i> , 2010)
CRISPR/Cas	Cas9	Polímero de nucleotídeos, capaz de reconhecer por pareamento 22bp	2012	(JINEK <i>et al.</i> , 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 NDZ foi desenvolvido a partir do trabalho de Klug et al. (1985), onde foram descritos fatores de transcrição de *Xenopus laevis* com um átomo de zinco integrado na estrutura proteica do domínio de ligação ao DNA (MILLER; MCLACHLAN; KLUG, 1985). Os domínios contendo zinco são muito prevalentes em eucariotos (CHANDRASEGARAN; CARROLL, 2016). Mais tarde, a estrutura cristalográfica destes fatores de transcrição foi obtida em camundongos, proporcionando um entendimento mais aprofundado de sua interação com o DNA (PAVLETICH; PABO, 1991). Em geral, cada dedo de zinco (DZ) interage com uma sequência específica no DNA. A estrutura descrita consiste de aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos, com pares de histidina e cisteína sendo invariantes. Os

resíduos de aminoácidos de cada DZ ligam-se a um átomo de zinco por meio de complexação (PAVLETICH; PABO, 1991).

Posteriormente, houve extensivos estudos nos quais DZ interagiram com cada triplete de nucleotídeos na sequência de DNA (KLUG, A; CHOO, 1994a, 1994b; LIU; XIA; CASE, 2002; REBAR; PABO, 1994). Finalmente, em 1996, Chandrasegaran e colaboradores utilizaram o conhecimento acumulado sobre os DZ para propor uma proteína híbrida, unindo a nucleasse FokI aos DZ (KIM; CHA; CHANDRASEGARAN, 1996), surgindo assim as nucleases dedos de zinco (NDZ). Mais tarde, o mesmo grupo mostrou que a fusão das proteínas não causou perda de especificidade ou atividade catalítica (SMITH; BERG; CHANDRASEGARAN, 1999).

Apesar da complexidade do sistema e de sua relativa inespecificidade, quando comparado aos outros sistemas que serão detalhados a seguir, as NDZ marcaram um importante passo para a produção de alterações genéticas direcionadas. Portanto, as NDZ representam a primeira ferramenta que permitiu um estudo mais aprofundado e direto da relação genótipo-fenótipo.

1.1.2. TALENs

A evolução das TALENs começou com a compreensão de proteínas que interagem naturalmente com o DNA durante a transcrição. Neste contexto, as proteínas responsáveis por reconhecer sequências no genoma eram efetores semelhantes a ativadores da transcrição (TALE - Transcription Activator-Like Effector) (CHRISTIAN et al., 2010). Em 2009, estudos se concentraram em proteínas secretadas por bactérias do gênero *Xanthomonas* que eram capazes de se ligar ao genoma do hospedeiro e desencadear a transcrição (BOCH et al., 2009; MOSCOU; BOGDANOVE, 2009). A descoberta dos efetores TALEs simbolizou, antes de se tornarem uma ferramenta de edição gênica, um novo método de reconhecimento de sequências de DNA por proteínas (MOSCOU; BOGDANOVE, 2009).

Em contraste com os DZ, descobriu-se que cada motivo TALE é capaz de reconhecer um único nucleotídeo com alta especificidade. Além disso, a presença de motivos vizinhos não impactava na habilidade de se ligar ao DNA. Cada domínio TALE é composto por 33 a 35 resíduos de aminoácidos altamente conservados. Os resíduos de aminoácidos localizados nas posições 12 e 13 de cada sequência, chamados de di-resíduos variáveis da repetição (DVRs), são os que conferem a

especificidade por cada nucleotídeo único. A Tabela 3 resume 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, o grupo de Doudna e colaboradores apresentou o sistema de edição genética CRISPR-Cas9, que, diferentemente dos sistemas previamente discutidos, realiza o reconhecimento da sequência alvo por meio do pareamento entre um oligorribonucleotídeo e o DNA do genoma de interesse (JINEK et al., 2012), previsão já realizada por Watson e Crick. Os estudos desenvolvidos por

Doudna e aqueles que os precederam permitiram uma mudança paradigmática na edição genômica, pois a interação RNA-DNA passou a ser o requisito para o direcionamento da QDF.

Apesar dos avanços recentes na compreensão das limitações do sistema CRISPR-Cas9 em relação às quebras inespecíficas (ZHANG et al., 2015), essa ferramenta é considerada de grande interesse, pois simplificou notavelmente os experimentos de edição genética (CHANDRASEGARAN; CARROLL, 2016; GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013). Mais recentemente, foram realizados avanços para tornar a técnica menos inespecífica através de modificações na nuclease, que serão apresentadas a seguir (KLEINSTIVER et al., 2016).

1.1.3.1. Funcionamento Biológico do Sistema CRISPR-Cas9

O sistema que combina a nuclease 9 (Cas9) com as Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (do inglês CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; e Cas9 - CRISPR-associated protein 9), usado como instrumento biotecnológico, foi derivado do entendimento fundamental sobre a imunidade adaptativa em bactérias (SANDER; JOUNG, 2014).

Os sistemas CRISPR do tipo II são elementos cruciais da imunidade adaptativa de bactérias, que respondem intracelularmente a elementos de material genético exógeno, como os encontrados em plasmídeos e vírus (BARRANGOU et al., 2007). O primeiro locus contendo CRISPR foi identificado inicialmente em *Escherichia coli*, embora naquele momento ainda não estivesse associado à função que atualmente exploramos (ISHINO et al., 1987). Entretanto, foi apenas em 2005 que esses loci começaram a ser descritos como originários de material genético exógeno (BOLOTIN, A; QUINQUIS, B; SOROKIN, A; EHRLICH, 2005; MOJICA et al., 2005; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005). Sequências CRISPR foram encontradas em 84% das arqueas e 45% das espécies do domínio bactéria (GRISSA; VERGNAUD; POURCEL, 2007).

A partir de então, começou a ser elucidado 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

opera em três estágios para fornecer 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
<p>DNA exógeno é processado e fragmentos, denominados protoespaçadores, são incorporados ao locus CRISPR do hospedeiro. Esses fragmentos ficam como espaçadores entre as repetições de onde são derivados os RNA-CRISPR (crRNA)</p>	<p>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</p>	<p>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</p>

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. Aspectos Práticos da Edição Gênica com o Sistema CRISPR-Cas9

Em 2012, a equipe de Charpentier e Doudna demonstrou a possibilidade de direcionar a clivagem pela Cas9 em genomas específicos usando apenas uma nuclease guiada por um único segmento de RNA, que passou a ser chamado de RNA guia (sgRNA) (JINEK et al., 2012). Desde então, várias melhorias foram implementadas no sistema, proporcionando a facilidade de uso a que a literatura atualmente se refere (WANG; LA RUSSA; QI, 2016). Logo após os 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 aqui apresentados, a dinâmica da modificação genética feita com o sistema CRISPR-Cas9 se baseia nos seguintes passos: 1) identificação do locus pelo sgRNA, direcionando a nuclease Cas9; 2) quebra feita pela enzima; 3) reparo do trecho clivado. O reparo que ocorre em células eucarióticas após essa clivagem é do tipo Junção de Extremidades Não-Homólogas (JENH), que introduz erros e, portanto, interfere no transcrito obtido a partir daquela região e, potencialmente, no produto proteico. Alternativamente, o reparo pode ocorrer por homologia, considerando, para fins de edição gênica, 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 usando este sistema variam significativamente 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. Recentemente a utilização da proteína Cas9 tem sido a alternativa mais utilizada.
3	Transfecção dos construtos de DNA ou co-transfecção de sgRNA e mRNA ou microinjeção desses elementos em embriões	Atualmente, complexos Cas9-sgRNA, utilizando a proteína Cas9 e o sgRNA previamente sintetizados são preferíveis para aumentar a eficiência.
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 observado, a edição genética com o sistema CRISPR-Cas9 é de aplicação relativamente fácil, o que permite seu uso para uma ampla gama de propósitos. Desde sua introdução, tem sido de grande importância na determinação da função de vários elementos genômicos.

A principal diferença entre o sistema CRISPR-Cas9 e seus predecessores, TALENs e ZFNs, reside na facilidade de desenho de experimentos. No entanto, é importante lembrar que a capacidade de edição de todos é comparável, conforme relatado em experimentos recentes (HE et al., 2016), e ainda existe o problema das modificações fora do alvo (ZHANG et al., 2015).

A produção de embriões geneticamente modificados continua a ser uma ferramenta de grande valor para várias finalidades, desde aplicações importantes para a elucidação de mecanismos biológicos, no contexto da ciência básica, até a produção de animais geneticamente modificados para pecuária e produção de proteínas recombinantes (LIEVENS et al., 2015c).

Neste trabalho, o objetivo é produzir animais geneticamente modificados em um locus de grande interesse para a indústria de laticínios. Apesar do foco deste trabalho ser em animais de produção, os avanços biotecnológicos a serem alcançados ajudarão no entendimento da modificação genética de animais.

A grande maioria dos animais transgênicos e geneticamente modificados produzidos e já relatados na literatura provêm da microinjeção de construtos de DNA e da transferência nuclear de células cultivadas que foram previamente modificadas geneticamente (KUES; NIEMANN, 2011; MAKSIMENKO et al., 2013). Durante muitos anos, estas técnicas foram as únicas disponíveis para a transgenia animal. A introdução das ZFNs foi vista como um marco importante para a produção de animais geneticamente modificados (SWARTHOUT; RAISINGHANI; CUI, 2011), no

entanto, devido às dificuldades da técnica, na maioria dos casos, os animais continuaram a ser produzidos pelas técnicas clássicas.

A introdução das TALENs na biotecnologia também permitiu um aumento significativo na produção de animais geneticamente modificados (LOTTI et al., 2017). Isso tem sido de grande relevância na produção de animais de produção geneticamente modificados (CARLSON et al., 2012, 2016; PROUDFOOT et al., 2015b) pelo grupo de Fahrenkrug e colaboradores.

Da mesma forma que para outras aplicações de edição genética, a transgenia e modificação genética em animais foi grandemente facilitada pelo sistema CRISPR-Cas9. Desde sua disponibilização em 2012, vários trabalhos já relataram a produção de animais geneticamente modificados (FUJIHARA; IKAWA, 2014; HIROSE et al., 2017; HWANG et al., 2013; IRION; KRAUSS; NUSSLEIN-VOLHARD, 2014; JIN; LI, 2016; NAKAGAWA et al., 2015).

1.1.4. Estado da Arte da Edição Gênica com o Sistema CRISPR-Cas9

O sistema CRISPR-Cas9 expandiu de forma significativa as possibilidades de modificações genômicas em células eucarióticas. Este mecanismo, que pode ser entendido como um conjunto de nucleases bacterianas programáveis, é capaz de promover alterações genéticas em qualquer região do DNA. Esta capacidade tem permitido avanços significativos no conhecimento do funcionamento da genética molecular e suas implicações (ANZALONE; KOBLAN; LIU, 2020). Embora o princípio básico da edição genômica tenha permanecido o mesmo, conforme descrito anteriormente neste documento, é crucial destacar que houve progressos notáveis nos aspectos práticos da utilização do sistema. Estes avanços contribuíram de forma positiva para a eficácia e praticidade da técnica. Em especial, a introdução de novas nucleases e modificações nas nucleases existentes aumentou consideravelmente a versatilidade da técnica (ANZALONE; KOBLAN; LIU, 2020). Ademais, foram incorporadas ferramentas derivadas do sistema original que possibilitam a edição direcionada para RNA, regulação da transcrição, epigenética e detecção de ácidos nucleicos (ANZALONE; KOBLAN; LIU, 2020; DOMINGUEZ; LIM; QI, 2016; SCOTT et al., 2019; SUN; CHEN; GAO, 2021; THAKORE et al., 2016).

As duas principais preocupações ao projetar experimentos e terapias que utilizam a edição genômica são o tipo de modificação na sequência que o sistema

de edição pode realizar e a capacidade do complexo de se ligar ao alvo genômico. As modificações geralmente incluem: 1) mutações pontuais (conversões), 2) deleções, 3) inserções e 4) combinação de múltiplos tipos de modificações (ANZALONE; KOBLAN; LIU, 2020; SANDER; JOUNG, 2014; SUN; CHEN; GAO, 2021). Já a capacidade de ligação do sistema ao alvo molecular depende dos requisitos da enzima nuclease específica. A nuclease Cas de organismos diferentes possui sequências proto-espaçadoras (PAM) distintas, permitindo que a clivagem ocorra em sequências específicas do genoma (HILLE et al., 2018). As nucleases Cas naturais permitem uma variedade considerável de sequências PAM, e as enzimas geneticamente modificadas expandem ainda mais essa gama de sequências alvo (ANZALONE; KOBLAN; LIU, 2020; HILLE et al., 2018). Por fim, a atividade enzimática e a capacidade de ligação à região genômica influenciam de forma relevante a eficiência da edição gênica, aspecto que será discutido na seção 1.1.5.

Os sistemas CRISPR-Cas presentes naturalmente em bactérias se dividem em duas classes: a classe 1, que usa um sistema multiprotéico, e a classe 2, que possui uma única proteína efetora para o corte do DNA. Devido à simplicidade de precisar apenas de uma proteína, os sistemas de classe 2 são mais vantajosos em termos práticos. Além disso, os sistemas CRISPR-Cas9 de classe dois se subdividem em três tipos principais: 1) tipo II, com as variantes Cas9, 2) tipo V, com variantes Cas12 e 3) tipo VI, com variantes Cas13, que possuem atividade de clivagem em moléculas de RNA (MAKAROVA et al., 2020). Os sistemas tipo VI ganharam especial relevância para identificação e modificação no transcriptoma, além de interação com vírus de RNA (NAKAGAWA et al., 2022). Considerando a relevância dos sistemas CRISPR-Cas de tipos II e V, que promovem quebras no DNA direcionadas por RNA para este trabalho, discutiremos a seguir os aspectos técnicos e as diferenças entre as nucleases Cas9 e Cas12.

As enzimas do tipo II do sistema CRISPR, conhecidas como Cas9, são nucleases orientadas por RNAs que promovem quebras de dupla fita no DNA alvo. Esses sistemas são guiados por RNAs CRISPR (CrRNAs), que se pareiam com os RNAs ativados trans-acting (TracrRNAs), formando o complexo que se liga ao DNA e o corta (DELTCHEVA et al., 2011). As Cas9 realizam um corte impreciso na fita de DNA, geralmente 3 pares de bases acima da sequência PAM. O reconhecimento do alvo pela Cas9 começa com a ligação da sequência PAM, seguida pelo

desenrolamento da dupla fita de DNA e a formação de um heteroduplex entre o RNA e o DNA (DELTCHEVA et al., 2011; JIANG; DOUDNA, 2017; SCHMID-BURGK et al., 2020a, 2020b). À medida que a fita não-alvo de DNA é deslocada, forma-se uma alça em R que expõe o DNA alvo e facilita a ligação das proteínas. A própria formação da alça estimula as mudanças conformacionais que ativam o domínio nuclease. A falta de pareamento entre o RNA guia e o DNA impede as mudanças conformacionais, diminuindo a probabilidade de corte. Portanto, sequências altamente complementares favorecem a atividade de clivagem (JIANG et al., 2016; JINEK et al., 2014). Ao projetar novas nucleases para aplicações biotecnológicas, mutações que inibem as transições conformacionais permitem aumentar a especificidade do sistema. Por outro lado, a inativação, através de mutações, do domínio nuclease HNH ou RuvC, possibilitou a criação das nickases, enzimas que clivam apenas uma das fitas de DNA (NISHIMASU et al., 2014). Ao inativar ambos os domínios nuclease, obtêm-se as Cas9 sem atividade catalítica, Cas9 inativas (dCas9, do inglês Dead Cas9) (GAUDELLI et al., 2017; NISHIMASU et al., 2014; STERNBERG et al., 2015).

Considerando a atividade catalítica e a dinâmica de ligação das proteínas Cas9, é importante enfatizar que a ligação do complexo ao DNA alvo, bem como a promoção da clivagem e o desligamento do complexo são processos cruciais para a compreensão da eficiência da edição genômica e para a otimização desses processos (BODAI et al., 2022; LIU et al., 2016; WEN; ZHANG, 2022).

Além das modificações relacionadas com a atividade catalítica da enzima, o uso de Cas9 de diferentes organismos permite diversificar a sequência PAM que pode ser alvo na edição gênica. Além das Cas9 mais usadas, derivadas de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), diversas outras espécies são muito úteis, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus thermophilus*, *Neisseria meningitidis* e *Campylobacter jejuni* (ANZALONE; KOBLAN; LIU, 2020; CHATTERJEE; JAKIMO; JACOBSON, 2018; HOU et al., 2013; MÜLLER et al., 2016).

As nucleases Cas12, por sua vez, são variantes dos sistemas CRISPR do tipo V. Estas proteínas têm naturalmente apenas um domínio nuclease tipo RuvC e este domínio é capaz de realizar a clivagem do DNA em ambas as fitas. As nucleases deste tipo realizam clivagens com pontas coesivas na região do protoespaçador que é distal à sequência PAM. Estas nucleases têm a capacidade de utilizar um único crRNA a partir de um grupo de RNAs, uma vez que possuem um domínio RNase.

Suas regiões PAM são geralmente ricas em T, o que as distingue bastante das Cas9. Há variantes da Cas12 capazes de realizar a clivagem do DNA de várias maneiras diferentes, conferindo grande versatilidade aos sistemas CRISPR-Cas12 (STRECKER et al., 2019; ZETSCHE et al., 2015, 2017).

Com base no conhecimento adquirido das variantes naturais das nucleases associadas ao sistema CRISPR, várias variantes geneticamente modificadas têm sido produzidas (ANZALONE; KOBLAN; LIU, 2020; CEBRIAN-SERRANO; DAVIES, 2017). Em geral, os sistemas CRISPR são igualmente versáteis e úteis para vários tipos de experimentos e técnicas de produção de organismos geneticamente modificados. No entanto, a sequência PAM continua sendo uma limitação ao mirar sequências muito específicas do genoma, pois é necessário que os nucleotídeos complementares ao PAM estejam adjacentes à região de interesse (CEBRIAN-SERRANO; DAVIES, 2017). O grupo de Anzalone e colaboradores apresenta em sua revisão as variações mais importantes da proteína Cas9 em relação à introdução de diferentes sequências PAM (ANZALONE; KOBLAN; LIU, 2020). No entanto, é importante notar que, do ponto de vista prático, o uso de nucleases modificadas ainda é limitado devido à disponibilidade comercial dessas enzimas na forma de proteínas. A maioria delas pode ser encontrada comercialmente na forma de plasmídeos, no entanto, como será discutido mais adiante, a eficiência da edição genômica em experimentos com o sistema CRISPR-Cas9 pode mudar drasticamente quando a nuclease é expressa a partir de construtos de DNA (CHEN; ALPHONSE; LIU, 2020; HOSHIJIMA et al., 2019; KIM et al., 2014a, 2014b; LIANG et al., 2015; VAKULSKAS et al., 2018). Além disso, o uso de construtos de DNA também pode estar associado a um aumento nas modificações genéticas off-target (KIM et al., 2014b; LIANG et al., 2015), o que também deve ser levado em consideração em experimentos com nucleases modificadas. De qualquer forma, a disponibilidade de nucleases visando diferentes PAMs é relevante para permitir a pesquisa e a produção de organismos geneticamente modificados em uma variedade maior de locais do genoma (YU et al., 2016).

A diversificação das possibilidades de alvos na edição genética e o aumento da eficácia são objetivos importantes da pesquisa básica com o sistema CRISPR-Cas9. Além disso, atualmente, no caso da produção de animais geneticamente modificados e terapia genética, há também um grande interesse em possibilitar a edição *in vivo*, o que traz alterações consideráveis em relação à eficiência e aos

mecanismos. Este tipo de método não será abordado aqui, pois não é o tema deste trabalho, mas foi amplamente discutido na literatura citada a seguir (GILLMORE et al., 2021; RAMIREZ-PHILLIPS; LIU, 2021; ZHAO et al., 2021).

1.1.5. Eficiência da Edição Gênica com o Sistema CRISPR-Cas9

Ao projetar experimentos com o sistema CRISPR-Cas9, uma das preocupações preponderantes é a eficiência da edição genética, que se refere à proporção de células ou animais geneticamente modificados obtidos. A previsão da eficiência emerge como um acréscimo às restrições para a aplicação do sistema, uma vez que está intrinsecamente vinculada à sequência do genoma-alvo que será submetida à edição. É reconhecido que a sequência alvo está diretamente relacionada à eficiência da edição (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; KONSTANTAKOS et al., 2022).

1.1.5.1. Eficiência dos sgRNAs

O projeto de sgRNAs constitui um passo crucial para o uso do sistema CRISPR-Cas9, que envolve a identificação de sequências de DNA que permitam: 1) uma cisão eficaz; 2) proximidade ao gene ou região de interesse; 3) mínima homologia com sequências off-target (KONSTANTAKOS et al., 2022). A previsão da eficiência de sgRNAs é realizada inicialmente por meio de algoritmos que auxiliam no projeto e previsão da eficácia da sequência. Esses algoritmos dividem-se em 3 categorias principais: 1) baseados em alinhamento, que utilizam o alinhamento dos sgRNAs com a sequência alvo, simplesmente identificando sequências possíveis adjacentes a PAMs no trecho selecionado; 2) direcionados por hipóteses, que empregam dados empíricos prévios para prever a atividade; 3) baseados em aprendizado, que utilizam um sistema de pontuação para sgRNAs anteriormente utilizados levando em consideração resultados experimentais (CHUAI; WANG; LIU, 2017; LIU; ZHANG; ZHANG, 2020; WANG, J. et al., 2020). Os métodos baseados em aprendizado, em princípio, combinam os outros dois modelos (JAVAID; CHOI, 2021; WANG, J. et al., 2020). Existem três fatores principais envolvidos na determinação da eficiência prevista de sgRNAs: 1) sequência; 2) estrutura; e 3) epigenética. No que tange à sequência, a primeira restrição utilizada é o PAM, de

forma que os algoritmos buscam sequências que estejam seguidas do PAM, sendo, conforme já mencionado, essa sequência dependente do tipo de nuclease utilizada. Mesmo um único nucleotídeo não pareado no PAM pode reduzir consideravelmente a eficiência do RNA guia (DOENCH *et al.*, 2016a). No caso de experimentos que utilizam RNA guia expresso em um vetor de DNA, algumas sequências, como repetições de guanina (G) ou de uracila (U), podem interferir na síntese pela RNA polimerase (WONG; LIU; WANG, 2015). Além disso, os nucleotídeos da sequência do sgRNA que estão mais próximos do PAM são mais relevantes em termos de emparelhamento, sendo cruciais para a eficiência da edição (STERNBERG *et al.*, 2014; WONG; LIU; WANG, 2015). Na posição 20, a mais próxima do PAM, guanina e adenina são preferidas em relação a citosina e timina, indicando preferência por purinas; o que também ocorre na posição 19. Isso acontece, provavelmente por restrições conformacionais. As posições 16, 17 e 18 também têm particularidades muito importantes em relação à atividade do guia em função do nucleotídeo presente (STERNBERG *et al.*, 2014; WANG, J. *et al.*, 2020; WONG; LIU; WANG, 2015). Além da sequência, que influencia diretamente o pareamento, a estrutura tridimensional (secundária) do RNA também é de grande relevância para determinar a atividade de edição. A estrutura secundária do RNA determina o acesso do sgRNA ao locus onde deve parrear para determinar a atividade da nuclease (WANG, J. *et al.*, 2020; WONG; LIU; WANG, 2015). Os requisitos que determinam a dobra adequada do sgRNA estão determinados, sobretudo, pelas posições de 18 a 20 e 51 a 53 (NISHIMASU *et al.*, 2014; WANG, J. *et al.*, 2020; WONG; LIU; WANG, 2015). Além da determinação da estrutura secundária, a estabilidade do RNA também é relevante, pois permite prever a quantidade de moléculas disponíveis para ligação (WANG, J. *et al.*, 2020; WONG; LIU; WANG, 2015).

Ainda no que diz respeito a sequência e estrutura, a estrutura do DNA alvo também pode influenciar consideravelmente no sucesso da ligação do sgRNA e nuclease. Sendo sequências em regiões não codificantes particularmente desafiadoras, uma vez que a organização da cromatina vai interferir, promovendo um impedimento estérico para a ligação do sistema de edição (DOENCH *et al.*, 2016a; JAVAID; CHOI, 2021; PACESA *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2014a; YANG, M. *et al.*, 2018).

É importante também destacar que a estrutura do DNA alvo pode interferir no complexo formado com a Cas9, de maneira a impactar no desligamento da nuclease

do DNA. Como foi explicado anteriormente, a dinâmica da edição gênica necessariamente envolve a ligação do complexo sgRNA e nuclease, seguida da clivagem e desligamento do complexo para que possa ocorrer o reparo. Para que o sistema de reparo tenha acesso ao DNA para a junção de extremidades não homólogas, é necessário que a Cas9 se desligue da cromatina. Também foi demonstrado que a formação das estruturas tridimensionais no estado ligado do complexo RNA-Cas9-DNA sofre influência da sequência do DNA (BRINKMAN et al., 2018; PACESA et al., 2022; XU; DUAN; CHEN, 2017). Estudos mais recentes indicaram que a estrutura formada pela fita não-alvo do sistema CRISPR-Cas9 tem grande influência, pois determinam a estabilidade do complexo e, portanto, o desligamento da nuclease (ALDAG et al., 2021; IVANOV et al., 2020). A compreensão da permanência do complexo ligado ao DNA após a clivagem permite prever também estruturas secundárias do RNA que diminuem essa interação e, portanto, melhorem a eficiência da edição (LIU et al., 2022; RIESENBERG et al., 2022). Essa noção ressalta a importância do RNA e da estrutura secundária em determinar a atividade do sistema CRISPR-Cas9.

1.1.5.2. Modelos de Teste de sgRNAs

É inegável que o desenho dos sgRNAs desempenha um papel crucial na determinação da eficiência da edição genômica, com relevância tanto para a estrutura quanto para a estabilidade desses guias de RNA (JAVAID; CHOI, 2021). No entanto, apesar dos esforços para prever a eficiência da edição genômica com base na sequência do sgRNA, existem outros fatores que não podem ser previstos e que são devidos à biologia da célula alvo, não ao próprio RNA. Entre esses fatores, vale destacar: 1) a capacidade da célula de promover a reparação por junção de extremidades não homólogas; 2) a dinâmica da degradação do RNA; 3) a capacidade mitótica da célula; e 4) variações estruturais e epigenéticas do genoma (DOENCH et al., 2016a; JAVAID; CHOI, 2021; LIU et al., 2022; WONG; LIU; WANG, 2015).

Nesse contexto, a eficiência real da edição genômica só pode ser determinada no próprio sistema biológico em que se deseja promover a alteração genética. Foi notado que a edição genômica ocorre em taxas muito distintas quando utilizadas células diferentes como modelo. A maioria dos primeiros experimentos

com o sistema CRISPR-Cas9 determinou parâmetros para essa técnica usando células e organismos modelo, como linhagens celulares imortalizadas (AKIDIL et al., 2021; BOCK et al., 2022; CHU et al., 2016; TRAN et al., 2019; WANG et al., 2014b).

A variabilidade nos resultados da edição genômica pode potencialmente impactar a reprodutibilidade dos experimentos e, mais significativamente, a obtenção de resultados em modelos clínicos ou na produção de animais geneticamente modificados (BOCK et al., 2022; TEBOUL et al., 2020).

A disponibilidade de modelos *in vitro* para testar o sistema CRISPR-Cas9 de maneira eficiente e que correspondam ao modelo que se deseja obter é importante (CHAN et al., 2022; DOENCH et al., 2016b; HAHN et al., 2017). No entanto, nem sempre existem modelos de estudo adequados para organismos menos comumente utilizados em pesquisas. Assim, o desenvolvimento de linhagens celulares que expressam a enzima Cas9 de forma constitutiva e possuem genomas de interesse representa um campo de pesquisa importante para o avanço do estudo e aplicação comercial do sistema CRISPR-Cas9 (CHAN et al., 2022; DOENCH et al., 2016b; SUN et al., 2019).

Além das vantagens já mencionadas, o sistema CRISPR-Cas9 ainda permite que a proteína Cas9 seja expressa separadamente do seu sgRNA (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; JIANG; DOUDNA, 2017; JINEK et al., 2014). Isso possibilita o desenvolvimento de linhagens celulares que produzem a nuclease por vários mecanismos, mantendo a atividade com a introdução dos sgRNAs. O presente trabalho demonstra a possibilidade de produção consistente e livre de lentivírus de linhagens celulares com genomas distintos, expressando a nuclease Cas9 de maneira constitutiva.

1.1.5.3. *Produção de células expressando a nuclease Cas9 constitutivamente*

Diversos grupos estabeleceram linhagens celulares expressando a proteína Cas9 de forma estável, bem como protocolos para sua produção (CHAN et al., 2022; LIAO; ZHOU; ZHOU, 2020; YANG, R. et al., 2018). Linhagens celulares com essa característica também estão disponíveis comercialmente. Entretanto, é importante ressaltar, como comentado anteriormente, que tanto os efeitos da edição gênica sobre a fisiologia celular quanto a eficiência da técnica são altamente dependentes no genoma em que se realiza a edição. Dessa forma, linhagens celulares

previamente estabelecidas podem não fornecer modelos ideais da edição gênica. Com isso, a produção simplificada de linhagens celulares com diversos genomas que permitam o teste de guias para edição pode ser de grande interesse.

Particularmente, considerando a dificuldade na edição e obtenção de mutantes de linhagens celulares não-modelo e primárias bem como a produção de edição gênica em zigotos com o objetivo de produzir animais geneticamente modificados, a obtenção de linhagens para teste de guias passa a ser uma alternativa para esse tipo de experimentos.

2. OBJETIVOS

Produzir e avaliar linhagens de células bovina e humana expressando a nuclease Cas9 de maneira constitutiva para modelar a eficiência de edição gênica em genoma bovino e prever a edição de embriões.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar e produzir RNAs guias para a edição do gene da beta-lactoglobulina com o sistema CRISPR-Cas9;
- Otimizar a transfecção e edição gênica em células somáticas bovinas MDBK;
- Produzir células MDBK e HEK-293 expressando a enzima Cas9 de forma constitutiva;
- Analisar as células MDBK transfectadas por amplificação dos *loci*, ensaio de mutação e sequenciamento, para a presença da mutação no gene BLG e PRLR;
- Produzir embriões editados para o gene da beta-lactoglobulina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos desenvolvidos neste estudo serão detalhados a seguir. As etapas executadas incluem: 1) produção do mRNA eGFP para otimização e controle positivo da transfecção nas células-alvo; 2) transfecção e seleção de células que expressam a proteína Cas9 de maneira constitutiva; e 3) demonstração da concepção, na qual as células que expressam a proteína Cas9 serão avaliadas após a transfecção apenas dos sgRNAs. Uma análise comparativa da capacidade de modelar a edição gênica também foi realizada com o sistema CRISPR-Cas9 microinjetado em zigotos bovinos previamente selecionados.

3.1 DESENHO DE RNAS GUIA PARA O SISTEMA CRISPR-CAS9

Os sgRNAs foram projetados com o auxílio de um algoritmo (CCTop, disponível em -- <https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>), para identificar potenciais sítios off-target (fora do alvo). Utilizou-se a sequência do gene da beta-lactoglobulina (BLG), depositada no NCBI (locus X14710), e a sequência do gene do receptor de prolactina (PRLR), depositada como locus AJ966356. Foram selecionadas sequências com o número mínimo de discrepâncias aceitáveis entre cada RNA guia e o DNA alvo, considerando sua posição e distribuição na sequência. Para cada sgRNA, projetou-se um molde de DNA para transcrição in vitro. Cada molde para sgRNA foi composto por 3 partes sequenciais: 1) a sequência do promotor T7 para síntese in vitro; 2) a sequência complementar ao segundo exon do gene da beta-lactoglobulina ou do receptor de prolactina; 3) a sequência estrutural necessária para a associação com a proteína Cas. Esses fragmentos foram amplificados por PCR e usados para a transcrição in vitro dos sgRNA.

3.2 OBTENÇÃO DOS RNAS GUIA PARA O SISTEMA CRISPR-CAS9

As sequências necessárias para a produção dos sgRNAs direcionados ao BLG foram sintetizadas em primers, de modo que as extremidades 3' de cada primer se unissem e, após extensão, produzissem um molde completo com os três requisitos mencionados em 3.1. Os primers foram unidos e estendidos por meio de uma reação de polimerase em cadeia de alta fidelidade (PCR - Polymerase Chain

Reaction, utilizando o sistema Gene Amp High Fidelity PCR - Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante. Os produtos da PCR foram então submetidos a uma reação de transcrição *in vitro* (utilizando o kit Mega Short Script T7 - Ambion) e o RNA obtido foi purificado pelo método fenol/clorofórmio e precipitado com álcool isopropílico. Antes da reação de transcrição *in vitro*, os produtos da PCR foram confirmados quanto ao tamanho correto através de corrida em gel de agarose a 2%. Alternativamente, os sgRNAs direcionados ao gene do receptor de prolactina foram obtidos por síntese química (Synthego, EUA).

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 agarose 2% para corrida eletroforética.

3.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DOS RNAs GUIA

Brevemente, a enzima Cas9 foi utilizada como uma nuclease com o intuito de testar o funcionamento dos sgRNAs produzidos. A clivagem da enzima Cas9 complexada com os sgRNAs foi testada em produtos de PCR produzidos a partir do DNA genômico de células MDBK controle. A reação foi montada como segue: 300 nM de sgRNA; 1 µM da enzima Cas9; e 30 nM do produto de PCR previamente produzido. Foi acrescentado 3 µL do tampão 10x para funcionamento da enzima e a reação foi completada para 30 µL e incubada a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionada proteinase K e, novamente, incubada por 15 minutos. Os produtos de clivagem dessas reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. Reações em que houve clivagem do tamanho esperado considerando-se o alvo de pareamento dos sgRNA foram consideradas como positivas.

3.5 CULTURA DE CÉLULAS

Foram utilizadas as células de linhagem estabelecida Madin-Dabin Bovine Kidney (MDBK – ATCC CCL-22), células modelo bovinas derivadas do epitélio renal bovino e células humanas HEK-293. As células MDBK 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. As células HEK 293, foram cultivadas em condições similares, entretanto com a utilização de meio DMEM, suplementado com 1 mM piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino.

3.6 PRODUÇÃO E CULTURA DE EMBRIÕES

Em resumo, as estruturas utilizadas para as microinjeções e transferências de embriões foram produzidas pela técnica de maturação *in vitro* (MIV); fecundação *in vitro* (FIV); e cultivo *in vitro* (CIV), que serão brevemente descritas abaixo. Todos os meios e soluções utilizadas foram comprados da empresa Bioklone (Brasil).

Para a MIV, obtivemos ovários de vacas oriundas de rebanhos de gado da região de Juiz de Fora e abatidos no matadouro local. Foi realizada a punção de oócitos imaturos que foram, em seguida, 30-40 estruturas foram distribuídas em placas de cultivo com 400 microlitros de meio de maturação e incubadas por 24h em incubadora a 38,5 graus, com 5% de CO₂. A FIV foi realizada com espermatozoides descongelados do banco de sêmen do laboratório de reprodução animal separados com o gradiente percoll. A FIV foi realizada com 2 x 10⁶ espermatozoides por oócito por aproximadamente 22h. As microinjeções foram realizadas após a FIV antes de iniciar o cultivo *in vitro*. O cultivo *in vitro* foi realizado em meio SOF (Bioklone) após desnude das estruturas para retirada das células do cumulus.

3.7 TRANFECCÃO DOS COMPONENTES DO SISTEMA CRISPR-CAS9 OU SGRNA NAS LINHAGENS CELULARES

A transfecção foi realizada seguindo o protocolo do reagente de transfecção Lipofectamine CRISPRMax (Thermo Fisher). Resumidamente, as células de cada linhagem foram plaqueadas em placas de 24 poços no dia anterior a transfecção. Em seguida, foi preparado o complexo de transfecção com ou sem a proteína Cas9 dependendo da linhagem de células utilizada. Os complexos foram preparados com 1250 ng de Cas9 (apenas nas linhagens MDBK e HEK 293) e 240 ng de cada sgRNA (para todas as linhagens). A mistura é incubada por 10 minutos com o reagente de transfecção antes de ser adicionada à cultura de células. Para finalidade de padronização, as células foram plaqueadas para atingir 3 confluências distintas antes da transfecção. Em todos os casos, as células são mantidas em

cultura por 48 horas após a adição do complexo de transfecção. Todas as variações de condições de transfecção foram realizadas em triplicata.

3.8 MICROINJEÇÃO DE ZIGOTOS COM OS RNAs DO SISTEMA CRISPR-CAS9

Com o intuito de realizar uma prova de conceito, determinando a capacidade do sistema de células expressando a Cas9 constitutivamente em modelar a edição gênica em outros sistemas com mesmo genoma, foi realizada a microinjeção do sistema CRISPR-Cas9 com os sgRNAs para o gene da BLG.

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

A partir do estabelecimento do volume da injeção, foi realizada uma bateria de microinjeções de uma solução contendo: 1) 100ng/ μ L do mRNA da Cas9 (GeneArt CRISPR Nuclease mRNA -- Invitrogen); e 2) e 100ng/ μ L do sgRNA E2A. Foram microinjetados aproximadamente 80 estruturas.

3.9 SINCRONIZAÇÃO DE RECEPTORAS E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

No dia 7 após a FIV dos embriões microinjetados, 15 estruturas classificadas como blastocistos expandidos foram envasadas em paletas para transferência no laboratório de reprodução animal, e, em seguida, foram levadas ao campo experimental (Coronel Pacheco) para que fosse realizada a transferência para as receptoras.

3.10 REAÇÕES DE PCR E SEQUENCIAMENTO E DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES NO ALVO DE EDIÇÃO GÊNICA

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 10µL da solução de lise descrita acima. Para as reações de PCR foram utilizados 3µL 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 µg/µL Proteinase K) e purificação pelo método do fenol/clorofórmio.

As reações de PCR foram feitas com a enzima de alta fidelidade Phusion (Thermo Fisher, EUA) de acordo com as instruções do fabricante para os seguintes primers descritos na Tabela 6. De forma a aumentar a especificidade do alvo e diminuir a interferência de amplificações em alvos diferentes, foram realizadas duas reações consecutivas, a primeira com primers externos e a segunda com primers internos, no caso do alvo no gene da betalactoglobulina.

Tabela 6: Primers para as reações de PCR no *locus* analisado do exon 2 do gene da beta-lactoglobulina ou do receptor de prolactina.

Nome	Alvo	Primer 5' – 3'	Tamanho do fragmento de amplificação (bp)	Temperatura de Melting predita (°C)
Primers Externos BLG	BLG	Direto: GCTCATCTGGGTCCCT CTTT Reverso: ACTGAAGTGGAAATGC ATAGGA	606	57
Primers Internos BLG	BLG	Direto: GGTGGGACAGAGAGC CCA Reverso: ACTGAAGTGGAAATGC ATAGGA	507	58
Primers PRLR	PRLR	Direto: CCACAACATTGCTGAC	429	58

GTGT

Reverso:

GGCCTTCTTGGCTGGT

TCTT

Todos os produtos de PCR foram purificados de acordo com as instruções do fabricante do kit GeneJet PCR (Thermo, EUA). As reações de sequenciamento foram realizadas foram terceirizadas e realizadas pela empresa Myleus (Belo Horizonte, Brasil), com a plataforma ABI 3730 com o kit BigDye V3.1.

Os resultados obtidos do sequenciamento foram analisados com o algoritmo Tide (disponível em -- <https://tide.deskgen.com/>), utilizando os parâmetros padrão e utilizando o valor de $p = 0,01$ como ponto de corte para significância da sequência editada.

3.11 PRODUÇÃO DO MRNA DA EGFP E TRANSFEÇÃO

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 mMACHINE 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 7.

Tabela 7: Primers utilizados para a amplificação da sequência codificante da eGFP

Primer	Elementos Contidos no Produto de Amplificação	Temperatura de Melting (°C)	Tamanho do fragmento de amplificação com o Primer Reverso (bp)
eGFP – Direto 1: 5' AATTAACCCTCACTA AAGGGAGAATGGTG AGCAAGGGCGA 3'	Promotor T3	58	849
eGFP – Direto 2: 5' AATTAACCCTCACTA AAGGGAGAGCCACC ATGGTGAGCAAG 3'	Promotor T3 e Sequência Kozak	58	855
eGFP – Reverso: 5' AAGCAGCGTATCCA CATAGC 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.

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 acima foi transfectado em duplicata empregando 0,5µg de cada um dos mRNAs por poço conforme previsto no protocolo disponibilizado pelo fabricante.

A avaliação da fluorescência foi realizada por microscopia de fluorescência com os parâmetros de excitação e emissão, respectivamente 488nm e 509nm. Além disso, também foi realizada a análise por citometria de fluxo para a avaliação da população de células expressando a proteína eGFP.

3.12 PRODUÇÃO DE CÉLULAS EXPRESSANDO CAS9 DE MANEIRA ESTÁVEL

Simultaneamente às tentativas de edição genética utilizando a transfecção de DNA, células MDBK foram submetidas a um protocolo de transfecção com o objetivo de gerar uma linhagem estável. A expectativa era que essas células expressassem de forma constitutiva a proteína Cas9, servindo como plataforma para testar as transfecções dos sgRNAs. A linhagem MDBK que expressa de forma estável a nuclease Cas9 foi obtida a partir da transfecção de células MDBK com o plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459, Addgene), que contém o gene para resistência eucariótica à puromicina, controlado pelo mesmo promotor que o gene para a Cas9.

Inicialmente, as células foram dispostas em placas de 24 poços para realização de curva de mortalidade, que identificou a morte de células não transfectadas quando expostas a diferentes concentrações de puromicina. As concentrações de puromicina (Sigma) variaram de 0,5µg/mL a 5µg/mL, sendo definida a concentração de 1µg/mL como a mínima necessária para eliminar todas as células não transfectadas, conforme as recomendações do fabricante.

Seguindo o protocolo do fabricante, as células a serem transfectadas foram dispostas em placas de 24 poços e submetidas à transfecção com Fugene HD, realizando-se em duplicata os 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, as células transfectadas foram replicadas na proporção de 1 poço para 3 poços de placas de 24 poços, colocando agora as células em contato com o meio de seleção na concentração de puromicina definida pela curva de mortalidade, 1µg/mL. No total, 24 poços foram preenchidos com células replicadas a partir das transfectadas com px459. Depois, os poços foram monitorados para o surgimento de colônias isoladas resistentes à puromicina, indicativo de expressão estável do vetor transfectado. A linhagem isolada a partir deste protocolo passou a ser denominada MDBK-Cas9.

3.13 DETECÇÃO DO GENE DA NUCLEASE CAS9 POR PCR CONVENCIONAL E QPCR

O DNA genômico extraído das linhagens de células MDBK, MDBK-Cas9, HEK 293 e HEK 293-Cas9 foi utilizado para reação de PCR com primers específicos para a sequência da enzima Cas9 presente no vetor px459 utilizado. Foram realizadas reações de PCR convencional e qPCR para quantificação absoluta de forma a permitir a caracterização das linhagens celulares produzidas. Os primers utilizados para a detecção estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8: Primers utilizados para a amplificação e detecção do gene da Cas9

Nome	Alvo	Primer 5' – 3'	Tamanho do fragmento de amplificação (bp)	Temperatura de Melting predita (°C)
Primers Cas9	Cas9	Direto: GCGGGATATGTACGTG GACC Reverso: TCTGGTCAGCACCTTG TTGT	121	58

4. RESULTADOS

4.1. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DOS RNAs GUIA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO*

Foram desenhadas três sequências para oligonucleotídeos complementares a duas sequências no exon 2 da beta-lactoglobulina que foram denominados arbitrariamente E2A (exon 2A), E2B (exon 2B) e E2C (E2C). Uma quarta sequência, que chamamos E2F, foi também desenhada *in silico*, entretanto não foi sintetizada pela transcrição *in vitro* conforme descrito e sim adquirida da empresa Synthego (EUA) que executa previamente a caracterização eletroforética e química dos sgRNAs. As guias para o alvo no PRLR também foram adquiridas previamente sintetizadas da empresa Synthego (EUA). Portanto, os resultados aqui apresentados para caracterização eletroforética foram apenas para os RNAs guia E2A, E2B e E2C; ao passo que a avaliação da atividade *in vitro* foi realizada com todos os quatro. 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 antisense foi utilizado nas três reações, de maneira que anela com todos os outros primers e permite a construção do molde para todos 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 9

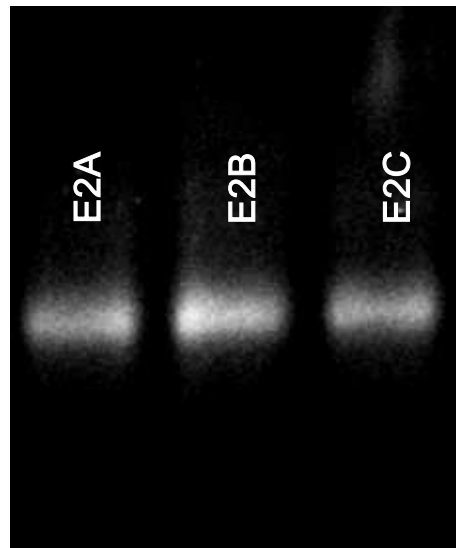
Tabela 9: Desenho dos oligonucleotídeos para síntese dos sgRNAs.

Primer e sgRNA correspondente	Sequência 5' – 3'
Direto – E2A	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGACTTGGTACTCCTTG GCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
Direto – E2B	GAAATTGGCGGGGACTTGGTACTCCTGTTTTAGAGCTAGA AATAGC
Direto – E2C	GAAATTGAAATTGGCGGGGACTTGGTACTCCTGTTTTAGA GCTAGAAATAGC
Reverso (Todos os sgRNAs)	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACG GACTAGCTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC

A sequência de sgRNA E2F, sintetizada pela empresa Synthego, foi 5' GACCCCCCGGGGTGGGGTGC 3'

A corrida eletroforética dos sgRNAs indicou a transcrição *in vitro* adequada desses segmentos de RNA, uma vez que apresentaram-se como uma banda única de mesmo tamanho entre si, figura 2.

Figura 2: Gel de agarose 2% indicando a presença dos três segmentos de sgRNA sintetizados *in vitro* com igual tamanho.



Em seguida, a atividade das guias junto com a nuclease Cas9 foi testada com o ensaio *in vitro* de clivagem pela Cas9. Os locais de clivagem previstos para cada sgRNA estão resumidos na figura 3.

Figura 3: Locais de clivagem previstos para corte pela Cas9 complexada com cada um dos sgRNAs utilizados.

Produto de Nested-PCR → 507bp

sgRNA E2A: Clivagem em 96; fragmentos de 96 e 412 bp

sgRNA E2B: Clivagem em 100; fragmentos de 100 e 408 bp

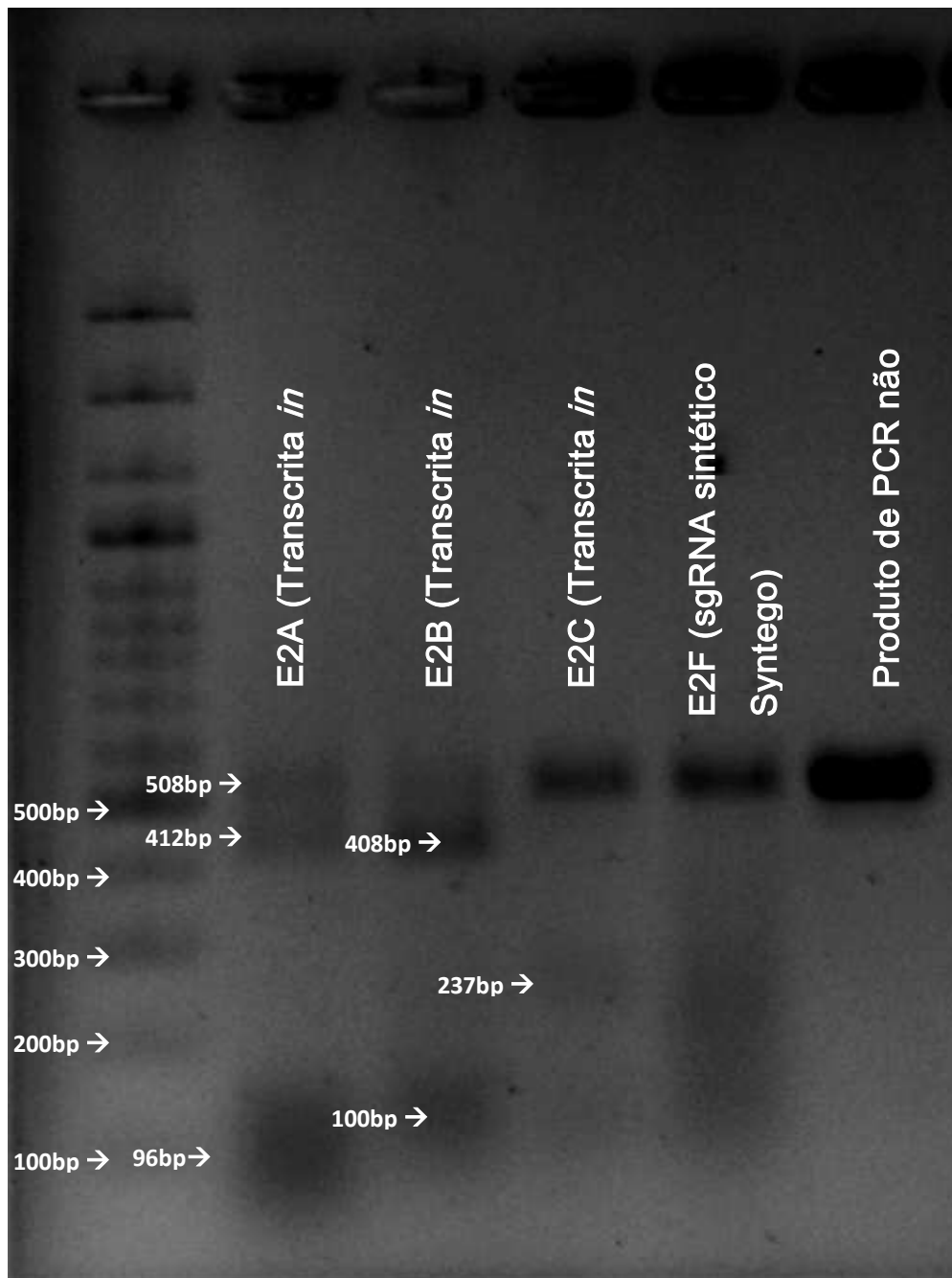
sgRNA E2C: Clivagem em 271; fragmentos de 271 e 237 bp

sgRNA E2F: Clivagem em 271; fragmentos de 271 e 237 bp

Figura 3: Locais de clivagem previstos para corte pela Cas9 complexada com cada um dos sgRNAs utilizados.

Após a clivagem do produto de PCR contendo o alvo para os sgRNAs, foi realizada uma corrida eletroforética dos fragmentos gerados a fim de se verificar a ocorrência ou não do corte pela Cas9, esses resultados estão apresentados na figura 4.

Figura 4: Corrida eletroforética dos produtos de clivagem da nuclease Cas9 complexada com cada um dos sgRNAs empregados.



Os produtos de clivagem apresentados na figura 4 indicaram maior atividade dos sgRNAs E2A e E2B, de forma que foram preferidas para os experimentos seguintes.

De forma similar, as guias para o PRLR foram testadas. Foram sintetizadas guias com as seguintes sequências PRLR 1: AGACACGGTGTGGCCACGAC; PRLR 2: TGCTAAACCCTTGGAATACG; e PRLR 3: ATCCACAAGGTCAGCCAAGA. Após avaliação *in vitro* de clivagem, conforme descrita para o gene da BLG, foi notado que as guias PRLR 2 e PRLR 3 exibiam atividade e, portanto, foram as utilizadas para os experimentos posteriores.

4.2. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE EGFP A PARTIR DA TRANSFECCÃO DO MRNA EGFP

Os resultados desses experimentos foram apresentados em publicação do grupo (Souza, G.T et al). Foi permitida a padronização de um protocolo para produção do mRNA da proteína eGFP de forma que pudesse ser posteriormente utilizada como controle para os experimentos de transfecção e complexação com segmentos de RNA.

Resumidamente, os experimentos demonstraram adequada produção de mRNA com o protocolo otimizado por nós. Ademais, foi possível verificar que a presença da sequência Kozak e da cauda poliA são fatores que determinam maior tradução da proteína a partir do mRNA transfectado. Publicação com resultados completos em Anexo I.

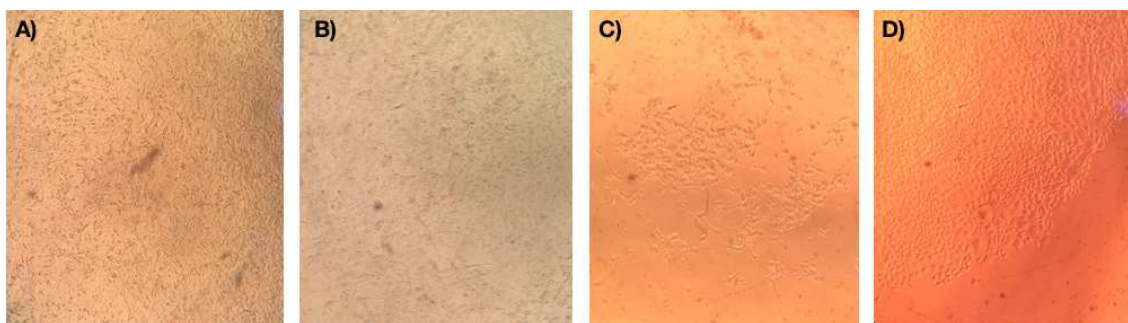
O mRNA funcionante produzido passou a ser utilizado como controle positivo em todos os experimentos de forma a comprovar a transfecção e estabilidade de RNAs no contexto de cada experimento.

4.3. PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE LINHAGEM DE CÉLULAS EXPRESSANDO ESTAVELMENTE A PROTEÍNA CAS9

Após a transfecção e replicação das células transfectadas em meio contendo antibiótico de seleção, as placas foram monitoradas sob microscópio invertido para identificar o surgimento de colônias isoladas. Nas duas semanas subsequentes, foram encontradas 4 colônias resistentes ao antibiótico. Estas colônias foram

geradas por células transfectadas com as seguintes quantidades do plasmídeo e proporções de FugeneHD para o 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 foi possível observar uma maior propensão à produção de colônias resistentes em nenhum dos tratamentos de transfecção realizados. As imagens das colônias obtidas nesta etapa estão apresentadas na Figura 5.

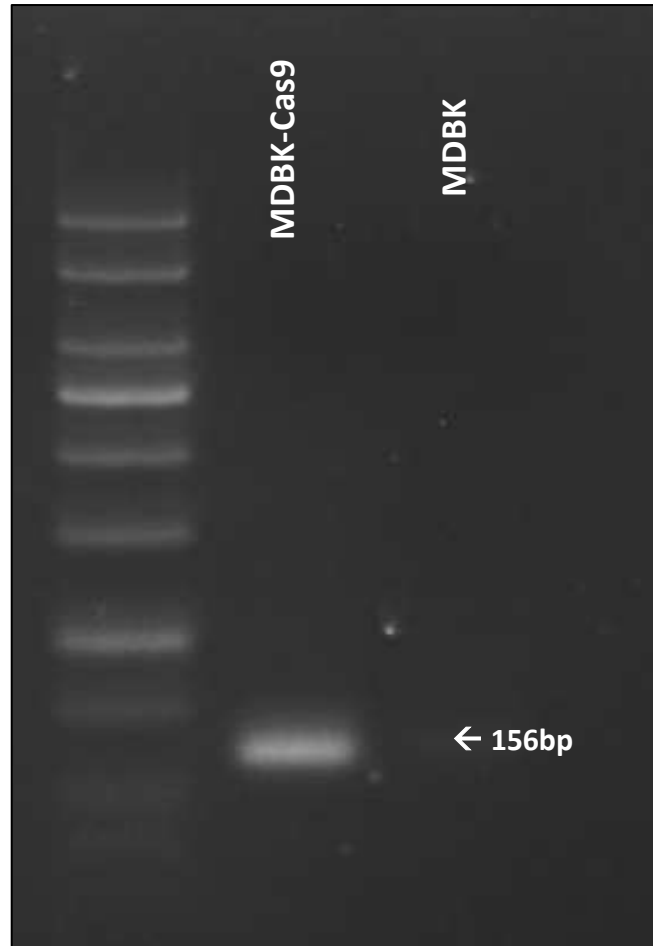
Figura 5: A e B) Colônias obtidas a partir de células MDBK transfectadas com 1 μ g do plasmídeo px459 na proporção 3:1; C) Colônia obtida a partir de células transfectadas com 0,5 μ g do plasmídeo na proporção 6:1; D) Colônia obtida a partir de células transfectadas com 1 μ g do plasmídeo na proporção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



Poucas colônias foram obtidas em relação ao grande número de células inicialmente transfectadas. As colônias geradas foram replicadas para expandir o número de células e avaliar sua capacidade replicativa. Observou-se que, com exceção das células da colônia obtida pela transfecção de 1 μ g do plasmídeo na proporção 6:1, todas mostraram-se senescentes após a passagem. Assim, apenas esta linhagem foi utilizada nos experimentos seguintes, recebendo a denominação de MDBK-Cas9. Essas células foram expandidas e armazenadas em nosso banco de células para os experimentos descritos aqui e para futuras análises.

O DNA genômico extraído das linhagens de células MDBK e MDBK-Cas9 foi utilizado para a reação de PCR com primers específicos para a sequência da enzima Cas9 presente no vetor px459 utilizado. Foi possível observar a presença desta sequência no DNA total das células MDBK-Cas9, indicando sua inserção genômica ou a amplificação epissomal do vetor nessas células, conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6: Corrida eletroforética em gel de agarose 2% de produtos de PCR convencional, indicando a presença do gene da Cas9 na linhagem de células MDBK-Cas9 produzida.



Baseando-se nesses resultados, essa linhagem celular foi transfectada apenas com os sgRNAs como prova de conceito do funcionamento dessa linhagem de células como plataforma para teste da edição genética em bovinos.

O mesmo procedimento foi realizado com as células HEK 293, que também geraram a linhagem celular HEK 293-Cas9. Isso indica a possibilidade de transfecção estável em linhagens celulares humanas também.

4.4. ANÁLISE DA PROPORÇÃO DE CÉLULAS MDBK E MDBK-CAS9 EDITADAS

A edição gênica foi objetivada como prova de conceito nas linhagens MDBK e MDBK-Cas9 (obtidas com os resultados descritos no tópico 4.3). Dessa forma, resumidamente, foi realizada a transfecção do complexo da proteína Cas9 com os

sgRNAs na linhagem MDBK, enquanto a linhagem MDBK-Cas9 foi transfectada apenas com os sgRNAs.

As sequências de guias utilizadas para as análises foram 1) E2A: GCGGGGACTTGGTACTCCTT; 2) E2B GACTTGGTACTCCTTGGCCA; 3) PRLR 2: TGCTAAACCCTTGGGAATACG; e 4) PRLR 3 ATCCACAAGGTCAGCCAAGA

Os resultados de transfecção indicando a guia, célula e taxa de sucesso estão resumidos na tabela 10.

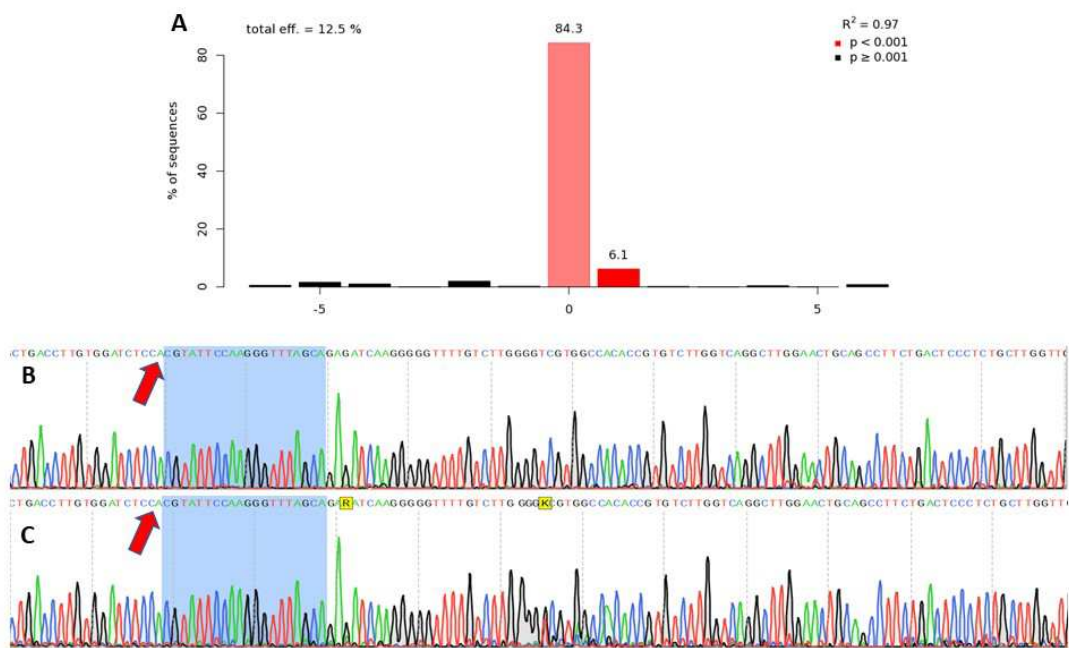
Tabela 10 : Proporção de células editadas em cada uma das linhagens celulares para cada sgRNA e resumo dos experimentos.

Linhagem	Guia	Protocolo	% de Edição
MDBK	E2A	<ul style="list-style-type: none"> • Transfecção em células plaquedas com 80% de confluência • 240ng sgRNA + 1250ng Cas9 	• 10,8%
MDBK	E2B	<ul style="list-style-type: none"> • Transfecção em células plaquedas com 80% de confluência • 240ng sgRNA + 1250ng Cas9 	• 12,8%
MDBK-Cas9	E2A	<ul style="list-style-type: none"> • Transfecção em células plaquedas com 80% de confluência • 240ng sgRNA 	• 8,9 %
MDBK-Cas9	E2B	<ul style="list-style-type: none"> • Transfecção em células plaquedas com 80% de confluência • 240ng sgRNA 	• 15,8 %
MDBK	PRLR2	<ul style="list-style-type: none"> • Transfecção em células plaquedas com 40% de confluência • 240ng sgRNA + 1250ng Cas9 	• 60,2 %
MDBK	PRLR2	<ul style="list-style-type: none"> • Transfecção em células 	• 47,1 %

		plaquedas com 80% de confluência	
		<ul style="list-style-type: none"> • 240ng sgRNA + 1250ng Cas9 	
MDBK	PRLR3	<ul style="list-style-type: none"> • Transfecção em células plaquedas com 40% de confluência • 240ng sgRNA + 1250ng Cas9 	• 14,35 %
MDBK	PRLR3	<ul style="list-style-type: none"> • Transfecção em células plaquedas com 80% de confluência • 240ng sgRNA + 1250ng Cas9 	• 15,05 %
MDBK-Cas9	PRLR2	<ul style="list-style-type: none"> • Transfecção em células plaquedas com 40% de confluência • 240ng sgRNA 	• 62,7 %
MDBK-Cas9	PRLR2	<ul style="list-style-type: none"> • Transfecção em células plaquedas com 80% de confluência • 240ng sgRNA 	• 61,8 %
MDBK-Cas9	PRLR3	<ul style="list-style-type: none"> • Transfecção em células plaquedas com 40% de confluência • 240ng sgRNA 	• 36,7 %
MDBK-Cas9	PRLR3	<ul style="list-style-type: none"> • Transfecção em células plaquedas com 80% de confluência • 240ng sgRNA 	• 12,9 %

Na figura 7 está demonstrada o alvo de edição gênica bem como a detecção de sequências minoritárias editadas no eletroferograma.

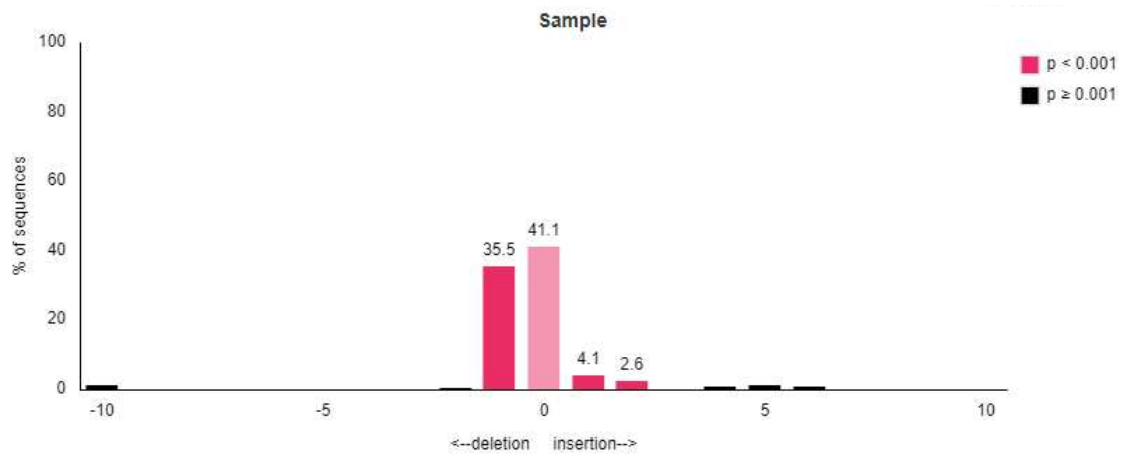
Figura 7: A) Proporção de edição segundo análise pelo algoritmo Tide; B) Eletroferograma controle ; e C) Eletroferograma demonstrando sítio de clivagem e presença de ruído referente às sequências editadas em células MDBK-Cas9 transfectadas apenas com o sgRNA PRLR 3. Sequências complementares ao sgRNA em azul. Seta vermelha indicando sítio de clivagem esperado.



4.5. DETECÇÃO DA EDIÇÃO GÊNICA EM EMBRIÕES PRODUZIDOS APÓS MICROINJEÇÃO DO SISTEMA CRISPR-CAS9

Os embriões microinjetados e não transferidos foram lisados e utilizados para PCR e sequenciamento a fim de avaliar a proporção de blastômeros editados no conjunto de estruturas. As reações de PCR foram analisadas da mesma forma que para as células. A proporção de edição para essas estruturas foi de 48% para uma deleção de um par de base abaixo do sítio de clivagem. A figura 8 traz a representação detalhada do tipo e proporção de edição detectada em embriões produzidos.

Figura 8: Distribuição de sequências detectadas indicando uma proporção total de 48%, sendo a maioria (35,5%) das células mutantes apresentando a deleção de um nucleotídeo.



5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Inicialmente, os protocolos utilizados para produzir os sgRNAs permitiram obter oligonucleotídeos com o tamanho, pureza e quantidade esperados. Através de análises *in silico*, encontramos sequências adequadas para serem alvo dos sgRNAs nos loci de interesse, visando a edição gênica e a interferência na expressão da proteína BLG. No entanto, ao avaliarmos a atividade desses sgRNAs em testes *in vitro* com a proteína Cas9, observamos variações na eficiência de edição entre os diferentes sgRNAs produzidos (LAUBUHN, et al. 2017). Essa variação refletiu-se em baixas taxas de edição nas linhagens celulares ao utilizar as guias E2A e E2B. Diante disso, tornou-se relevante o uso de linhagens celulares que expressassem a Cas9, especialmente geradas com os genomas de interesse, permitindo testar de forma funcional os sgRNAs.

Para confirmar a eficiência da transfecção e microinjeção de RNAs, utilizamos o mRNA eGFP como um método simples para produzir mRNAs reportadores. Isso foi feito através de vetores de expressão contendo o gene para a proteína reportadora, o que se mostrou de grande importância para trabalhos futuros que necessitem confirmar a transfecção ou microinjeção de RNAs sem a necessidade de importar oligonucleotídeos. Além disso, esses mRNAs foram essenciais para determinar a capacidade de transfectar as células modelo, incluindo o mRNA da proteína Cas9. Também serviram como controle para detectar a presença de nucleases no ambiente experimental, e ao longo dos experimentos, demonstrou-se que os RNAs mantiveram-se estáveis.

Para promover a expressão estável da nuclease Cas9, utilizamos a seleção por antibiótico após a transfecção de vetor contendo o gene de resistência à puromicina. Esse método se mostrou adequado, sendo replicado em linhagens celulares humanas e bovinas. A expressão foi detectada tanto por PCR convencional quanto por qPCR, permitindo determinar e acompanhar a manutenção do vetor em experimentos com as linhagens celulares criadas. Essa prova de conceito demonstrou que o modelo é suficientemente adequado para avaliar a atividade dos sgRNAs, uma vez que a taxa de edição gênica se manteve comparável entre as diferentes linhagens celulares. Além disso, também permitiu determinar que a edição gênica seria bem-sucedida em embriões.

A técnica de edição gênica CRISPR-Cas9, como discutido anteriormente, baseia-se no corte promovido pela nuclease Cas9 direcionada pelo sgRNA, seguido pelo reparo de DNA com erro. A eficiência da técnica depende da afinidade do complexo enzima+sgRNA pelo locus no DNA e da capacidade do sistema de reparo de DNA em juntar extremidades não-homólogas. As baixas taxas de edição obtidas em nossos experimentos podem ser atribuídas tanto à falta de ligação e corte pela enzima quanto à impossibilidade de reparo. Embora tenhamos tido sucesso em cortar o alvo de edição gênica *in vitro*, é possível que a baixa capacidade de reparo nas células utilizadas tenha contribuído para as taxas de edição mais baixas. Por outro lado, os embriões microinjetados apresentaram maior proporção de células editadas devido à maior atividade mitótica e, conseqüentemente, aos sistemas de reparo mais ativos em células embrionárias. Além disso, experimentos recentes demonstraram que algumas regiões do genoma são menos propensas à edição gênica devido à incapacidade de desligamento da proteína Cas9 do DNA, impedindo o sistema de reparo de juntar extremidades não-homólogas (CLARKE, et al., 2018). Portanto, são necessários mais testes com um painel de sgRNAs em regiões próximas para otimizar nosso protocolo de edição gênica em células.

Dada a escassez de literatura sobre edição gênica eficiente em embriões bovinos (BEVACQUA et al., 2016; GAO et al., 2017) e a ausência de um protocolo otimizado, os resultados obtidos contribuirão para avançar o estado da arte da engenharia genética. Conclui-se que os sgRNAs desenhados permitem a edição gênica no locus de interesse e, em última instância, que o sistema de edição gênica em linhagens de células bovinas MDBK pode ser realizado utilizando os RNAs componentes do sistema, demonstrando a otimização de um modelo para edição gênica em células bovinas. Assim, as células MDBK e MDBK-Cas (modificadas para expressão da enzima Cas9) podem ser utilizadas como modelos em estudos de edição do genoma bovino usando o sistema CRISPR-Cas9.

REFERÊNCIAS

- AKIDIL, Ezgi *et al.* Highly efficient CRISPR-Cas9-mediated gene knockout in primary human B cells for functional genetic studies of Epstein-Barr virus infection. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. e1009117, 2021.
- ALDAG, Pierre *et al.* Probing the stability of the SpCas9–DNA complex after cleavage. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 49, n. 21, p. 12411–12421, 2021.
- ALMEIDA, Daniela Volcan *et al.* Fluorescent transgenic zebrafish as a biosensor for growth-related effects of methyl parathion. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 152, p. 147–151, 2014.
- ANZALONE, Andrew v.; KOBLAN, Luke W.; LIU, David R. Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 824–844, 2020.
- BARRANGOU, R. *et al.* CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. **Science**, [s. l.], v. 315, n. 5819, p. 1709–1712, 2007.
- BEARDMORE, J. Transgenics: autotransgenics and allotransgenics. **Transgenic Research**, [s. l.], 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**, [s. l.], v. 86, n. 8, p. 1886-1896.e1, 2016.
- BLECK, G T *et al.* Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs. **Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 76, n. 12, p. 3072, 1998.
- BOCH, J. *et al.* Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. **Science**, [s. l.], v. 326, n. 5959, p. 1509–1512, 2009.
- BOCK, Christoph *et al.* High-content CRISPR screening. **Nature Reviews Methods Primers**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 8, 2022.
- BODAI, Zsolt *et al.* Targeting double-strand break indel byproducts with secondary guide RNAs improves Cas9 HDR-mediated genome editing efficiencies. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 2351, 2022.
- BOLOTIN, A; QUINQUIS, B; SOROKIN, A; EHRLICH, S D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, [s. l.], v. 151, n. 8, p. 2551–2561, 2005.
- BRINKMAN, Eva K. *et al.* Kinetics and Fidelity of the Repair of Cas9-Induced Double-Strand DNA Breaks. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 70, n. 5, p. 801-813.e6, 2018.
- CARLSON, D. F. *et al.* Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 43, p. 17382–17387, 2012.
- CARLSON, Daniel F *et al.* Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 479–481, 2016.
- CEBRIAN-SERRANO, Alberto; DAVIES, Benjamin. CRISPR-Cas orthologues and variants: optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools. **Mammalian Genome**, [s. l.], v. 28, n. 7–8, p. 247–261, 2017.
- CHAN, Yau-Tuen *et al.* CRISPR-Cas9 library screening approach for anti-cancer drug discovery: overview and perspectives. **Theranostics**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 3329–3344, 2022.
- CHANDRASEGARAN, Srinivasan; CARROLL, Dana. Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 428, n. 5, p. 963–989, 2016.

- CHATTERJEE, Pranam; JAKIMO, Noah; JACOBSON, Joseph M. Minimal PAM specificity of a highly similar SpCas9 ortholog. **Science Advances**, [s. l.], v. 4, n. 10, 2018.
- CHEN, Fengqian; ALPHONSE, Martin; LIU, Qi. Strategies for nonviral nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 therapeutics. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 3, 2020.
- CHO, Seung Woo *et al.* Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 230–232, 2013.
- CHRISTIAN, M. *et al.* Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. **Genetics**, [s. l.], v. 186, n. 2, p. 757–761, 2010.
- CHU, Van Trung *et al.* Efficient CRISPR-mediated mutagenesis in primary immune cells using CrispRGold and a C57BL/6 Cas9 transgenic mouse line. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 113, n. 44, p. 12514–12519, 2016.
- CHUAI, Guo-hui; WANG, Qi-Long; LIU, Qi. In Silico Meets In Vivo : Towards Computational CRISPR-Based sgRNA Design. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 12–21, 2017.
- CONG, L. *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, [s. l.], v. 339, n. 6121, p. 819–823, 2013.
- DAMAK, Sami *et al.* Improved Wool Production in Transgenic Sheep Expressing Insulin-like Growth Factor 1. **Bio/Technology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 185–188, 1996.
- DELTCHEVA, Elitza *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, [s. l.], v. 471, n. 7340, p. 602–607, 2011.
- DENNING, C. *et al.* No Title. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 559–562, 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**, [s. l.], v. 106, n. 9, p. 3047–3052, 2009.
- DOENCH, John G *et al.* Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 184–191, 2016a.
- DOENCH, John G *et al.* Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 184–191, 2016b.
- DOMINGUEZ, Antonia A.; LIM, Wendell A.; QI, Lei S. Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 5–15, 2016.
- DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, [s. l.], v. 346, n. 6213, 2014.
- FUJIHARA, Yoshitaka; IKAWA, Masahito. CRISPR/Cas9-Based Genome Editing in Mice by Single Plasmid Injection. *Em*: [S. l.: s. n.], 2014. p. 319–336.
- GAJ, Thomas; GERSBACH, Charles A.; BARBAS, Carlos F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 7, p. 397–405, 2013. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779913000875>.
- GAO, Yuanpeng *et al.* Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. **Genome Biology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 13, 2017.
- GAUDELLI, Nicole M. *et al.* Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. **Nature**, [s. l.], v. 551, n. 7681, p. 464–471, 2017.

- GILLMORE, Julian D. *et al.* CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 385, n. 6, p. 493–502, 2021.
- GORDON, J W; RUDDLE, F H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. **Science**, [s. l.], v. 214(, n. 4526, p. 1244-1246., 1981.
- GRISSA, I.; VERGNAUD, G.; POURCEL, C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 35, n. Web Server, p. W52–W57, 2007.
- HAHN, Florian *et al.* An Efficient Visual Screen for CRISPR/Cas9 Activity in *Arabidopsis thaliana*. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 08, 2017.
- HE, Zuyong *et al.* Comparison of CRISPR/Cas9 and TALENs on editing an integrated EGFP gene in the genome of HEK293FT cells. **SpringerPlus**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 814, 2016.
- HILLE, Frank *et al.* The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. **Cell**, [s. l.], v. 172, n. 6, p. 1239–1259, 2018.
- HIROSE, Michiko *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**, [s. l.], v. 7, p. 42476, 2017.
- HOSHIJIMA, Kazuyuki *et al.* Highly Efficient CRISPR-Cas9-Based Methods for Generating Deletion Mutations and F0 Embryos that Lack Gene Function in Zebrafish. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 645-657.e4, 2019.
- HOU, Zhonggang *et al.* Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 110, n. 39, p. 15644–15649, 2013.
- HUTCHINSON, John N; MULLER, William J. Transgenic mouse models of human breast cancer. **Oncogene**, [s. l.], v. 19, n. 53, p. 6130–6137, 2000.
- HWANG, Woong Y *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 227–229, 2013.
- IRION, U.; KRAUSS, J.; NUSSLEIN-VOLHARD, C. Precise and efficient genome editing in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. **Development**, [s. l.], v. 141, n. 24, p. 4827–4830, 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**, [s. l.], v. 169, n. 12, p. 5429–5433, 1987.
- IVANOV, Ivan E. *et al.* Cas9 interrogates DNA in discrete steps modulated by mismatches and supercoiling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 117, n. 11, p. 5853–5860, 2020.
- J. M. ADAMS; A. W. HARRIS, C. A. PINKERT, L. M. CORCORAN, W. S. ALEXANDER, S. CORY, R. D. PALMITER, R. L. BRINSTER. The *c-myc* oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. **Nature**, [s. l.], v. 318, p. 533–538, 1985.
- JAVAID, Nasir; CHOI, Sangdun. CRISPR/Cas System and Factors Affecting Its Precision and Efficiency. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 9, 2021.
- JIANG, Fuguo *et al.* Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. **Science**, [s. l.], v. 351, n. 6275, p. 867–871, 2016.
- JIANG, Fuguo; DOUDNA, Jennifer A. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. **Annual Review of Biophysics**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 505–529, 2017.

- JIN, Li-Fang; LI, Jin-Song. Generation of genetically modified mice using CRISPR/Cas9 and haploid embryonic stem cell systems. **Dong wu xue yan jiu = Zoological research**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 205–213, 2016.
- JINEK, M. *et al.* A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, [s. l.], v. 337, n. 6096, p. 816–821, 2012.
- JINEK, Martin *et al.* RNA-programmed genome editing in human cells. **eLife**, [s. l.], v. 2, 2013.
- JINEK, Martin *et al.* Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. **Science**, [s. l.], v. 343, n. 6176, 2014.
- KHALIL, Ahmad M. The genome editing revolution: review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 68, 2020.
- KIM, Sojung *et al.* Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. **Genome Research**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 1012–1019, 2014a.
- KIM, Sojung *et al.* Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. **Genome Research**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 1012–1019, 2014b.
- 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**, [s. l.], v. 93, n. 3, p. 1156–1160, 1996.
- KIM, Y G; CHANDRASEGARAN, S; Chimeric restriction endonuclease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [s. l.], v. 91, n. 4, p. 883–887, 1994.
- KLEINSTIVER, Benjamin P. *et al.* High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. **Nature**, [s. l.], v. 529, n. 7587, p. 490–495, 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**, [s. l.], 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**, [s. l.], v. 91, n. 23, p. 11163–11167, 1994b.
- KONSTANTAKOS, Vasileios *et al.* CRISPR–Cas9 gRNA efficiency prediction: an overview of predictive tools and the role of deep learning. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 50, n. 7, p. 3616–3637, 2022.
- KUES, Wilfried A.; NIEMANN, Heiner. Advances in farm animal transgenesis. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 146–156, 2011.
- LAI, Liangxue *et al.* Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 435–436, 2006.
- LAZZERINI-DENCHI, Eros; SFEIR, Agnel. Stop pulling my strings — what telomeres taught us about the DNA damage response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 364–378, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm.2016.43>.
- LEDFORD, Heidi. Salmon is first transgenic animal to win US approval for food. **Nature**, [s. l.], 2015.
- LEDFORD, Heidi. Transgenic salmon nears approval. **Nature**, [s. l.], v. 497, n. 7447, p. 17–18, 2013.
- LIANG, Xiquan *et al.* Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 208, p. 44–53, 2015.

- LIAO, Jin Qi; ZHOU, Guangqian; ZHOU, Yan. Generation of Monoclonal iPSC Lines with Stable Cas9 Expression and High Cas9 Activity. *Em: [S. l.: s. n.]*, 2020. p. 575–588.
- LIEVENS, A. *et al.* Genetically modified animals: Options and issues for traceability and enforcement. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 159–176, 2015a.
- LIEVENS, A. *et al.* Genetically modified animals: Options and issues for traceability and enforcement. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 159–176, 2015b.
- LIEVENS, A. *et al.* Genetically modified animals: Options and issues for traceability and enforcement. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 159–176, 2015c. Disponível em:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415001223>.
- LIU, Xiaoxi *et al.* Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 19675, 2016.
- LIU, Si-Cheng *et al.* Target residence of Cas9-sgRNA influences DNA double-strand break repair pathway choices in CRISPR/Cas9 genome editing. **Genome Biology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 165, 2022.
- LIU, Q.; XIA, Z.; CASE, C. C. Validated Zinc Finger Protein Designs for All 16 GNN DNA Triplet Targets. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 6, p. 3850–3856, 2002.
- LIU, Guanqing; ZHANG, Yong; ZHANG, Tao. Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 18, p. 35–44, 2020.
- LOTTI, Samantha N. *et al.* Modification of the Genome of Domestic Animals. **Animal Biotechnology**, [s. l.], p. 1–13, 2017.
- LYALL, J. *et al.* Suppression of Avian Influenza Transmission in Genetically Modified Chickens. **Science**, [s. l.], v. 331, n. 6014, p. 223–226, 2011.
- MAKAROVA, Kira S. *et al.* Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 67–83, 2020.
- MAKSIMENKO, O G *et al.* Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems. **Acta naturae**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 33–46, 2013.
- MALI, P. *et al.* RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. **Science**, [s. l.], v. 339, n. 6121, p. 823–826, 2013.
- MILLER, J; MCLACHLAN, A D; KLUG, A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 1609–1614, 1985.
- MOHIUDDIN, Muhammad 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**, [s. l.], v. 148, n. 3, p. 1106–1114, 2014.
- MOJICA, Francisco J.M. *et al.* Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. **Journal of Molecular Evolution**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 174–182, 2005.
- MOSCOU, M. J.; BOGDANOVA, A. J. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. **Science**, [s. l.], v. 326, n. 5959, p. 1501–1501, 2009.
- MOURA, Raylene R. *et al.* Dynamics of Recombinant hG-CSF in Transgenic Goat: Preliminary Study in the Founder during Hormonally Induced Lactation. **Animal Biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 10–14, 2013.

- MÜLLER, Maximilian *et al.* Streptococcus thermophilus CRISPR-Cas9 Systems Enable Specific Editing of the Human Genome. **Molecular Therapy**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 636–644, 2016.
- NAKAGAWA, Yoshiko *et al.* Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized oocytes. **BMC Biotechnology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 33, 2015.
- NAKAGAWA, Ryoya *et al.* Structure and engineering of the minimal type VI CRISPR-Cas13bt3. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 82, n. 17, p. 3178-3192.e5, 2022.
- NISHIMASU, Hiroshi *et al.* Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. **Cell**, [s. l.], v. 156, n. 5, p. 935–949, 2014.
- PACESA, Martin *et al.* Structural basis for Cas9 off-target activity. **Cell**, [s. l.], v. 185, n. 22, p. 4067-4081.e21, 2022.
- 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.)**, [s. l.], v. 252, n. 5007, p. 809–817, 1991.
- PINNAPUREDDY, Ashish R. *et al.* Large animal models of rare genetic disorders: sheep as phenotypically relevant models of human genetic disease. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 107, 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)**, [s. l.], v. 151, n. Pt 3, p. 653–663, 2005.
- PROUDFOOT, Chris *et al.* Genome edited sheep and cattle. **Transgenic Research**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 147–153, 2015a.
- PROUDFOOT, Chris *et al.* Genome edited sheep and cattle. **Transgenic Research**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 147–153, 2015b.
- QIAN, Xi *et al.* Production of recombinant human proinsulin in the milk of transgenic mice. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 6465, 2015.
- RAMALINGAM, Sivaprakash *et al.* Generation and Genetic Engineering of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Designed Zinc Finger Nucleases. **Stem Cells and Development**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 595–610, 2013.
- RAMALINGAM, Sivaprakash *et al.* TALEN-mediated generation and genetic correction of disease-specific human induced pluripotent stem cells. **Current gene therapy**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 461–472, 2014.
- RAMIREZ-PHILLIPS, Amanda Catalina; LIU, Dexi. Therapeutic Genome Editing and In Vivo Delivery. **The AAPS Journal**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 80, 2021.
- RAN, F Ann *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 2281–2308, 2013.
- REARDON, Sara. Gene-editing record smashed in pigs. **Nature**, [s. l.], 2015.
- REBAR, E J; PABO, C O. Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 263, n. 5147, p. 671–673, 1994.
- RICHT, Jürgen A *et al.* Production of cattle lacking prion protein. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 132–138, 2007.
- RIESENBERG, Stephan *et al.* Improved gRNA secondary structures allow editing of target sites resistant to CRISPR-Cas9 cleavage. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 489, 2022.
- ROGERS, Christopher S. Engineering Large Animal Species to Model Human Diseases. *Em: CURRENT PROTOCOLS IN HUMAN GENETICS*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2016. p. 15.9.1-15.9.14.

- SANDER, Jeffrey D; JOUNG, J Keith. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 347–355, 2014. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt.2842>.
- SAUNDERS, Richard L; FLETCHER, Garth L; HEW, Choy L. Smolt development in growth hormone transgenic Atlantic salmon. **Aquaculture**, [s. l.], v. 168, n. 1–4, p. 177–193, 1998.
- SCHEENEN, W. J. J. M. *et al.* Using Transgenic Animal Models in Neuroendocrine Research. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1163, n. 1, p. 296–307, 2009.
- SCHMID-BURGK, Jonathan L. *et al.* Highly Parallel Profiling of Cas9 Variant Specificity. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 794-800.e8, 2020a.
- SCHMID-BURGK, Jonathan L. *et al.* Highly Parallel Profiling of Cas9 Variant Specificity. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 794-800.e8, 2020b.
- SCOTT, Tristan *et al.* Improved Cas9 activity by specific modifications of the tracrRNA. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 16104, 2019.
- SMITH, J; BERG, J M; CHANDRASEGARAN, S. A detailed study of the substrate specificity of a chimeric restriction enzyme. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 674–681, 1999.
- STERNBERG, Samuel H. *et al.* Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR–Cas9. **Nature**, [s. l.], v. 527, n. 7576, p. 110–113, 2015.
- STERNBERG, Samuel H. *et al.* DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. **Nature**, [s. l.], v. 507, n. 7490, p. 62–67, 2014.
- STRECKER, Jonathan *et al.* Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. **Nature Communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 212, 2019.
- SUN, Ning *et al.* Development of drug-inducible CRISPR-Cas9 systems for large-scale functional screening. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 225, 2019.
- SUN, Bixi; CHEN, Hening; GAO, Xiaoshu. Versatile modification of the CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein system to facilitate in vivo application. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 337, p. 698–717, 2021.
- SWARTHOUT, John T.; RAISINGHANI, Manish; CUI, Xiaoxia. Zinc Finger Nucleases: A new era for transgenic animals. **Annals Of Neurosciences**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2011.
- TEBOUL, Lydia *et al.* Variability in Genome Editing Outcomes: Challenges for Research Reproducibility and Clinical Safety. **Molecular Therapy**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1422–1431, 2020.
- THAKORE, Pratiksha I *et al.* Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. **Nature Methods**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 127–137, 2016.
- TONG, Jia *et al.* Production of recombinant human lysozyme in the milk of transgenic pigs. **Transgenic Research**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 417–419, 2011.
- TRAN, Ngoc Tung *et al.* Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Knockin in Mouse Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. **Cell Reports**, [s. l.], v. 28, n. 13, p. 3510–3522.e5, 2019.
- VAKULSKAS, Christopher A. *et al.* A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 1216–1224, 2018.
- VAN EENENNAAM, Alison L. *et al.* Genetic Engineering of Livestock: The Opportunity Cost of Regulatory Delay. **Annual Review of Animal Biosciences**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 453–478, 2021.

- WANG, Haoyi *et al.* A brief review of genome editing technology for generating animal models. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 123, 2020.
- WANG, Jun *et al.* An overview and metanalysis of machine and deep learning-based CRISPR gRNA design tools. **RNA Biology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 13–22, 2020.
- WANG, Tim *et al.* Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System. **Science**, [s. l.], v. 343, n. 6166, p. 80–84, 2014a.
- WANG, Tim *et al.* Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System. **Science**, [s. l.], v. 343, n. 6166, p. 80–84, 2014b.
- WANG, Haifeng; LA RUSSA, Marie; QI, Lei S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 227–264, 2016.
- WEN, Wei; ZHANG, Xiao-Bing. CRISPR–Cas9 gene editing induced complex on-target outcomes in human cells. **Experimental Hematology**, [s. l.], v. 110, p. 13–19, 2022.
- WHEELER, M B; BLECK, G T; DONOVAN, S M. Transgenic alteration of sow milk to improve piglet growth and health. **Reproduction (Cambridge, England) Supplement**, [s. l.], v. 58, p. 313–324, 2001.
- WHITELAW, C Bruce A *et al.* Engineering large animal models of human disease. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 238, n. 2, p. 247–256, 2016.
- WONG, Nathan; LIU, Weijun; WANG, Xiaowei. WU-CRISPR: characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system. **Genome Biology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 218, 2015.
- WU, Xia *et al.* Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids. **Transgenic Research**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 537–543, 2012.
- WU, Haibo *et al.* TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 112, n. 13, p. E1530–E1539, 2015.
- XU, Xiaojun; DUAN, Dongsheng; CHEN, Shi-Jie. CRISPR-Cas9 cleavage efficiency correlates strongly with target-sgRNA folding stability: from physical mechanism to off-target assessment. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 143, 2017.
- YANG, Weili *et al.* Genetically modified large animal models for investigating neurodegenerative diseases. **Cell & Bioscience**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 218, 2021.
- YANG, Ruiguo *et al.* Monoclonal Cell Line Generation and CRISPR/Cas9 Manipulation via Single-Cell Electroporation. **Small**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1702495, 2018.
- YANG, Mengyi *et al.* The Conformational Dynamics of Cas9 Governing DNA Cleavage Are Revealed by Single-Molecule FRET. **Cell Reports**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 372–382, 2018.
- YU, Xin *et al.* Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 919–929, 2016.
- ZETSCHKE, Bernd *et al.* Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. **Cell**, [s. l.], v. 163, n. 3, p. 759–771, 2015.
- ZETSCHKE, Bernd *et al.* Multiplex gene editing by CRISPR–Cpf1 using a single crRNA array. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 31–34, 2017.
- ZHANG, Xiao-Hui *et al.* Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s. l.], v. 4, p. e264, 2015.
- ZHAO, Ziyi *et al.* Review of applications of CRISPR-Cas9 gene-editing technology in cancer research. **Biological Procedures Online**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 14, 2021.

- AKIDIL, Ezgi *et al.* Highly efficient CRISPR-Cas9-mediated gene knockout in primary human B cells for functional genetic studies of Epstein-Barr virus infection. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. e1009117, 2021.
- ALDAG, Pierre *et al.* Probing the stability of the SpCas9–DNA complex after cleavage. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 49, n. 21, p. 12411–12421, 2021.
- ALMEIDA, Daniela Volcan *et al.* Fluorescent transgenic zebrafish as a biosensor for growth-related effects of methyl parathion. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 152, p. 147–151, 2014.
- ANZALONE, Andrew v.; KOBLAN, Luke W.; LIU, David R. Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 824–844, 2020.
- BARRANGOU, R. *et al.* CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. **Science**, [s. l.], v. 315, n. 5819, p. 1709–1712, 2007.
- BEARDMORE, J. Transgenics: autotransgenics and allotransgenics. **Transgenic Research**, [s. l.], 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**, [s. l.], v. 86, n. 8, p. 1886-1896.e1, 2016.
- BLECK, G T *et al.* Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs. **Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 76, n. 12, p. 3072, 1998.
- BOCH, J. *et al.* Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. **Science**, [s. l.], v. 326, n. 5959, p. 1509–1512, 2009.
- BOCK, Christoph *et al.* High-content CRISPR screening. **Nature Reviews Methods Primers**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 8, 2022.
- BODAI, Zsolt *et al.* Targeting double-strand break indel byproducts with secondary guide RNAs improves Cas9 HDR-mediated genome editing efficiencies. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 2351, 2022.
- BOLOTIN, A; QUINQUIS, B; SOROKIN, A; EHRLICH, S D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, [s. l.], v. 151, n. 8, p. 2551–2561, 2005.
- BRINKMAN, Eva K. *et al.* Kinetics and Fidelity of the Repair of Cas9-Induced Double-Strand DNA Breaks. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 70, n. 5, p. 801-813.e6, 2018.

- CARLSON, D. F. *et al.* Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 43, p. 17382–17387, 2012.
- CARLSON, Daniel F *et al.* Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 479–481, 2016.
- CEBRIAN-SERRANO, Alberto; DAVIES, Benjamin. CRISPR-Cas orthologues and variants: optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools. **Mammalian Genome**, [s. l.], v. 28, n. 7–8, p. 247–261, 2017.
- CHAN, Yau-Tuen *et al.* CRISPR-Cas9 library screening approach for anti-cancer drug discovery: overview and perspectives. **Theranostics**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 3329–3344, 2022.
- CHANDRASEGARAN, Srinivasan; CARROLL, Dana. Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 428, n. 5, p. 963–989, 2016.
- CHATTERJEE, Pranam; JAKIMO, Noah; JACOBSON, Joseph M. Minimal PAM specificity of a highly similar SpCas9 ortholog. **Science Advances**, [s. l.], v. 4, n. 10, 2018.
- CHEN, Fengqian; ALPHONSE, Martin; LIU, Qi. Strategies for nonviral nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 therapeutics. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 3, 2020.
- CHO, Seung Woo *et al.* Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 230–232, 2013.
- CHRISTIAN, M. *et al.* Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. **Genetics**, [s. l.], v. 186, n. 2, p. 757–761, 2010.
- CHU, Van Trung *et al.* Efficient CRISPR-mediated mutagenesis in primary immune cells using CrispRGold and a C57BL/6 Cas9 transgenic mouse line. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 113, n. 44, p. 12514–12519, 2016.
- CHUAI, Guo-hui; WANG, Qi-Long; LIU, Qi. In Silico Meets In Vivo: Towards Computational CRISPR-Based sgRNA Design. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 12–21, 2017.
- CONG, L. *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, [s. l.], v. 339, n. 6121, p. 819–823, 2013.

- DAMAK, Sami *et al.* Improved Wool Production in Transgenic Sheep Expressing Insulin-like Growth Factor 1. **Bio/Technology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 185–188, 1996.
- DELTCHEVA, Elitza *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, [s. l.], v. 471, n. 7340, p. 602–607, 2011.
- DENNING, C. *et al.* No Title. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 559–562, 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**, [s. l.], v. 106, n. 9, p. 3047–3052, 2009.
- DOENCH, John G *et al.* Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 184–191, 2016a.
- DOENCH, John G *et al.* Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 184–191, 2016b.
- DOMINGUEZ, Antonia A.; LIM, Wendell A.; QI, Lei S. Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 5–15, 2016.
- DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, [s. l.], v. 346, n. 6213, 2014.
- FUJIHARA, Yoshitaka; IKAWA, Masahito. CRISPR/Cas9-Based Genome Editing in Mice by Single Plasmid Injection. *Em: [S. l.: s. n.]*, 2014. p. 319–336.
- GAJ, Thomas; GERSBACH, Charles A.; BARBAS, Carlos F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 7, p. 397–405, 2013. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779913000875>.
- GAO, Yuanpeng *et al.* Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. **Genome Biology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 13, 2017.
- GAUDELLI, Nicole M. *et al.* Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. **Nature**, [s. l.], v. 551, n. 7681, p. 464–471, 2017.
- GILLMORE, Julian D. *et al.* CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 385, n. 6, p. 493–502, 2021.

- GORDON, J W; RUDDLE, F H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. **Science**, [s. l.], v. 214(, n. 4526, p. 1244-1246., 1981.
- GRISSA, I.; VERGNAUD, G.; POURCEL, C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 35, n. Web Server, p. W52–W57, 2007.
- HAHN, Florian *et al.* An Efficient Visual Screen for CRISPR/Cas9 Activity in *Arabidopsis thaliana*. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 08, 2017.
- HE, Zuyong *et al.* Comparison of CRISPR/Cas9 and TALENs on editing an integrated EGFP gene in the genome of HEK293FT cells. **SpringerPlus**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 814, 2016.
- HILLE, Frank *et al.* The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. **Cell**, [s. l.], v. 172, n. 6, p. 1239–1259, 2018.
- HIROSE, Michiko *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**, [s. l.], v. 7, p. 42476, 2017.
- HOSHIJIMA, Kazuyuki *et al.* Highly Efficient CRISPR-Cas9-Based Methods for Generating Deletion Mutations and F0 Embryos that Lack Gene Function in Zebrafish. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 645-657.e4, 2019.
- HOU, Zhonggang *et al.* Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 110, n. 39, p. 15644–15649, 2013.
- HUTCHINSON, John N; MULLER, William J. Transgenic mouse models of human breast cancer. **Oncogene**, [s. l.], v. 19, n. 53, p. 6130–6137, 2000.
- HWANG, Woong Y *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 227–229, 2013.
- IRION, U.; KRAUSS, J.; NUSSLEIN-VOLHARD, C. Precise and efficient genome editing in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. **Development**, [s. l.], v. 141, n. 24, p. 4827–4830, 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**, [s. l.], v. 169, n. 12, p. 5429–5433, 1987.

IVANOV, Ivan E. *et al.* Cas9 interrogates DNA in discrete steps modulated by mismatches and supercoiling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 117, n. 11, p. 5853–5860, 2020.

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

JAVAID, Nasir; CHOI, Sangdun. CRISPR/Cas System and Factors Affecting Its Precision and Efficiency. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 9, 2021.

JIANG, Fuguo *et al.* Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. **Science**, [s. l.], v. 351, n. 6275, p. 867–871, 2016.

JIANG, Fuguo; DOUDNA, Jennifer A. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. **Annual Review of Biophysics**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 505–529, 2017.

JIN, Li-Fang; LI, Jin-Song. Generation of genetically modified mice using CRISPR/Cas9 and haploid embryonic stem cell systems. **Dong wu xue yan jiu = Zoological research**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 205–213, 2016.

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

JINEK, Martin *et al.* RNA-programmed genome editing in human cells. **eLife**, [s. l.], v. 2, 2013.

JINEK, Martin *et al.* Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. **Science**, [s. l.], v. 343, n. 6176, 2014.

KHALIL, Ahmad M. The genome editing revolution: review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 68, 2020.

KIM, Sojung *et al.* Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. **Genome Research**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 1012–1019, 2014a.

KIM, Sojung *et al.* Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. **Genome Research**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 1012–1019, 2014b.

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**, [s. l.], v. 93, n. 3, p. 1156–1160, 1996.

- KIM, Y G; CHANDRASEGARAN, S; Chimeric restriction endonuclease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [s. l.], v. 91, n. 4, p. 883–887, 1994.
- KLEINSTIVER, Benjamin P. *et al.* High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. **Nature**, [s. l.], v. 529, n. 7587, p. 490–495, 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**, [s. l.], 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**, [s. l.], v. 91, n. 23, p. 11163–11167, 1994b.
- KONSTANTAKOS, Vasileios *et al.* CRISPR–Cas9 gRNA efficiency prediction: an overview of predictive tools and the role of deep learning. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 50, n. 7, p. 3616–3637, 2022.
- KUES, Wilfried A.; NIEMANN, Heiner. Advances in farm animal transgenesis. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 146–156, 2011.
- LAI, Liangxue *et al.* Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 435–436, 2006.
- LAZZERINI-DENCHI, Eros; SFEIR, Agnel. Stop pulling my strings — what telomeres taught us about the DNA damage response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 364–378, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm.2016.43>.
- LEDFORD, Heidi. Salmon is first transgenic animal to win US approval for food. **Nature**, [s. l.], 2015.
- LEDFORD, Heidi. Transgenic salmon nears approval. **Nature**, [s. l.], v. 497, n. 7447, p. 17–18, 2013.
- LIANG, Xiquan *et al.* Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 208, p. 44–53, 2015.
- LIAO, Jin Qi; ZHOU, Guangqian; ZHOU, Yan. Generation of Monoclonal iPSC Lines with Stable Cas9 Expression and High Cas9 Activity. *Em: [S. l.: s. n.]*, 2020. p. 575–588.
- LIEVENS, A. *et al.* Genetically modified animals: Options and issues for traceability and enforcement. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 159–176, 2015a.

- LIEVENS, A. *et al.* Genetically modified animals: Options and issues for traceability and enforcement. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 159–176, 2015b.
- LIEVENS, A. *et al.* Genetically modified animals: Options and issues for traceability and enforcement. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 159–176, 2015c. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415001223>.
- LIU, Xiaoxi *et al.* Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 19675, 2016.
- LIU, Si-Cheng *et al.* Target residence of Cas9-sgRNA influences DNA double-strand break repair pathway choices in CRISPR/Cas9 genome editing. **Genome Biology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 165, 2022.
- LIU, Q.; XIA, Z.; CASE, C. C. Validated Zinc Finger Protein Designs for All 16 GNN DNA Triplet Targets. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 6, p. 3850–3856, 2002.
- LIU, Guanqing; ZHANG, Yong; ZHANG, Tao. Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 18, p. 35–44, 2020.
- LOTTI, Samantha N. *et al.* Modification of the Genome of Domestic Animals. **Animal Biotechnology**, [s. l.], p. 1–13, 2017.
- LYALL, J. *et al.* Suppression of Avian Influenza Transmission in Genetically Modified Chickens. **Science**, [s. l.], v. 331, n. 6014, p. 223–226, 2011.
- MAKAROVA, Kira S. *et al.* Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 67–83, 2020.
- MAKSIMENKO, O G *et al.* Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems. **Acta naturae**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 33–46, 2013.
- MALI, P. *et al.* RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. **Science**, [s. l.], v. 339, n. 6121, p. 823–826, 2013.
- MILLER, J; MCLACHLAN, A D; KLUG, A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 1609–1614, 1985.
- MOHIUDDIN, Muhammad 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**, [s. l.], v. 148, n. 3, p. 1106–1114, 2014.
- MOJICA, Francisco J.M. *et al.* Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. **Journal of Molecular Evolution**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 174–182, 2005.
- MOSCOU, M. J.; BOGDANOVA, A. J. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. **Science**, [s. l.], v. 326, n. 5959, p. 1501–1501, 2009.
- MOURA, Raylene R. *et al.* Dynamics of Recombinant hG-CSF in Transgenic Goat: Preliminary Study in the Founder during Hormonally Induced Lactation. **Animal Biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 10–14, 2013.
- MÜLLER, Maximilian *et al.* Streptococcus thermophilus CRISPR-Cas9 Systems Enable Specific Editing of the Human Genome. **Molecular Therapy**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 636–644, 2016.
- NAKAGAWA, Yoshiko *et al.* Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized oocytes. **BMC Biotechnology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 33, 2015.
- NAKAGAWA, Ryoya *et al.* Structure and engineering of the minimal type VI CRISPR-Cas13bt3. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 82, n. 17, p. 3178-3192.e5, 2022.
- NISHIMASU, Hiroshi *et al.* Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. **Cell**, [s. l.], v. 156, n. 5, p. 935–949, 2014.
- PACESA, Martin *et al.* Structural basis for Cas9 off-target activity. **Cell**, [s. l.], v. 185, n. 22, p. 4067-4081.e21, 2022.
- 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.)**, [s. l.], v. 252, n. 5007, p. 809–817, 1991.
- PINNAPUREDDY, Ashish R. *et al.* Large animal models of rare genetic disorders: sheep as phenotypically relevant models of human genetic disease. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 107, 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)**, [s. l.], v. 151, n. Pt 3, p. 653–663, 2005.
- PROUDFOOT, Chris *et al.* Genome edited sheep and cattle. **Transgenic Research**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 147–153, 2015a.

- PROUDFOOT, Chris *et al.* Genome edited sheep and cattle. **Transgenic Research**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 147–153, 2015b.
- QIAN, Xi *et al.* Production of recombinant human proinsulin in the milk of transgenic mice. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 6465, 2015.
- RAMALINGAM, Sivaprakash *et al.* Generation and Genetic Engineering of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Designed Zinc Finger Nucleases. **Stem Cells and Development**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 595–610, 2013.
- RAMALINGAM, Sivaprakash *et al.* TALEN-mediated generation and genetic correction of disease-specific human induced pluripotent stem cells. **Current gene therapy**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 461–472, 2014.
- RAMIREZ-PHILLIPS, Amanda Catalina; LIU, Dexi. Therapeutic Genome Editing and In Vivo Delivery. **The AAPS Journal**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 80, 2021.
- RAN, F Ann *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 2281–2308, 2013.
- REARDON, Sara. Gene-editing record smashed in pigs. **Nature**, [s. l.], 2015.
- REBAR, E J; PABO, C O. Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 263, n. 5147, p. 671–673, 1994.
- RICHT, Jürgen A *et al.* Production of cattle lacking prion protein. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 132–138, 2007.
- RIESENBERG, Stephan *et al.* Improved gRNA secondary structures allow editing of target sites resistant to CRISPR-Cas9 cleavage. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 489, 2022.
- ROGERS, Christopher S. Engineering Large Animal Species to Model Human Diseases. *Em: CURRENT PROTOCOLS IN HUMAN GENETICS*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2016. p. 15.9.1-15.9.14.
- SANDER, Jeffry D; JOUNG, J Keith. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 347–355, 2014. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt.2842>.
- SAUNDERS, Richard L; FLETCHER, Garth L; HEW, Choy L. Smolt development in growth hormone transgenic Atlantic salmon. **Aquaculture**, [s. l.], v. 168, n. 1–4, p. 177–193, 1998.

- SCHEENEN, W. J. J. M. *et al.* Using Transgenic Animal Models in Neuroendocrine Research. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1163, n. 1, p. 296–307, 2009.
- SCHMID-BURGK, Jonathan L. *et al.* Highly Parallel Profiling of Cas9 Variant Specificity. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 794-800.e8, 2020a.
- SCHMID-BURGK, Jonathan L. *et al.* Highly Parallel Profiling of Cas9 Variant Specificity. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 794-800.e8, 2020b.
- SCOTT, Tristan *et al.* Improved Cas9 activity by specific modifications of the tracrRNA. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 16104, 2019.
- SMITH, J; BERG, J M; CHANDRASEGARAN, S. A detailed study of the substrate specificity of a chimeric restriction enzyme. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 674–681, 1999.
- STERNBERG, Samuel H. *et al.* Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR–Cas9. **Nature**, [s. l.], v. 527, n. 7576, p. 110–113, 2015.
- STERNBERG, Samuel H. *et al.* DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. **Nature**, [s. l.], v. 507, n. 7490, p. 62–67, 2014.
- STRECKER, Jonathan *et al.* Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. **Nature Communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 212, 2019.
- SUN, Ning *et al.* Development of drug-inducible CRISPR-Cas9 systems for large-scale functional screening. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 225, 2019.
- SUN, Bixi; CHEN, Hening; GAO, Xiaoshu. Versatile modification of the CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein system to facilitate in vivo application. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 337, p. 698–717, 2021.
- SWARTHOUT, John T.; RAISINGHANI, Manish; CUI, Xiaoxia. Zinc Finger Nucleases: A new era for transgenic animals. **Annals Of Neurosciences**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2011.
- TEBOUL, Lydia *et al.* Variability in Genome Editing Outcomes: Challenges for Research Reproducibility and Clinical Safety. **Molecular Therapy**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1422–1431, 2020.
- THAKORE, Pratiksha I *et al.* Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. **Nature Methods**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 127–137, 2016.
- TONG, Jia *et al.* Production of recombinant human lysozyme in the milk of transgenic pigs. **Transgenic Research**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 417–419, 2011.

- TRAN, Ngoc Tung *et al.* Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Knockin in Mouse Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. **Cell Reports**, [s. l.], v. 28, n. 13, p. 3510–3522.e5, 2019.
- VAKULSKAS, Christopher A. *et al.* A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 1216–1224, 2018.
- VAN EENENNAAM, Alison L. *et al.* Genetic Engineering of Livestock: The Opportunity Cost of Regulatory Delay. **Annual Review of Animal Biosciences**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 453–478, 2021.
- WANG, Haoyi *et al.* A brief review of genome editing technology for generating animal models. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 123, 2020.
- WANG, Jun *et al.* An overview and metanalysis of machine and deep learning-based CRISPR gRNA design tools. **RNA Biology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 13–22, 2020.
- WANG, Tim *et al.* Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System. **Science**, [s. l.], v. 343, n. 6166, p. 80–84, 2014a.
- WANG, Tim *et al.* Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System. **Science**, [s. l.], v. 343, n. 6166, p. 80–84, 2014b.
- WANG, Haifeng; LA RUSSA, Marie; QI, Lei S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 227–264, 2016.
- WEN, Wei; ZHANG, Xiao-Bing. CRISPR–Cas9 gene editing induced complex on-target outcomes in human cells. **Experimental Hematology**, [s. l.], v. 110, p. 13–19, 2022.
- WHEELER, M B; BLECK, G T; DONOVAN, S M. Transgenic alteration of sow milk to improve piglet growth and health. **Reproduction (Cambridge, England) Supplement**, [s. l.], v. 58, p. 313–324, 2001.
- WHITELAW, C Bruce A *et al.* Engineering large animal models of human disease. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 238, n. 2, p. 247–256, 2016.
- WONG, Nathan; LIU, Weijun; WANG, Xiaowei. WU-CRISPR: characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system. **Genome Biology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 218, 2015.
- WU, Xia *et al.* Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids. **Transgenic Research**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 537–543, 2012.

- WU, Haibo *et al.* TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 112, n. 13, p. E1530–E1539, 2015.
- XU, Xiaojun; DUAN, Dongsheng; CHEN, Shi-Jie. CRISPR-Cas9 cleavage efficiency correlates strongly with target-sgRNA folding stability: from physical mechanism to off-target assessment. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 143, 2017.
- YANG, Weili *et al.* Genetically modified large animal models for investigating neurodegenerative diseases. **Cell & Bioscience**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 218, 2021.
- YANG, Ruiguo *et al.* Monoclonal Cell Line Generation and CRISPR/Cas9 Manipulation via Single-Cell Electroporation. **Small**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1702495, 2018.
- YANG, Mengyi *et al.* The Conformational Dynamics of Cas9 Governing DNA Cleavage Are Revealed by Single-Molecule FRET. **Cell Reports**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 372–382, 2018.
- YU, Xin *et al.* Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 919–929, 2016.
- ZETSCHE, Bernd *et al.* Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. **Cell**, [s. l.], v. 163, n. 3, p. 759–771, 2015.
- ZETSCHE, Bernd *et al.* Multiplex gene editing by CRISPR–Cpf1 using a single crRNA array. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 31–34, 2017.
- ZHANG, Xiao-Hui *et al.* Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s. l.], v. 4, p. e264, 2015.
- ZHAO, Ziyi *et al.* Review of applications of CRISPR-Cas9 gene-editing technology in cancer research. **Biological Procedures Online**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 14, 2021.

Anexo I

Molecular Biotechnology
<https://doi.org/10.1007/s12033-018-0112-5>

ORIGINAL PAPER



Easy In Vitro Synthesis of Optimised Functioning Reporter mRNA from Common eGFP Plasmid

Gustavo Torres de Souza^{1,2} · Rafaela Chitarra Rodrigues Hell¹ · Jéssica Fernanda da Silva Souza¹ · Luiz Sérgio de Almeida Camargo¹

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

The extensive growth in number and importance of experiments and clinical-aimed techniques based solely or majorly on the activity of RNA strands, e.g. CRISPR/Cas9 and siRNA, has put emphasis on the necessity of standardisation of experiments with RNA. Considering RNA degradation during its handling seems to be a major hindrance in all RNA-based tools, the assessment of its integrity is of utmost importance. Furthermore, evaluating whether the RNA to be transfected is intact requires time-consuming electrophoresis protocol. In view of the RNA lability and the necessity for controlling experiments performed with this molecule, the transfection of a reporter mRNA may be of aid in optimising experiments. Nevertheless, commercial reporter mRNAs are far less available than plasmids for such purpose. Thus, in this work, we aimed at the optimisation of an easily performed protocol to produce a suitable eGFP mRNA. By utilising molecular biology kits customarily employed in molecular biology laboratories working with RNA-based techniques and starting from any eGFP coding vector, we produced four mRNA molecules: (1) eGFP mRNA (non-polyadenylated); (2) Kozak-eGFP mRNA (non-polyadenylated, produced from the Kozak-containing amplicon); (3) eGFP-PolyA mRNA (polyadenylated); (4) Kozak-eGFP-PolyA mRNA (containing both signals, Kozak sequence and poly(A) tail). These mRNA molecules were transfected into HEK 293 FT cells, readily transfectable, and into the MDBK bovine lineage, which has been observed as difficult-to-transfect DNA constructs. eGFP expression could be detected both by flow cytometry and by fluorescence microscopy after transfection with the polyadenylated mRNAs. Upon cytometric analysis, we noted a marked difference among the mRNA groups ($p < 0.01$), both in fluorescent population percentage and in fluorescence intensity. We showed here the necessity of the polyadenylation step in order to achieve cell expression of the eGFP observable under fluorescence microscopy. The presence of the Kozak sequence, as a 5' element, seems to augment significantly the level of protein produced upon mRNA transfection. We presented here an easy protocol to allow production of functioning mRNAs from any DNA construct. The molecules produced may aid in the standardisation and controlling most of the RNA-related experiments as well as it gives proper guidance for researchers performing expression of other proteins through mRNA transfection.

Keywords mRNA · eGFP · GFP · CRISPR/Cas9 · Kozak · Sequence

Introduction

Handling ribonucleic acid (RNA) polymers has been long regarded as troublesome, given the considerable lability those molecules present due to their characteristic propensity to hydrolysis along with the ubiquity of ribonucleases (RNases), which are highly active in aqueous solution [1–4]. Notwithstanding, transfecting specific RNA fragments has become an increasingly common requisite to perform experiments involving important techniques recently added to the molecular biology arsenal. Namely genomic editing tools, such as the Cas9 associated with clustered regularly

Gustavo Torres de Souza and Rafaela Chitarra Rodrigues Hell contributed equally for the work.

* Gustavo Torres de Souza
 Gustavotousoza@hotmail.com

¹ EMBRAPA (Brazilian Agricultural Research Corporation), Av. Eugênio do Nascimento, 610 - Aeroporto, Juiz de Fora, MG 36038-330, Brazil

² UFJF (Federal University of Juiz de Fora), Juiz de Fora, Brazil

Published online: 17 August 2018

Anexo II

Silva et al. *Applied Microscopy* (2021) 51:6
<http://doi.org/10.1186/s42649-021-00055-w>

Applied Microscopy

RESEARCH

Open Access

Fractal dimension analysis as an easy computational approach to improve breast cancer histopathological diagnosis



Lucas Glaucio da Silva¹, Waleka Rayanne Sizinia da Silva Monteiro¹, Tiago Medeiros de Aguiar Moreira², Maria Aparecida Esteves Rabelo¹, Emilio Augusto Campos Pereira de Assis^{1,3} and Gustavo Torres de Souza^{2,4*}

Abstract

Histopathology is a well-established standard diagnosis employed for the majority of malignancies, including breast cancer. Nevertheless, despite training and standardization, it is considered operator-dependent and errors are still a concern. Fractal dimension analysis is a computational image processing technique that allows assessing the degree of complexity in patterns. We aimed here at providing a robust and easily attainable method for introducing computer-assisted techniques to histopathology laboratories. Slides from two databases were used: A) Breast Cancer Histopathological; and B) Grand Challenge on Breast Cancer Histology. Set A contained 2480 images from 24 patients with benign alterations, and 5429 images from 58 patients with breast cancer. Set B comprised 100 images of each type: normal tissue, benign alterations, in situ carcinoma, and invasive carcinoma. All images were analyzed with the Fractalac algorithm in the ImageJ computational environment to yield the box count fractal dimension (Db) results. Images on set A on 40x magnification were statistically different ($p = 0.0003$), whereas images on 400x did not present differences in their means. On set B, the mean Db values presented promising statistical differences when comparing Normal and/or benign images to in situ and/or invasive carcinoma (all $p < 0.0001$). Interestingly, there was no difference when comparing normal tissue to benign alterations. These data corroborate with previous work in which fractal analysis allowed differentiating malignancies. Computer-aided diagnosis algorithms may benefitate from using Db data; specific Db cut-off values may yield ~99% specificity in diagnosing breast cancer. Furthermore, the fact that it allows assessing tissue complexity, this tool may be used to understand the progression of the histological alterations in cancer.

Keywords: Histopathology, Computer-aided diagnosis, Breast cancer, And fractal dimension

* Correspondence: gustavotdsouza@gmail.com

¹Department of Biology - Genetics - Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brazil

²Center for Investigation and Diagnosis of Pathological Anatomy, Avenida Itamar Franco, Juiz de Fora, Minas Gerais 4001 - 36033-318, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.