



Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Edição genômica utilizando a ferramenta CRISPR/Cas9 em
células e embriões para inserção de genes de interesse no
locus H11 no genoma bovino

MELISSA SHIZUE DE ALMEIDA YAMASHITA

BRASÍLIA – DF

FEVEREIRO 2025



Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Edição genômica utilizando a ferramenta CRISPR/Cas9 em
células e embriões para inserção de genes de interesse no
locus H11 no genoma bovino

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em
Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília, como parte integrante dos
requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia
Animal

Orientação: Dr. Eduardo de Oliveira Melo

BRASÍLIA – DF

FEVEREIRO 2025

“A esperança tem duas filhas lindas, a indignação e a coragem: a indignação nos ensina a não aceitar as coisas como estão; a coragem, a mudá-las”

Santo Agostinho

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, expresso minha profunda gratidão a Deus e à Nossa Senhora, por me guiarem e iluminarem em minha trajetória. Sou imensamente grata por todas as bênçãos e conquistas que obtive, pela força necessária para superar os obstáculos, pelo conforto nos momentos desafiadores e por todo o sustento que recebi.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Eduardo Melo, cuja dedicação e paciência foram fundamentais para o meu desenvolvimento. Sua disponibilidade em ajudar e ensinar, aliada à compreensão e ao incentivo nos momentos difíceis, foi crucial para minha formação como cientista. Sou verdadeiramente grata por sua colaboração inestimável.

Aos meus pais, agradeço de coração por todo o amor e confiança que sempre me ofereceram. O apoio incondicional, a paciência e a crença em meus sonhos foram pilares fundamentais em minha vida. Vocês sempre foram minha base e fonte de força, e sem o suporte de vocês, essa caminhada não seria possível.

Aos meus irmãos, agradeço pelo apoio constante, pelo companheirismo e pelas alegrias compartilhadas que trouxeram leveza aos momentos difíceis. O amor de vocês é um presente inestimável.

Ao meu noivo, sou grata por seu apoio e palavras de incentivo. Sua compreensão em relação à minha ausência, devido ao tempo dedicado aos estudos, e seu esforço em se fazer presente, mesmo à distância, foram fundamentais para que eu pudesse seguir em frente.

Agradeço também a todos os meus amigos que, de alguma forma, contribuíram para esta jornada, oferecendo apoio e força. À minha equipe de trabalho e aos colegas de pesquisa, sou profundamente grata pela colaboração e assistência ao longo deste período tão significativo de minha formação acadêmica. Quero também agradecer especialmente às minhas amigas do LRA, cuja amizade e apoio tornaram este doutorado mais leve e agradável, trazendo momentos de descontração e motivação.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão ao laboratório do Dr. Ky Pohler, da Texas A&M University, pelo acolhimento e suporte durante o período de doutorado sanduíche. Agradeço ao Dr. Pohler por sua orientação e valioso apoio ao longo de minha estadia. Também estendo meus agradecimentos à Dra. Sofia

Ortega e a sua equipe na University of Wisconsin-Madison pela colaboração frutífera. Por fim, sou grata à CAPES pela oportunidade concedida, permitindo a realização desta importante experiência acadêmica.

A todos, meu sincero agradecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O Brasil possui o maior rebanho comercial bovino do mundo com mais de 210 milhões de cabeças de gado, além de ser atualmente o maior exportador de carne bovina. Com o crescimento dessa atividade econômica também é crescente a demanda para o emprego de tecnologias avançadas, entre elas a produção de animais geneticamente modificados (AGM) que venham a abordar problemas desde aumento da produtividade até sanidade animal. Com esse projeto, intencionamos investigar o uso do sistema CRISPR/Cas9 como modelo para estabelecimento de uma metodologia de edição genômica visando a inserção (*knock-in*) direta de genes de interesse biotecnológico, agropecuário, ou industrial no *locus* H11 do genoma bovino (*Bos taurus*). Esse estudo analisou em células bovinas a capacidade do sistema CRISPR/Cas9 em inserir cassetes de expressão de um gene repórter (eGFP) em um sítio específico e seguro do genoma, denominado *locus* H11. Diversos RNA guias foram testados e avaliados quanto sua capacidade de gerar INDELS por meio do ensaio com T7E1 e confirmados com sequenciamento do tipo Sanger. Também foi avaliado o uso de estimuladores e inibidores que poderiam auxiliar no *knock-in*, como o SCR7 (inibidor da DNA ligase IV), RS-1 (estimulador da Rad51) e L755507 (agonista do receptor β -3 adrenérgico). Em uma segunda fase, foi realizada eletroporação do sistema CRISPR/Cas9 diretamente em zigotos bovinos. Nos zigotos bovinos, foi realizado eletroporação do complexo núcleo-proteico CRISPR/Cas9 (gRNA + proteína Cas9) e do cassete de expressão do eGFP linear, com posterior observação da expressão do gene eGFP nos embriões. Além disso, foi amplificado por PCR a região em que o guia direciona clivagem e realizado sequenciamento do tipo Sanger de tal região para avaliar a ocorrência de INDELS. Os resultados obtidos demonstraram avanços, com a escolha das células MAC-T e a otimização do protocolo de transfecção, o que contribuiu para maior eficiência e viabilidade celular. A utilização do guia Bi5 mostrou potencial, enquanto os compostos RS-1 e L755507 tiveram impacto positivo na inserção do gene eGFP, evidenciando seu potencial para otimizar a recombinação por microhomologia. A inserção do gene em células foi bem sucedida, mas acompanhada de uma inserção inesperada de DNA satélite bovino, ressaltando

a complexidade do sistema CRISPR/Cas9. Nos embriões, não foi observada inserção do gene eGFP, sugerindo que ajustes no protocolo experimental são necessários. Esse estudo busca, portanto, a incorporação dos mais recentes avanços no campo da edição genômica direta em genomas complexos como o de mamíferos para criação de soluções inovadoras para biotecnologia animal, como a introdução de genes em um *locus* específico e seguro do genoma bovino.

Palavras-chave: Biotecnologia; Edição Gênica; Biologia Animal; Genética Animal; Transgenia Animal

ABSTRACT

Brazil has the world's largest commercial cattle herd, with over 210 million heads, and is currently the largest exporter of beef. As this economic activity grows, so does the demand for the application of advanced technologies, including the production of genetically modified animals (GMAs) to address issues ranging from increased productivity to animal health. This project aims to investigate the use of the CRISPR/Cas9 system as a model for establishing a genome editing methodology aimed at the direct insertion (*knock-in*) of biotechnological, agricultural, or industrial genes of interest into the H11 *locus* of the bovine genome (*Bos taurus*). This study analyzed the capability of the CRISPR/Cas9 system in bovine cells to insert expression cassettes of a reporter gene (eGFP) into a specific and safe site of the genome, known as the H11 *locus*. Several guide RNAs were tested and evaluated for their ability to generate INDELs through a T7E1 assay, confirmed by Sanger sequencing. The use of stimulators and inhibitors that could improve *knock-in*, such as SCR7 (DNA ligase IV inhibitor), RS-1 (Rad51 stimulator), and L755507 (β -3 adrenergic receptor agonist), was also assessed. In a second phase, electroporation of the CRISPR/Cas9 system was carried out directly in bovine zygotes. The CRISPR/Cas protein complex (gRNA + Cas9 protein) and the linear eGFP expression cassette were electroporated into bovine zygotes, with subsequent observation of eGFP gene expression in the embryos. Additionally, the region targeted by the guide was amplified by PCR, and Sanger sequencing of this region was performed to assess the occurrence of INDELs. The results obtained showed progress, with the selection of MAC-T cells and optimization of the transfection protocol, which contributed to increased efficiency and cell viability. The use of the Bi5 guide demonstrated potential, while the compounds RS-1 and L755507 had a positive impact on the insertion of the eGFP gene, highlighting their potential to optimize microhomology driven recombination. The gene insertion in cells was successful but accompanied by an unexpected insertion of bovine satellite DNA, emphasizing the complexity of the CRISPR/Cas9 system. In embryos, no insertion of the eGFP gene was observed, suggesting that adjustments to the experimental protocol are necessary. Thus, this study seeks

to incorporate the latest advancements in the field of direct genome editing of complex genomes like mammals to create innovative solutions for animal biotechnology, such as the introduction of genes into a specific and safe locus of the bovine genome.

Key words: Biotechnology; Gene Editing; Animal Biology; Animal Genetics; Transgenic Animal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ferramentas de edição genômica. a) Meganucleases: enzimas de restrição com alta especificidade para sequências-alvo. b) ZNF: nucleases baseadas em dedos de zinco. c) TALENs: nuclease criada a partir de fatores de transcrição.....	27
Figura 2. A figura ilustra o mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas9, no qual a proteína Cas9 é dirigida por uma sequência de RNA guia (gRNA) para um local específico do DNA, resultando na indução de uma quebra na dupla fita do DNA.....	30
Figura 3. Mecanismos de reparo do DNA e a atuação dos fatores SCR7, RS1 e L755507. A figura ilustra os mecanismos de reparo de DSB no DNA: a NHEJ, que pode gerar INDELS; a HDR, que utiliza a cromátide irmã como molde para um reparo preciso; e a MMJE, que, embora utilize sequências curtas de homologia, é propensa a erros, frequentemente resultando em deleções, inserções e translocações cromossômicas. Os fatores SCR7, RS1 e L755507 são representados com suas respectivas funções: SCR7 inibe a DNA ligase IV, RS1 estimula a proteína Rad51, e L755507 modula a via de reparo, embora o mecanismo exato ainda não esteja completamente elucidado.	32
Figura 4. Sistema PITCh v2: utiliza a tecnologia Cas9 para gerar DSB tanto no vetor doador quanto no local alvo no genoma, com o objetivo de integrar um transgene no local desejado. São utilizados guias para a sequência PITCh e para a sequência alvo no genoma. A Cas9 cliva a sequência PITCh no vetor doador, liberando a sequência de interesse flanqueada por microhomologia (mh), o que ativa a via de junção mediada por microhomologia para promover a integração do transgene.	36
Figura 5. Principais técnicas para introduzir o sistema CRISPR em células e embriões. A figura apresenta os sistemas virais (como o vírus adeno-associado e lentivírus), métodos químicos não virais (como lipossomos, nanopartículas, peptídeos penetrantes de células, nanopartículas de ouro e políplexos) e métodos físicos (como microinjeção e eletroporação).	37
Figura 6. Mecanismo de ação do ensaio de T7E1. Após a amplificação por PCR da região alvo do gRNA, as fitas de DNA mutado e não mutado podem formar heteroduplexes, contendo mismatch na região da mutação. A enzima T7E1 reconhece essas imperfeições na dupla hélice e realiza a clivagem nos pontos de despareamento, gerando fragmentos de DNA. Esses fragmentos podem ser analisados por eletroforese, permitindo a detecção de INDELS.....	51
Figura 7. a) Representação esquemática do locus H11, flanqueado pelos genes DRG1 e EIF4ENIF1 no cromossomo 17 bovino, e o conjunto de primers utilizados no presente trabalho. b) Representação esquemática aproximada de onde os primers e guias anelam.	54
Figura 8. Métodos testados para isolamento de linhagens clonais editadas. a) as células isoladas eram marcadas para isolamento. b) Isolamento de linhagem clonal utilizando cilindros de vidro. c) Isolamento de linhagem clonal utilizando filtros clonais.....	55
Figura 9. a) Placa com 3 gotas de OPTI-MEM e as 2 gotas da solução RNP. b) Placa da eletroporação.	61
Figura 10. Processo de eletroporação.....	62
Figura 11. Construção esquemática do vetor pX330E. O vetor foi construído a partir do pX330A-1x2 digerido com BsaI e do fragmento PITCh retirado do vetor	

pX330S-2-PITCh por digestão com BsaI. A sequência codificadora do gRNA PITCh está destacada em vermelho.	66
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose. a) Digestão com Apal, com o poço 1 representando o vetor pX330E, o poço 2 o vetor pX330A 1x2 e o poço 3 o vetor pX330S-2-PITCh. b) Digestão com PstI, com os poços 1 a 5 correspondendo ao pX330E e o poço 6 ao pX330A 1x2.	67
Figura 13. Imagem esquemática do locus H11 e a localização dos 9 guias desenhados.....	68
Figura 14. a) Representação esquemática do amplicon contendo a sequência PITCh, a microhomologia ao locus H11 e o cassete de expressão do eGFP. b) Resultados de eletroforese em gel de agarose do amplicon.....	68
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose. a) Digestão com EcoRI. b) Digestão com PstI.	69
Figura 16. Alinhamento do sequenciamento da região do H11. MACT são as células MAC-T, MDBK as células MDBK, CUM são células de cumulus e FIB para células de fibroblastos.....	72
Figura 17. Amplicon FR3 (614 pb). a) Eletroforese em gel de agarose mostrando a PCR da região do H11 amplificado a partir do gDNA de fibroblastos bovinos. b) Em azul a localização esquemática do amplicon.....	73
Figura 18. Amplicon F5R5 (513 pb). a) Eletroforese em gel de agarose mostrando a PCR da região do H11 amplificado a partir do gDNA de células MAC-T. b) Em azul a localização esquemática do amplicon.....	73
Figura 19. Amplicon F10R10 (567 pb). a) Eletroforese em gel de agarose mostrando a PCR da região do H11 amplificado a partir do gDNA de células MAC-T. b) Em azul a localização esquemática do amplicon.....	73
Figura 20. Eletroforese em gel de agarose contendo as digestões com a enzima T7E1 em diferentes concentrações. a) teste comparando o uso de 5U e 10U de T7E1 para 200ng do amplicon, sendo o poço 1 - 10U de T7E1, o poço 2 - 5U de T7E1 e o poço 3 - controle não digerido. b) teste comparando 5U e 10U de T7E1 com 200ng do amplicon e 300ng do amplicon digerido com 5U de T7E1. Poço 1 – controle não digerido, poço 2 – 200ng DNA com 5U de T7E1, poço 3 – 200ng DNA com 10U de T7E1 e poço 5 – 300ng DNA com 5U de T7E1. c) teste comparando uso de 5U e 2U de T7E1 para 300ng do amplicon, sendo o poço 1 - controle não digerido, o poço 2 - 5U de T7E1 e o poço 3 - 2U de T7E1.....	74
Figura 21. Eletroforese em gel de agarose contendo as digestões com 5U da enzima T7E1 e diferentes tempos de incubação. a) teste utilizando 30 minutos de incubação. Poço 1 - controle não digerido e poço 2 – fragmento digerido. b) teste utilizando 15 minutos de incubação. Poço 1 - controle não digerido e poço 2 – fragmento digerido. c) teste utilizando 30 minutos de incubação. d) teste utilizando 60 minutos de incubação.	75
Figura 22. Células de cumulus transfectadas com pEF-GFP sobre luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x (primeira e terceira imagens) e de 10x (segunda e quarta imagens).....	76
Figura 23. Fibroblastos bovinos transfectados com o vetor pEF-GFP, observados sob luz visível e luz UV. a) Controle negativo não transfectados, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. b) Transfecção realizada utilizando Lipofectamine LTX, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. c) Transfecção realizada utilizando Xfect, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. As fotografias foram capturadas	

utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.	77
Figura 24. Células MDBK transfectadas com o vetor pEF-GFP, observados sob luz visível e luz UV. a) Controle negativo não transfectados, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. b) Transfecção realizada utilizando Lipofectamine 2000, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. c) Transfecção realizada utilizando Xfect, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.	79
Figura 25. Eletroforese em gel de agarose mostrando a digestão com a enzima T7E1 do amplicon FR3, proveniente de células de cumulus. À esquerda do marcador, estão os fragmentos de PCR não digeridos pela enzima T7E1 (controle), enquanto à direita estão os fragmentos digeridos.	80
Figura 26. Eletroforese em gel de agarose mostrando a digestão com a enzima T7E1 do amplicon FR3, proveniente de células MDBK. O primeiro poço contém o controle positivo, com o fragmento FR3 das células de cumulus. O segundo e terceiro poços correspondem ao controle negativo, com gDNA de células não transfectadas, sendo o segundo poço não digerido e o terceiro digerido com T7E1. O quarto e quinto poços apresentam células transfectadas com o guia Bi1b, com o quarto poço não digerido e o quinto digerido. O sexto e sétimo poços mostram células transfectadas com o guia Bi2, sendo o sexto poço não digerido e o sétimo digerido. Finalmente, o oitavo e nono poços contêm células transfectadas com o guia Bi4, com o oitavo poço não digerido e o nono digerido.	81
Figura 27. Eletroforese em gel de agarose mostrando a digestão com a enzima T7E1 do amplicon FR3, proveniente de fibroblastos bovinos. O poço 1 contém o controle negativo, que é o gDNA não transfectado, não digerido com T7E1, enquanto o poço 2 apresenta o mesmo gDNA não transfectado, mas digerido com T7E1. Os poços 3 e 4 correspondem a gDNA transfectado com o gRNA Bi1b, com o poço 3 contendo o amplicon não digerido e o poço 4 apresentando o amplicon digerido com T7E1.	82
Figura 28. Células MAC-T transfectadas com o vetor pEF-GFP, observados sob luz visível e luz UV. a) Controle negativo não transfectados, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV b) Transfecção utilizando Lipofectamine 2000, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. c) Transfecção utilizando Lipofectamine LTX, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. d) Transfecção utilizando Xfect, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.	84
Figura 29. Células MAC-T transfectadas com o vetor pEF-GFP e o reagente Xfect, observadas sob luz visível e luz UV. a) Transfecção realizada sem a adição de SFB no meio de transfecção. b) Transfecção realizada utilizando 10% de SFB no meio de transfecção. c) Transfecção realizada com 20% de SFB no meio de transfecção. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.	85
Figura 30. Análise de digestão com a enzima T7E1 em células MAC-T. No poço 1, encontra-se o fragmento de PCR não digerido com a enzima T7E1 (controle negativo). No poço 2 está o fragmento proveniente de células de cumulus, que	

foi utilizado como controle positivo para a digestão. No 3 a digestão com células não transfectadas. Em seguida, são apresentadas as digestões realizadas com células transfectadas com os guias Bi1b e Bi2 (poços 4 e 5).....	86
Figura 31. Digestão com a enzima T7E1 dos amplicons provenientes das transfecções em células MAC-T. Poço 1: controle positivo, utilizando o fragmento FR3 de células do cumulus. Poço 2: controle negativo, representando o amplicon F5R5 de células não transfectadas. Poço 3: amplicon F5R5 de células transfectadas com o guia Bi5. Poço 4: amplicon F5R5 de células transfectadas com o guia Bi6. Poço 5: controle negativo do amplicon F10R10 de células não transfectadas. Poço 6: amplicon F10R10 de células transfectadas com o guia BMC. Poço 7: amplicon F10R10 de células transfectadas com o guia Bi7. As bandas esperadas estão destacadas em vermelho.	88
Figura 32. Alinhamento do sequenciamento dos 25 clones. A região em verde na parte superior do alinhamento indica a sequência reconhecida pelo gRNA Bi5, enquanto a sequência em vermelho destaca o sítio PAM. A primeira linha corresponde à sequência selvagem, não editada, servindo como referência para comparação com os clones sequenciados. O software realiza o alinhamento do sequenciamento dos clones, mostrando a ocorrência de INDELS.	89
Figura 33. Representação esquemática da inserção do gene eGFP no locus H11. a) O fragmento H11-GFP UP, representado em azul. b) O fragmento H11-GFP DOWN, também destacado em azul.....	91
Figura 34. Amplificação por PCR dos fragmentos H11-GFP UP e H11-GFP DOWN. Poço 1: Controle negativo DOWN. Poço 2: Controle negativo UP. Poços 3, 4 e 5: Fragmento DOWN. Poço 6: Fragmento UP.	92
Figura 35. Alinhamento das sequências obtidas de quatro clones UP com a sequência de referência do eGFP inserido no locus H11. No alinhamento, as regiões de microhomologia, estão destacadas em rosa. A sequência PITCh é evidenciada em azul. Já em amarelo, observa-se uma sequência adicional, posteriormente identificada como DNA satélite bovino por análise de similaridade (BLAST). Em negrito na sequência referência, a construção do eGFP. Sublinhado corresponde ao locus H11.....	93
Figura 36. Resultado da análise BLAST da sequência adicional identificada nos clones 1, 2 e 3. BLAST gerado utilizando o NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).	94
Figura 37. Alinhamento das sequências obtidas de quatro clones com a sequência de referência do eGFP inserido no locus H11. No alinhamento, as regiões de microhomologia, estão destacadas em rosa. Em negrito na sequência referência, a construção do eGFP. Sublinhado corresponde ao locus H11	97
Figura 38. Células MAC-T não transfectadas (controle negativo), observados sob luz visível e luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.....	99
Figura 39. Células MAC-T transfectadas com o vetor pEF-GFP (controle positivo da transfecção), observados sob luz visível e luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.	100
Figura 40. Células MAC-T transfectadas com o vetor pX330E + Bi5 e o vetor pGEM+PITCh-Bi5-GFP, observados sob luz visível e luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.	101

Figura 41. Células MAC-T transfectadas com o vetor pX330E + Bi5 e o vetor pGEM+PiTCh-Bi5-GFP com adição de 80 μ M de SCR7, observados sob luz visível e luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.....	102
Figura 42. Células MAC-T transfectadas com o vetor pX330E + Bi5 e o vetor pGEM+PiTCh-Bi5-GFP com adição de 15 μ M de RS-1, observados sob luz visível e luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.....	103
Figura 43. Células MAC-T transfectadas com o vetor pX330E + Bi5 e o vetor pGEM+PiTCh-Bi5-GFP com adição de 20 μ M de L755507, observados sob luz visível e luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.....	104
Figura 44. Quantificação da inserção do eGFP no locus H11 utilizando qPCR nos diferentes grupos experimentais. O gráfico apresenta a comparação entre o grupo controle (sem fatores), o grupo tratado com SCR7, o grupo tratado com RS-1 e o grupo tratado com L755507. Os grupos foram comparados pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$) e são apresentados como médias $\pm$ desvio padrão....	106
Figura 45. Imagens dos ovócitos maturados, da clivagem em D3 e do blastocisto em D8 das réplicas do experimento de eletroporação.	109
Figura 46. Análise da PCR do amplicon F5R5 utilizando diferentes volumes de lisado. Poço 1: Marcador 1Kb. Poço 2: Controle negativo da PCR. Poço 3: PCR utilizando 5 μ L do teste 1. Poço 4: PCR utilizando 3 μ L do teste 1. Poço 5: PCR utilizando 5 μ L do teste 2. Poço 6: PCR utilizando 4 μ L do teste 2. Poço 7: PCR utilizando 5 μ L do teste 3. Poço 8: PCR utilizando 7 μ L do teste 3.	113
Figura 47. Análise da PCR do fragmento F5R5 de 68 embriões.....	114
Figura 48. Alinhamento do sequenciamento dos 64 embriões. A região em verde na parte superior do alinhamento indica a sequência reconhecida pelo gRNA Bi5, enquanto a sequência em vermelho destaca o sítio PAM. A primeira linha corresponde à sequência selvagem, usada como referência.....	116
Figura 49. Análise da geração de INDELS dos 64 embriões sequenciados com sucesso.	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Padrão de digestão dos vetores com as enzimas Apal e PstI.....	67
Tabela 2. Padrão de digestão dos vetores com as enzimas EcoRI e PstI.....	70
Tabela 3. Resultado dos ensaios para isolar linhagens clonais editadas.....	90
Tabela 4. Dados do número de embriões eletroporados, taxa de clivagem e taxa de blastocisto.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS

AGM	Animal Geneticamente Modificado
<i>Amplicon</i>	Um produto de PCR gerado a partir de um <i>template</i> de DNA
COCs	Complexos cúmulo-ovócito
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (do inglês <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP	Desoxinucleosídeo trifosfato
DSBs	Quebra na dupla fita do DNA (do inglês <i>Double-Strand Breaks</i>)
Et al	E outros (do latim <i>et alii</i>)
eGFP	Gene de fluorescência verde (do inglês <i>enhanced green fluorescent protein</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>)
gDNA	DNA genômico
gRNA	RNA guia, crRNA
HDR	Reparo mediado por homologia (do inglês <i>Homology mediated repair</i>)
HR	Recombinação homóloga (do inglês <i>Homology recombination</i>)
IA	Inteligência artificial
INDELs	Inserções ou deleções
Kb	Kilobase (mil pares de bases)
L755507	Agonista do receptor β -3 adrenérgico
MI	Microinjeção citoplasmática
MMEJ	Junção de extremidades mediada por microhomologia (do inglês <i>Microhomology-Mediated End Joining</i>)
NHEJ	Junção de extremidade não homóloga (do inglês <i>Non-homologous end joining</i>)

OGM	Organismo geneticamente modificado
ORF	Fase de leitura aberta (do inglês <i>Open Reading Frame</i>)
PAM	Motivos adjacentes ao protoespaçador (do inglês <i>Protospacer Adjacent Motifs</i>)
Pb	Pares de base
PCR	Reação da cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PHE	Penicilamina-hipotaurina-epinefrina
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
qPCR	PCR quantitativa (do inglês <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
RNP	Complexos ribonucleoproteicos
RT	Temperatura ambiente (do inglês <i>Room Temperature</i>)
RS-1	Composto estimulador da Rad51
SCR7	Inibidor da DNA ligase IV
SFB	Soro Fetal Bovino
sgRNA	RNA guia quimérico de 100 nucleotídeos composto por crRNA + trackRNA
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SSA	Anelamento de fita simples (do inglês <i>Single Strand Annealing</i>)
TALENs	Efetores pseudo-ativadores de transcrição (do inglês <i>Transcription Activator-Like Effector Nucleases</i>)
TNCS	Transferência Nuclear de Célula Somática
TG	Transgênico
ZNFs	Nucleases dedo de zinco (do inglês <i>Zinc-Finger Nucleases</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1	EVOLUÇÃO DA MANIPULAÇÃO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO	24
2.2	EVOLUÇÃO DAS METODOLOGIAS DE EDIÇÃO GENÔMICA	26
2.3	REPETIÇÕES PALINDRÔMICAS CURTAS AGRUPADAS E REGULARMENTE INTERESPAÇADAS E AS PROTEÍNAS ASSOCIADAS - CRISPR/Cas9	29
2.4	MECANISMOS DE REPARO DO DNA	31
2.5	METODOLOGIA DE INTEGRAÇÃO PRECISA NO CROMOSSOMO ALVO (PITCH)	35
2.6	TÉCNICAS PARA INTRODUIR O SISTEMA CRISPR/CAS9 EM CÉLULAS/EMBRIÕES.....	36
2.7	ELETROPORAÇÃO EM EMBRIÕES BOVINOS	39
2.8	SAFE HARBOR, <i>LOCUS</i> H11	41
2.9	CAPÍTULO DO LIVRO ANIMAL TRANSGENESIS AND CLONING: COMBINED DEVELOPMENT AND FUTURE PERSPECTIVES (YAMASHITA & MELO, 2023) – APÊNDICE 8.3.....	43
3	OBJETIVO	44
3.1	OBJETIVO GERAL.....	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	CONSTRUÇÃO DOS VETORES	45
4.2	CULTIVO CELULAR	49
4.3	TRANSFEÇÃO	49
4.4	OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO DE T7E1.....	50
4.5	SEQUENCIAMENTO E ALINHAMENTO DE REGIÃO DO <i>LOCUS</i> H11 ENTRE OS DIFERENTES TIPOS CELULARES	52
4.6	ANÁLISE MOLECULAR PARA DETECTAR A EFICIÊNCIA DO GRNA EM PROMOVER INDELS NO <i>LOCUS</i> H11.....	52
4.7	ENSAIO DE TRANSFEÇÃO PARA INSERÇÃO DO EGFP NO <i>LOCUS</i> H11 E ISOLAMENTO DE CLONES EDITADOS.....	54
4.8	ANÁLISE MOLECULAR PARA DETECTAR A INSERÇÃO DO EGFP NO <i>LOCUS</i> H11	56
4.9	ENSAIO DE TRANSFEÇÃO PARA INSERÇÃO DO EGFP NO <i>LOCUS</i> H11 COM AUXÍLIO DE SCR7, RS-1 E L755507	57
4.10	QPCR PARA ANALISAR QUAL FATOR AUXILIA NO <i>KNOCK-IN</i> DO EGFP.....	58
4.11	CULTIVO DE EMBRIÕES	59
4.12	PREPARO DOS COMPLEXOS RIBONUCLEOPROTEICOS (RNPs) PARA USO NA ELETROPORAÇÃO DOS EMBRIÕES BOVINOS	60
4.13	ELETROPORAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS COM RNPs.....	60
4.14	LISE DOS EMBRIÕES	62
4.15	ANÁLISE MOLECULAR PARA DETECTAR A EDIÇÃO GÊNICA NO <i>LOCUS</i> H11 NOS EMBRIÕES BOVINOS	63
4.16	ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1	CONSTRUÇÃO DOS VETORES	66
5.2	SEQUENCIAMENTO DE 1014PB DO <i>LOCUS</i> H11 DE CÉLULAS DO CUMULUS, FIBROBLASTOS, MDBK E MAC-T E ALINHAMENTO.	70
5.3	PCR DE REGIÕES DO H11	72
5.4	OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO T7E1	74
5.5	TRANSFEÇÃO COM CÉLULAS DO CUMULUS, FIBROBLASTO E MDBK	76
5.6	ENSAIO DE T7E1 COM CÉLULAS DO CUMULUS, FIBROBLASTOS E MDBK.....	80
5.7	TRANSFEÇÃO COM CÉLULAS MAC-T	83
5.8	AValiação em células MAC-T dos RNAs guias através do ensaio de T7E1	86
5.9	TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS MAC-T PARA INSERÇÃO DO EGFP NO <i>LOCUS</i> H11 E ISOLAMENTO DE CLONES EDITADOS	89

5.10	TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS MAC-T PARA INSERÇÃO DO EGFP NO <i>LOCUS</i> H11 COM A UTILIZAÇÃO DE SCR7, RS-1 E L755507	97
5.11	QUANTIFICAÇÃO DA INSERÇÃO DO EGFP NO <i>LOCUS</i> H11 POR qPCR.....	105
5.12	ELETROPORAÇÃO DO COMPLEXO RNP EM EMBRIÕES BOVINOS.....	108
5.13	TESTE DE VOLUME DO REAGENTE DE LISE EM EMBRIÕES.....	112
5.14	ANÁLISE DE INDELS DOS EMBRIÕES ELETROPORADOS	113
6	CONCLUSÃO	119
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
8	APÊNDICES.....	129
8.1	TABELA DE PRIMERS	129
8.2	MEIOS	132
8.3	CAPÍTULO LIVRO.....	135

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, com seu enorme rebanho e posição de líder global na exportação de carne bovina (<http://agricultura.gov.br>), encontra-se em um cenário ideal para adotar tecnologias avançadas na produção animal, incluindo organismos geneticamente modificados (OGMs), editados e epeditados. O uso de animais geneticamente modificados (AGM) e/ou editados pode ser uma resposta estratégica para os desafios enfrentados pelo setor, como o aumento da produtividade, redução da pegada de carbono, resiliência a mudanças climáticas, otimização do uso do solo e o controle de doenças. A introdução de OGMs na agricultura e na produção animal tem avançado significativamente desde a comercialização do primeiro OGM, o tomate *Flavr-Savr*, em 1994. Desde então, houve uma evolução notável nas técnicas de manipulação genética, que agora abrangem uma série de tecnologias mais sofisticadas, como a edição/epedição genômica.

A edição genômica, uma das tecnologias mais promissoras da atualidade, permite alterações precisas e controladas no DNA de organismos complexos e de relevância agronômica, como plantas e animais. Com essa abordagem, é possível introduzir modificações específicas em genes relacionados a características como produtividade, resistência a doenças e tolerância a estresses ambientais. Exemplos notáveis de animais de produção geneticamente editados incluem aqueles com maior resistência à tuberculose, com maior rendimento de carne na carcaça, ou ainda sem chifres, eliminando a necessidade de intervenções cirúrgicas, promovendo o bem-estar animal. Também foram desenvolvidos animais com características que favorecem o crescimento muscular (gene da miostatina) e a eficiência alimentar, como cabras leiteiras com *knock-out* no gene da beta-lactoglobulina, resultando em produtos alimentares menos alergênicos (Petersen, 2017). Pesquisas têm sido feitas para desenvolver bovinos que produzam menos metano durante a digestão, contribuindo para uma pecuária mais sustentável (Camargo et al., 2023; Khan et al., 2024). No entanto, apesar dos avanços, a adoção de OGMs na produção animal ainda enfrenta desafios. A regulamentação e a aceitação pública são questões críticas, especialmente em mercados que têm restrições ou reticências

quanto ao uso de OGMs. A pesquisa científica, o diálogo com a sociedade e a transparência nas práticas de manejo serão essenciais para garantir que essas tecnologias sejam implementadas de forma ética e segura, beneficiando não apenas os produtores, mas também o meio ambiente e a saúde pública.

A modificação precisa da sequência genômica para induzir deleções, inserções ou substituição de bases no genoma é o que abrange a edição genômica (Li et al., 2023). As principais tecnologias empregadas nesse processo envolvem nucleases, que são capazes de gerar quebras programadas na fita dupla de DNA (DSBs, *Double Strand Breaks*) em locais específicos e previamente conhecidos do genoma alvo, evitando efeitos colaterais como a edição de regiões não-alvo do DNA (denominado efeito *off-target*). Os danos induzidos são reparados pelos mecanismos endógenos de reparo de DNA, que, por meio da introdução de INDELs (inserções e/ou deleções) no local da clivagem, possibilitam a edição desejada. Os principais mecanismos de reparo incluem a união das extremidades não homólogas (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*) e o reparo por recombinação homóloga (HDR, *Homology-Directed Repair*) (Hillary & Ceasar, 2023). O NHEJ, que gera mutações do tipo INDELs de forma aleatória, pode levar à perda da expressão gênica (*knock-out*) (Leal et al., 2024), enquanto a via HDR permite uma edição mais precisa, utilizando um modelo de reparo homólogo, e é empregada para inserções específicas (*knock-in*) (Leal et al., 2024). Contudo, a HDR ocorre com menor frequência do que o NHEJ (Lee & Lee, 2023). Além dessas vias predominantes, outras como a junção de extremidades mediada por microhomologia (MMEJ, *Microhomology-Mediated End Joining*) e o anelamento de fita simples (SSA, *Single Strand Annealing*) também podem contribuir para o reparo das DSBs (Fichter et al., 2023).

O sistema CRISPR destaca-se por sua eficiência e facilidade, pois direciona a proteína Cas9 ao local alvo por meio de RNA guia (gRNA) (Jinek et al., 2012), ao contrário das outras tecnologias, que exigem construção e clonagem de proteínas (Li et al., 2023). Embora avançada, a CRISPR/Cas9 ainda enfrenta desafios como a especificidade e os efeitos *off-target*, que buscam ser mitigados com variantes de Cas9 de alta fidelidade e o uso de nicasas (nCas9). Outro desafio é a baixa eficiência de recombinação por HDR,

superada por estratégias como a ativação de proteínas associadas à via de HDR ou a inibição da via NHEJ.

Nos últimos anos, estudos demonstraram sucesso ao empregar a recombinação mediada por MMJE, utilizando o sistema CRISPR/Cas para promover o *knock-in* de genes em locais específicos do genoma (Li et al., 2019; Nakade et al., 2014; Sakuma et al., 2016, Shin et al., 2018; Yao et al., 2017). A recombinação que envolve sequências homólogas de 8 a 25 pares de bases tem se mostrado uma alternativa eficaz para a inserção de genes em locais específicos, sem o uso de genes de seleção positiva e dos longos braços de sequências homólogas (>1Kb) empregados na HDR tradicional, simplificando as construções dos *templates* e vetores envolvidas no processo de recombinação. Essa abordagem é particularmente interessante, visto que a inserção de genes de resistência a antibióticos, comumente utilizados para seleção positiva na HDR, é indesejável em alguns contextos, como por exemplo, se busca a produção de animais transgênicos destinados ao consumo humano, conforme as recomendações da FAO sobre a segurança alimentar para esse tipo de tecnologia (FAO-Codex Alimentarius CAC/GL 68-2008) (Bae et al., 2014; Nakade et al., 2014; Van Vu et al., 2021).

Genes inseridos de forma aleatória estão sujeitos a efeitos de posição, o que pode resultar em fenótipos instáveis, silenciamento gênico e/ou expressão gênica inesperada (Li et al., 2019). Regiões como centrômeros e regiões sub-teloméricas são especialmente propensas ao silenciamento de transgenes. Além disso, genes recém-integrados podem afetar genes endógenos e a cromatina ao redor, alterando o comportamento celular ou até favorecendo a transformação celular (Sadellain et al., 2011). Em contraste, na integração gênica em local sítio-específico, os locais são escolhidos com base nos objetivos da pesquisa. Nesse contexto, os chamados "*safe harbors*" — locais específicos do genoma onde a inserção de genes ocorre de forma estável, sem interferir na expressão gênica do organismo — são considerados os locais ideais para a inserção de genes de interesse. Dentre os locais já descritos na literatura, destacam-se o *locus* Rosa 26 e o *locus* H11 como pontos de inserção seguros para *knock-in* em mamíferos (Ruan et al., 2015). Embora o *locus* Rosa26 seja amplamente utilizado, seu promotor endógeno pode interferir na expressão do transgene em alguns casos.

O *locus* H11, por não possuir um promotor endógeno, oferece a vantagem de permitir a expressão do transgene de forma mais controlada, especialmente quando se utiliza promotores próprios ou tecido-específicos (Li et al., 2019).

O presente projeto visa avaliar a capacidade do sistema CRISPR/Cas9 em direcionar a inserção do gene repórter da proteína fluorescente verde (eGFP, *enhanced Green Fluorescent Protein*), em um *locus* específico e seguro do genoma bovino, o *locus* H11, utilizando a recombinação mediada por microhomologia. Inicialmente, o sistema CRISPR/Cas9 foi aplicado em diversas linhagens celulares bovinas (Cumulus, MDBK, fibroblastos e MAC-T) com o objetivo de avaliar sua eficácia na inserção de cassetes de expressão do gene repórter (eGFP) no *locus* H11, utilizando gRNAs desenhados com o auxílio de *softwares* especializados. A inserção de genes de interesse em locais específicos e seguros do genoma de animais complexos, especialmente bovinos, tem sido um desafio significativo na produção de animais transgênicos. Após a avaliação em cultivo celular, o guia mais eficaz foi selecionado e utilizado para a tentativa de inserção do gene repórter em embriões bovinos. Foi realizada eletroporação do complexo proteína Cas9 + gRNA (complexo RNP, *ribonucleoprotein*) e do cassete de expressão do eGFP na forma linear em zigotos bovinos, seguida de observação da expressão do gene eGFP nos embriões no estágio de blastocisto no oitavo dia de desenvolvimento *in vitro* (procedimento estabelecido pelo laboratório onde foi realizado o experimento). Este projeto teve como objetivo incorporar os mais recentes avanços na edição genômica direta para o desenvolvimento de soluções inovadoras em biotecnologia animal, com ênfase na introdução precisa de genes em um *locus* específico e seguro do genoma bovino.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Evolução da manipulação de animais de produção

Desde o início da domesticação, os animais têm sido submetidos a um processo de identificação e seleção dos indivíduos com os melhores atributos produtivos, inicialmente por observação visual e, posteriormente, por meio de mensurações. Ao longo dos séculos, os seres humanos moldaram o genoma das espécies de animais de produção por meio da seleção artificial, embora com uma compreensão limitada ou inexistente sobre a base genética da hereditariedade (Carroll, 2017).

Com o avanço dos modelos matemáticos, o aprimoramento das ferramentas estatísticas, a popularização dos computadores e o surgimento das primeiras biotecnologias de reprodução assistida, como a inseminação artificial (IA), começaram a ser implementados os primeiros programas de avaliação genética em animais de produção. Esses programas possibilitaram a identificação dos animais mais adequados para serem os pais das gerações futuras, promovendo um significativo e rápido progresso nos ganhos genéticos e produtivos por meio dos programas de melhoramento genético em animais de produção (Laible et al., 2015). Atualmente, contamos com animais de alta produtividade, que exploram ao máximo o potencial de seu "*background*" genético. Esse avanço, aliado ao desenvolvimento de biotecnologias de reprodução assistida, como a produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a clonagem por Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS), possibilitou que um único animal gerasse um grande número de descendentes em um curto período de tempo (Galli e Lazzari, 2021). Como resultado, houve um uso mais intensivo de animais com genética superior nos rebanhos comerciais, o que aumentou sua produtividade, reduziu a pegada de carbono e contribuiu para uma utilização mais eficiente do solo brasileiro, além de promover, indiretamente, a preservação de biomas nativos.

Devido o avanço da engenharia genética e a evolução das biotecnologias de reprodução assistida em animais de produção, a criação de animais transgênicos tornou-se viável (Melo et al., 2007). Mais recentemente, a geração de animais de produção com genoma editado tornou-se uma realidade (Doudna

& Charpentier, 2014; Ruan et al., 2017). Essa nova fase da evolução biotecnológica pode ser chamada de "biotecnologia de precisão na pecuária". A edição e edição genômica em animais de produção podem ser vistas como uma melhoria da transgenia, considerando quatro aspectos principais: 1) maior precisão nas modificações genéticas; 2) a possibilidade de não introduzir DNA exógeno no genoma do animal; 3) no caso da edição, a sequência genética do alvo não é alterada, evitando a criação de organismos geneticamente modificados (OGM); e 4) maior aceitação pública dos animais editados ou editados, quando comparados aos transgênicos, por conta dessas vantagens.

Animais de produção geneticamente editados já estão sendo desenvolvidos e produzidos em diversas regiões ao redor do mundo. Exemplos notáveis incluem animais com maior resistência à tuberculose, proporcionando um avanço significativo na resistência a doenças; animais desprovidos de chifres (mochos de nascença), originários de raças tradicionalmente chifradas, o que elimina a necessidade de intervenções cirúrgicas para sua remoção, contribuindo para o bem-estar animal; cabras leiteiras com *knock-out* no gene da beta-lactoglobulina, resultando em produtos alimentares menos alergênicos; animais com maior rendimento de carne na carcaça, com características que favorecem o crescimento muscular e a eficiência alimentar (redução de gordura, melhor conversão alimentar), impulsionando a performance produtiva; e animais geneticamente modificados para apresentarem maior tolerância ao estresse térmico, entre outros avanços significativos (Petersen, 2017).

A produção de animais geneticamente modificados ou editados exige o uso de biotecnologias de reprodução assistida, como a PIVE e a clonagem por TNCS. A PIVE, embora eficiente, apresenta uma janela temporal restrita durante o desenvolvimento embrionário, limitando a introdução precisa de modificações genéticas e prevenindo o mosaico embrionário. A clonagem por TNCS, apesar de já ser empregada comercialmente, possui uma eficiência ainda muito baixa, inferior a 3%. Nesse processo, um ovócito é enucleado, com a remoção de seu material genético por meio de micromanipulação assistida, e substituído por um genoma de célula somática, utilizando a técnica de eletrofusão. Embora, teoricamente, qualquer célula possa ser utilizada como doadora, fibroblastos da pele, células do cumulus e outras de fácil obtenção são mais comumente usadas devido à sua facilidade de cultivo *in vitro*. Para a clonagem de células

previamente editadas, é imprescindível isolar linhagens clonais geneticamente modificadas, a fim de garantir a estabilidade e consistência das modificações antes da clonagem.

2.2 Evolução das metodologias de edição genômica

Um dos principais objetivos no campo da biotecnologia, desde o início da era da tecnologia do DNA recombinante iniciada na década de 1970, era o desenvolvimento de "tesouras moleculares" capazes de realizar edições precisas em locais específicos dos genomas eucarióticos mais complexos, como o de plantas e mamíferos (Silva et al., 2011). O progresso no desenvolvimento de nucleases programáveis, a partir de década de 1990, levou a avanços significativos na indução de mutações em locais alvo em organismos complexos, um processo conhecido como edição genômica (Lee et al., 2018). As meganucleases foram as primeiras ferramentas candidatas para a edição de genomas complexos (Belfort & Roberts, 1997; Silva et al., 2011). Essas nucleases, compostas por íntrons de elementos genéticos móveis, possuem um sítio de reconhecimento que varia entre 18 a 30 nucleotídeos (Figura 1a), o que as tornava candidatas viáveis para edições únicas em genomas com mais de 10^9 pares de base (Jasin, 1996). No entanto, foi um grande desafio modificar essas enzimas para realizar edições específicas de sequências de DNA no genoma de forma programável e customizada. A aplicação de estratégias de engenharia genética frequentemente resultava em uma diminuição da atividade de clivagem das meganucleases (Jasin, 1996).

Entre as técnicas mais recentes e promissoras para a edição direcionada de genomas eucarióticos, destacam-se as Nuclease *Zinc Finger* (ZFNs), as nucleases com efetores do tipo ativador transcricional (TALENs) e, mais recentemente, o sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas e as proteínas associadas (CRISPR/Cas) (Segal & Meckler, 2013). As ZFNs foram a primeira geração de nucleases engenheiradas para realizar cortes específicos nos genomas de plantas e animais, desenvolvidas em meados da década de 1990. Elas combinam o domínio proteico *zinc finger*, oriundo de fatores de transcrição, que reconhece

sequências de DNA, com o domínio da nuclease FokI, que, ao se dimerizar, ativa a clivagem do DNA alvo (Lee et al., 2018) (figura 1b). Essa inovação foi reconhecida como o marco inicial da era da edição genômica. No entanto, por apresentarem menor especificidade na ligação ao DNA, as ZFNs podem editar não só o local desejado (*on-target*), mas também locais não intencionais (*off-target*), o que constitui o principal efeito colateral indesejável das tecnologias de edição genômica (Zheng et al., 2020).

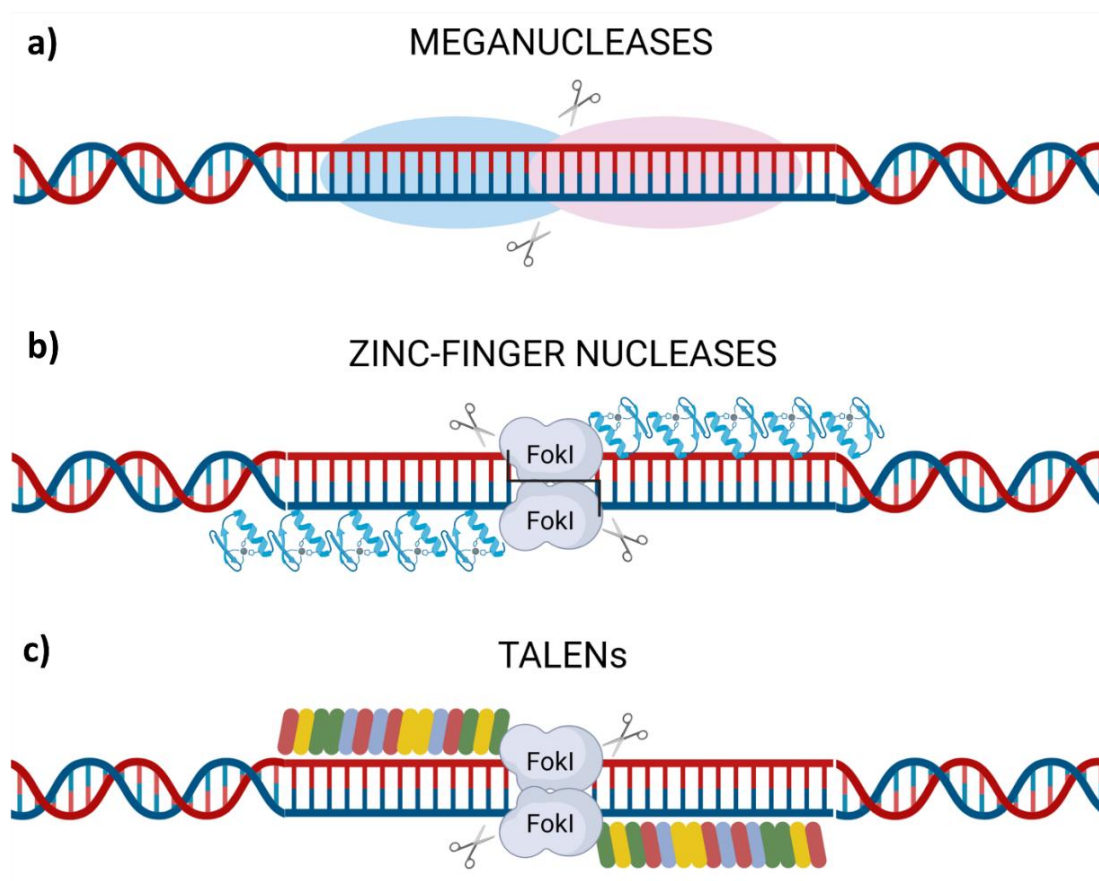


Figura 1. Ferramentas de edição genômica. **a)** Meganucleases: enzimas de restrição com alta especificidade para sequências-alvo. **b)** ZNF: nucleases baseadas em dedos de zinco. **c)** TALENs: nuclease criada a partir de fatores de transcrição.

Fonte: Elaborado pelo autor utilizando BioRender.

A segunda geração de nucleases, desenvolvidas na primeira década do século XXI, são as TALENs (figura 1c), criadas a partir de fatores de transcrição produzidas por bactérias patogênicas de plantas que possui a finalidade de regular a expressão gênica no genoma do hospedeiro (Perez-Pinera et al., 2012). As TALENs também funcionam como dímeros, ligando um domínio

semelhante ao do efetor TAL ao domínio da nuclease FokI (Lee et al., 2018). Esse sistema é mais flexível que as ZFNs, pois cada domínio de reconhecimento de DNA se liga a um nucleotídeo específico, proporcionando maior precisão e reduzindo substancialmente o efeito *off-target* (Sun & Zhao, 2013). No entanto, a construção de TALENs exige a concatenação de cerca de 30 domínios de ligação ao DNA, tendo cada domínio 34 aminoácidos, e cada um reconhecendo um nucleotídeo específico. Esse processo, embora mais preciso, demanda um grande esforço de tempo e custos elevados na construção dos vetores (Perez-Pinera et al., 2012).

Mais recentemente, a partir da segunda década do século XXI, foi desenvolvida a tecnologia de edição genômica mediada pelo sistema CRISPR/Cas, baseada na descoberta de um sistema de imunidade adaptativa presente em bactérias e arqueias, que as protege contra ácidos nucleicos invasores, geralmente de origem viral (Jinek et al., 2012). A grande vantagem dessa tecnologia é seu princípio de funcionamento, que se baseia no emparelhamento de bases entre um RNA guia (gRNA) e o local genômico, orientando a nuclease Cas9 até a sequência alvo de DNA (Pennisi, 2013). Para destacar a simplicidade do CRISPR/Cas9, ao contrário da construção dos vetores TALENs, que exigem dois domínios de 30 repetições de cerca de 1.800 nucleotídeos cada, que codificam os domínios de ligação ao DNA alvo para garantir a especificidade desejada à nuclease FokI, o sistema CRISPR/Cas9 requer apenas uma sequência de 17 a 20 nucleotídeos em um contexto de 100 ribonucleotídeos invariantes (sequência de andaime) para formar o gRNA. Essas características permitem aos pesquisadores criar rapidamente centenas de gRNAs personalizados e específicos para um local do genoma alvo, a um custo muito baixo (Segal & Meckler, 2013). Por essas razões, o CRISPR/Cas se consolidou como a principal tecnologia de edição genômica nos últimos anos, superando amplamente as demais técnicas (Fox, 2019).

2.3 Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas e as proteínas associadas - CRISPR/Cas9

O sistema CRISPR/Cas foi descrito, primeiramente, em genoma bacteriano há mais de 30 anos (Ishino et al., 1987). São elementos do sistema de defesa adaptativo contra bacteriófagos (vírus que atacam bactérias e archeas) encontrado em archeas e bactérias (Zakrzewska & Burmistrz, 2023). O sistema CRISPR/Cas9 transformou completamente o campo de manipulação gênica em um curto período de tempo (Javaid et al., 2022). O sistema consiste em dois componentes: uma endonuclease que induz uma quebra dupla da fita de DNA (DSB) em um local alvo preciso e um RNA guia que direciona essa enzima ao local alvo, garantindo assim precisão e especificidade da clivagem do DNA (Javaid et al., 2022).

Esse sistema pode ser categorizado em duas classes: classe 1 e classe 2. A classe 1 é caracterizada por utilizar complexos efetores de múltiplas proteínas e compreende os sistemas do tipo I, tipo III e tipo IV (Zhang, 2022). A classe 2, por sua vez, utiliza efetores de proteína única e compreende os sistemas do tipo II, V e VI. Este efector consiste em uma grande proteína multi-domínio e multi-funcional que se combina com um RNA guia (crRNA), conhecido como proteína associada ao CRISPR (Cas, *CRISPR associated*) (Zhang, 2022). O sistema mais utilizado para edição em mamíferos é o sistema tipo II. Esse sistema compreende, na maioria dos casos, a proteína Cas9 e um pequeno RNA guia quimérico de 100 nucleotídeos (sgRNA), dos quais 80 nucleotídeos (nt) são invariáveis e 20 nt são customizados para parear com o DNA-alvo.

O sistema CRISPR/Cas9 descrito na bactéria *Streptococcus pyogenes* consiste na nuclease SpCas9 (ou simplesmente Cas9) e dois RNAs não codantes, o crRNA (*crispr* RNA) e o tracrRNA (*trans-encoded crRNA*), localizados em loci gênico de pré-crRNA compreendendo sequências dirigidas por nucleases separadas por repetições idênticas (Javaid et al., 2022). Esse sistema foi aprimorado e modificado para utilização em edição genômica com o acoplamento do crRNA ao tracrRNA, formando uma molécula única de sgRNA (*single guide RNA*) de 100 nt (Jinek et al., 2012). Essa reorganização em um único transcrito (sgRNA ou gRNA) contém todos os requisitos necessários para direcionar a SpCas9 ao local alvo (Jinek et al., 2012), sem o inconveniente de

ter-se que trabalhar com 2 moléculas distintas de RNA. A Cas9 pode ser programada para gerar quebra na dupla fita do DNA em qualquer local do genoma, que é determinado pela sequência do gRNA e pelos motivos adjacentes ao protoespaçador (PAM). O PAM é um elemento crucial para o funcionamento da Cas9, além de ser um mecanismo que diferencia entre DNA próprio e não próprio (invasor), prevenindo assim que o próprio *locus* CRISPR seja alvo das suas nucleases (Marraffini & Sontheimer, 2010). Existem diversas sequências PAM que podem ser reconhecidas por diferentes Cas. A Cas9 mais utilizada (SpCas9) requer um PAM 5'-NGG-3', sendo N qualquer nucleotídeo.

Quando o complexo gRNA-Cas9 reconhece a sequência de DNA complementar com a sequência do RNA guia ele se liga e posiciona a Cas9 para provocar uma quebra na dupla fita do DNA (figura 2), gerando uma terminação abrupta do tipo *blunt*, geralmente 3pb antes da região do PAM. Essa DSB no DNA será posteriormente reparada pelos mecanismos endógenos de reparo como o reparo por junção de extremidades não homólogas (NHEJ), o reparo mediado por recombinação homóloga (HDR) ou junção de extremidades mediada por microhomologia (MMEJ).

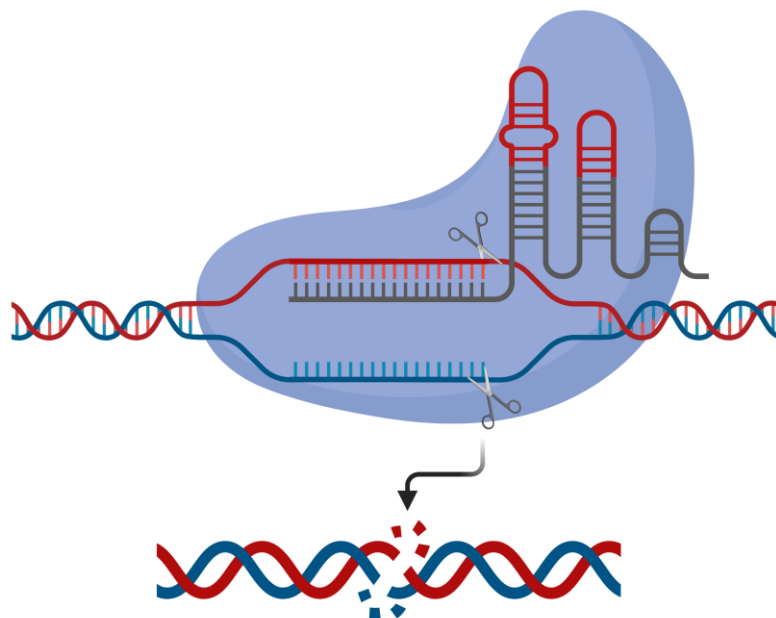


Figura 2. A figura ilustra o mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas9, no qual a proteína Cas9 é dirigida por uma sequência de RNA guia (gRNA) para um local específico do DNA, resultando na indução de uma quebra na dupla fita do DNA.

Fonte: Elaborado pelo autor utilizando BioRender.

Embora a tecnologia CRISPR/Cas9 tenha avançado rapidamente, ainda apresenta várias limitações. Além da complexidade e custos envolvidos com cada tecnologia, existe uma grande preocupação com sua especificidade, já que a edição de sítios espúrios fora da região alvo é considerado o maior efeito colateral da edição gênica (Kang et al., 2020; Zhang et al., 2015). Esses efeitos *off target* podem variar de mudanças inofensivas a alterações graves que afetam genes essenciais para a sobrevivência celular, representando riscos à segurança e eficácia da tecnologia (Yamashita & Melo, 2023). Atualmente, a busca de enzimas efetoras como a Cas9 do sistema CRISPR com maior especificidade (“*high fidelity*”) e estratégias com o uso de nicasas (nCas9) tem reduzido o efeito *off-target* a níveis negligenciáveis e bastante toleráveis (Park et al., 2024). A eficiência de inserção dos vetores do sistema CRISPR nas células, por meio de transfecção, é um outro fator crucial para o sucesso da técnica; pois sem uma alta taxa de transfecção, a seleção de clones editados torna-se inviável. Outro gargalo da técnica quando se almeja a edição por meio de HDR é a sua baixa eficiência de recombinação do sítio alvo com o *template* contendo a região de homologia (Lee & Lee, 2023). Diversas estratégias têm sido investigadas para aprimorar a eficiência da recombinação por HDR, incluindo a ativação de proteínas associadas à via de reparo por HDR ou a inibição de proteínas essenciais à via de NHEJ.

2.4 Mecanismos de Reparo do DNA

Organismos eucariotos dispõem de dois principais mecanismos de reparo para quebras na dupla fita de DNA (DSB): o reparo mediado por recombinação homóloga (HDR) e o reparo por junção de extremidades não homólogas (NHEJ) (Lee et al., 2018). O reparo por recombinação homóloga ocorre principalmente nas fases S/G2 do ciclo celular. Esse processo é iniciado pela ação coordenada de várias proteínas, como RAD51, RAD52, RAD54, BRCA2 e RPA. O reparo das DSBs segue uma sequência de etapas: primeiro, ocorre o reconhecimento e a ressecção das extremidades do DNA; em seguida, as fitas de DNA se emparelham homologicamente e trocam segmentos, o heteroduplex de DNA é estendido e as ramificações migram, até que, por fim, a junção de Holliday é resolvida (Heyer et al., 2010; Krejci et al., 2012). Nesse processo, a cromátide

irmã serve como molde para o reparo, permitindo que a região danificada seja corrigida sem a introdução de mutações.

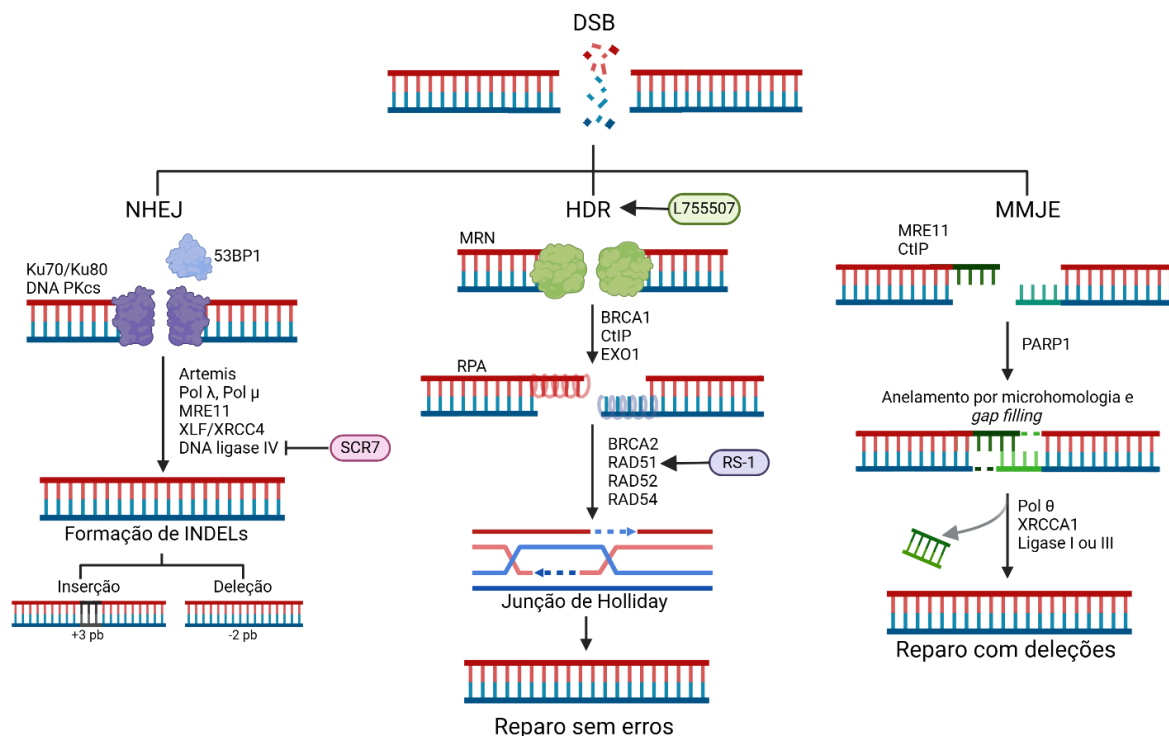


Figura 3. Mecanismos de reparo do DNA e a atuação dos fatores SCR7, RS1 e L755507. A figura ilustra os mecanismos de reparo de DSB no DNA: a NHEJ, que pode gerar INDELs; a HDR, que utiliza a cromátide irmã como molde para um reparo preciso; e a MMJE, que, embora utilize sequências curtas de homologia, é propensa a erros, frequentemente resultando em deleções, inserções e translocações cromossômicas. Os fatores SCR7, RS1 e L755507 são representados com suas respectivas funções: SCR7 inibe a DNA ligase IV, RS1 estimula a proteína Rad51, e L755507 modula a via de reparo, embora o mecanismo exato ainda não esteja completamente elucidado.

Fonte: Elaborado pelo autor utilizando BioRender.

O reparo por junção de extremidades não homólogas ocorre durante todo o ciclo celular e envolve quatro etapas principais: reconhecimento da quebra, ligação das extremidades, processamento das extremidades e, finalmente, a ligação. Esse processo é mediado por uma série de proteínas, como Ku70/Ku80, MRE11, Artemis (complexo da subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA) e o complexo XLF:XRCC4:DNA ligase IV. Ao contrário do HDR, o NHEJ não utiliza um molde de DNA, o que torna esse processo propenso a erros, podendo gerar deleções ou inserções (INDELs) no local da quebra do DNA (Lee et al., 2018).

Embora os mecanismos de reparo mais conhecidos sejam os mencionados, outras vias, como a junção de extremidades mediada por microhomologia (MMEJ), também podem contribuir para o reparo das DSBs (Fichter et al., 2023). O MMEJ ocorre nas fases G1 e início da fase S do ciclo celular. Diferentemente do NHEJ, o MMEJ repara a DSB utilizando sequências curtas de homologia. O processo de reparo é iniciado pela localização de proteínas como PARP1, MRE11, CtIP e XRCC1:DNA ligase 1 ou 3 no local da quebra. O mecanismo de reparo do MMEJ é semelhante ao do NHEJ, com cada extremidade da DSB sendo unida por sequências de microhomologia, o que torna o processo propenso a erros e frequentemente resulta em deleções, inserções e translocações cromossômicas no local da quebra (Lee et al., 2018; Sfeir & Symington, 2015). Esse mecanismo pode ser utilizado para a inserção (*knock-in*) de DNA exógeno, assim como o HDR (Sakuma et al., 2016).

O reparo do DNA por NHEJ é o mais prevalente quando uma DSB ocorre, sendo muito mais frequente que o reparo por HDR ou MMEJ. Entretanto, estratégias para aumentar a probabilidade de reparo por HDR em vez de NHEJ podem ser implementadas. Algumas moléculas têm a capacidade de inibir o NHEJ, enquanto outras podem promover o HDR, favorecendo assim a ocorrência de recombinação homóloga (Camargo et al., 2023). O SCR7 é uma molécula que age bloqueando a enzima DNA ligase IV, essencial para a via de NHEJ (Leal et al., 2024). Esse inibidor já foi testado em várias células humanas (HEK-293T e iPSCs) e modelos murinos (células-tronco embrionárias de camundongos e zigotos de camundongos), além de outras espécies. Os resultados mostraram um aumento na eficiência da HDR mediada pelo CRISPR/Cas9, variando de 1 a 19 vezes (Anuchina et al., 2023; Bischoff et al., 2020; Lee et al., 2022; Shams et al., 2022). Chu et al. (2015) demonstrou que a redução da expressão de KU70, KU80 e da ligase de DNA IV, proteínas centrais envolvidas no NHEJ, resultou em uma mudança do NHEJ para o reparo por HDR. Já Maruyama et al. (2015), mostrou uma taxa de 59% de HDR comparada a 28% de NHEJ em blastocistos de camundongos, utilizando 1 μ M de SCR7 na microinjeção citoplasmática com CRISPR/Cas9. Em células fetais de suínos essa molécula aumentou o HDR de 2 a 3 vezes (Li et al., 2017). No entanto, essa substância não apresenta resultados consistentes em todos os estudos.

Tanihara et al. (2023) avaliaram a eficácia do SCR7 para introduzir uma mutação pontual no gene da insulina porcina em zigotos suínos e não observaram melhorias significativas na eficiência do HDR, mesmo ao testar diferentes concentrações de SCR7 (0,5 a 4 μ M), indicando um efeito limitado da molécula. De forma semelhante, não foram observadas melhorias em zigotos de coelho (Song et al., 2016).

O RS-1 é uma molécula pequena que desempenha um papel importante no estímulo à recombinação homóloga, ativando a proteína RAD51, que está envolvida no reparo do DNA mediado por esta via (Camargo et al., 2023). Em um estudo realizado com embriões de coelho tratados com 7,5 μ M de RS-1, observou-se um aumento significativo nos eventos de HDR mediada pelo CRISPR/Cas9, com uma variação de 2 a 6 vezes, dependendo do *locus* (Song et al., 2016). Em embriões bovinos, o cultivo de zigotos com 7,5 μ M de RS-1 por 24 horas após a microinjeção de CRISPR/Cas9 duplicou a taxa de HDR (Lamas-Toranzo et al., 2020). Da mesma forma, o RS-1 aumentou as taxas de HDR de 1,5 a 6 vezes em células de mamíferos, incluindo K562, HEK-293T, iPSCs e embriões de zebrafish, o que reforça seu uso em diversas células primárias e linhagens celulares (Leal et al., 2024). Além disso, Charpentier et al. (2018) observaram que a fusão da Cas9 ao domínio CtIP, envolvido no reparo por HDR, aumentou a eficiência do HDR em cerca de duas vezes.

Yu et al. (2015) demonstraram que pequenas moléculas, como L755507, podem aumentar significativamente a eficiência do reparo do DNA mediado por HDR. Foi possível aumentar a eficiência em até 3 vezes para a incorporação de grandes sequências de DNA e até 9 vezes para a substituição de um único par de bases. A função dessas moléculas na via NHEJ ainda não foi esclarecida (Ryu et al., 2019). Li et al. (2017) investigaram a ação do SCR7 e do L755505 em fibroblastos fetais suínos, observando um aumento de 2 vezes na eficiência da HDR, semelhante ao que foi observado em outras linhagens celulares. Além disso, os autores relataram que o L755505 pode reter as células na fase S, fase em que o mecanismo de HDR é ativo.

2.5 Metodologia de Integração Precisa no Cromossomo Alvo (PITCh)

O mecanismo de reparo de junção de extremidade mediada por microhomologia (MMJE) é uma via de reparo explorada na edição genômica utilizando o sistema CRISPR/Cas9. MMEJ é ativada quando há microhomologia (5 a 25 pares de base) a jusante e a montante da quebra na dupla fita do DNA alvo (DSB) com a sequência do DNA alógeno, presente no cassete de expressão ou na sequência de DNA que se almeja fazer o *knock-in* no genoma alvo (Yip, 2020).

Nakade et al. (2014) desenvolveram uma metodologia baseada em MMJE nomeada de integração precisa no cromossomo alvo (PITCh) para o *knock-in* de genes de interesse em um local alvo desejado. O *knock-in* ocorre por MMJE no lugar de reparo por recombinação homologa. O HDR convencional requer sequências de homologia de 500 a 4000 pares de bases flanqueando a sequência de DNA a ser integrada, mas o método PITCh utiliza pequenas sequências de homologia de 5 a 25 pb no vetor doador (Ezaki et al., 2022). A adição de microhomologia é bem mais conveniente e simples do que a construção de longos braços de homologia para HDR (Sakuma et al., 2016). Além disso, MMEJ é de duas a três vezes mais eficiente que o HDR para promover *knock-in* de transgene (Nakade et al., 2014; Yip 2020). No sistema PITCh é gerado DSB no vetor doador e no DNA genômico utilizando Cas9. A Cas9 cliva na sequência PITCh no vetor doador, deixando livre a sequência de interesse (seja o plasmídeo inteiro ou um cassete de um gene específico) flanqueada por microhomologia, o que ativa a via de MMEJ para integração do transgene no local desejado (Sakuma et al., 2016).

No sistema original (CRIS-PITCh) descrito por Nakade et al (2014) dois ou três gRNAs eram necessários para integração do gene de interesse. No entanto, a versão 2 (CRIS-PITCh v2) desse sistema, descrita por Sakuma et al. (2016), utiliza apenas um único gRNA (5'-GCATCGTACGCGTACGTGTT-3'). Esse sistema pode ser visualizado na figura 4. Para melhor eficiência, os gRNAs e a Cas9 podem ser montados em um único vetor. O vetor então conterá a Cas9, o gRNA que direcione para o local alvo no genoma e o gRNA PITCh.

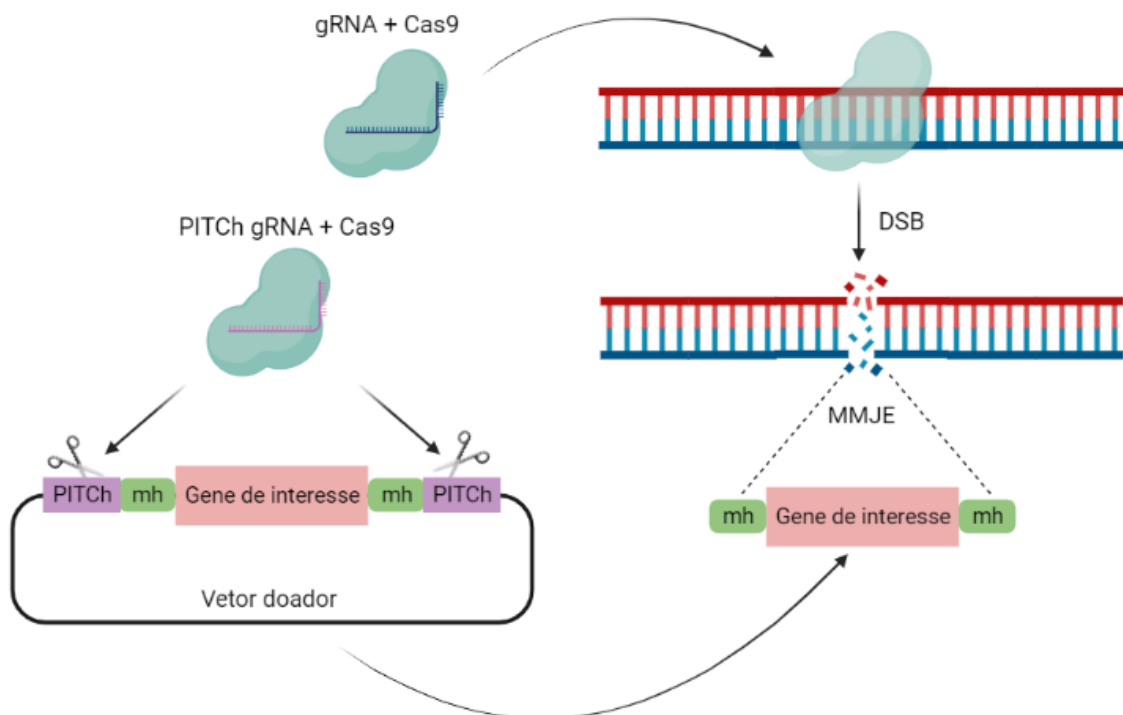


Figura 4. Sistema PITCh v2: utiliza a tecnologia Cas9 para gerar DSB tanto no vetor doador quanto no local alvo no genoma, com o objetivo de integrar um transgene no local desejado. São utilizados guias para a sequência PITCh e para a sequência alvo no genoma. A Cas9 cliva a sequência PITCh no vetor doador, liberando a sequência de interesse flanqueada por microhomologia (mh), o que ativa a via de junção mediada por microhomologia para promover a integração do transgene.

Fonte: Elaborado pelo autor utilizando BioRender.

2.6 Técnicas para introduzir o sistema CRISPR/Cas9 em células/embriões

Há várias técnicas sendo empregadas para introduzir o sistema CRISPR/Cas9 em células e embriões. As mais utilizadas podem ser visualizadas na figura 5 e incluem sistemas virais (como o vírus adeno-associado ou lentivírus), métodos químicos não virais (como lipossomos, nanopartículas lipídicas, peptídeos penetrantes de células, políplexos e nanopartículas de ouro) e métodos físicos (como microinjeção e eletroporação) (Javaid et al., 2022). Os métodos físicos de entrega são geralmente restritos a sistemas *in vitro*, enquanto os métodos químicos necessitam de ajustes consideráveis para melhorar sua eficiência na edição genética *in vivo*. Garantir um sistema de entrega seguro e eficaz para CRISPR/Cas9 em organismos vivos é, portanto, o um dos maiores desafios na área de edição genética (Yip, 2020).

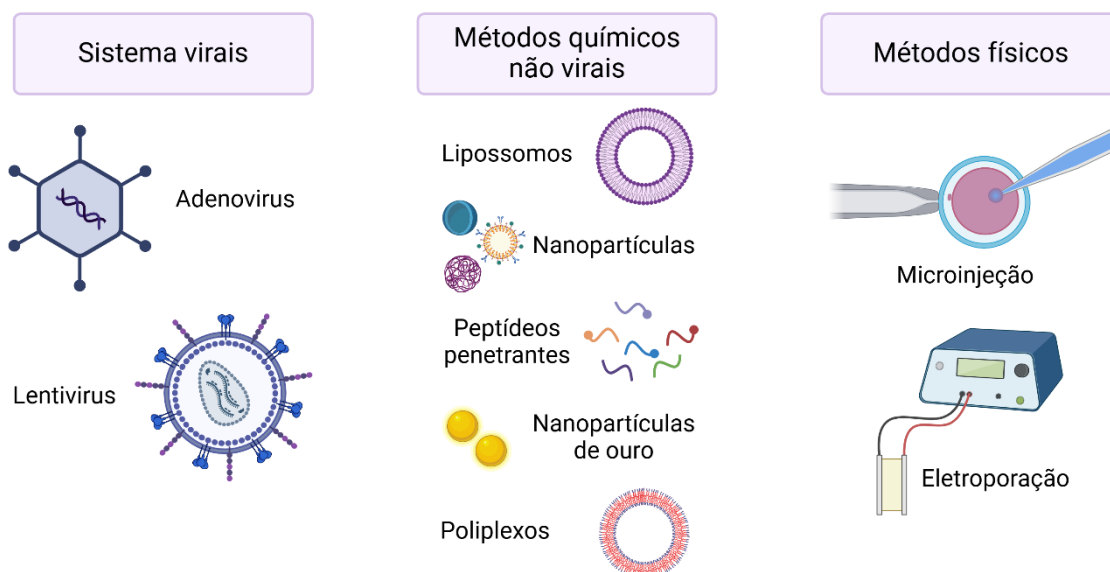


Figura 5. Principais técnicas para introduzir o sistema CRISPR em células e embriões. A figura apresenta os sistemas virais (como o vírus adeno-associado e lentivírus), métodos químicos não virais (como lipossomos, nanopartículas, peptídeos penetrantes de células, nanopartículas de ouro e poliplexos) e métodos físicos (como microinjeção e eletroporação).

Fonte: Elaborado pelo autor utilizando BioRender.

Os vetores virais são frequentemente utilizados em sistemas de entrega *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, mas podem provocar mutagênese por inserção, têm capacidade de clonagem limitada e/ou podem desencadear respostas imunológicas (Yip, 2020). O uso de sistema virais como adeno-associated vírus (AAV) oferece uma fonte contínua de DNA, pois o material genético entregue pode permanecer nas células como DNA exógeno ou ser integrado diretamente ao DNA do hospedeiro. Partículas CRISPR/Cas9 AAV infectam a linhagem celular alvo, permitindo a persistência dos componentes CRISPR/Cas9 e tornando esse método adequado para situações que exigem expressão a longo prazo (Wang et al., 2020). Já os lentivírus, possuem a vantagem de maior capacidade de clonagem (8 kb), permitindo a clonagem da Cas9 e sgRNA em um único vetor, e maior facilidade de produção que o AAV. No entanto, o risco de integração aleatória do vírus no genoma das células hospedeiras, especialmente perto de oncogenes, pode resultar na ativação de tais genes, provocando câncer, o que impede seu uso em estudos clínicos *in vivo* (Lino et al., 2018). Além disso, a inserção genômica com expressão constitutiva de Cas9 e guias pode aumentar a ocorrência de efeitos *off-target*, levando a modificações indesejadas em regiões não-alvo do genoma.

Vetores não virais têm se destacado devido à versatilidade em seu design e à possibilidade de produção em grande escala (Du et al., 2023). Atualmente, nanopartículas de quitosana modificadas com ligantes e vesículas extracelulares, capazes de se ligar a ligantes específicos, têm aumentado significativamente a precisão do sistema CRISPR/Cas9 (Khademi et al., 2022; Yao et al., 2021). Além disso, nanopartículas que respondem a estímulos internos, como variações de pH, ATP e glutatona, possibilitam uma edição genética mais precisa e uma entrega mais direcionada do sistema CRISPR/Cas9 (Tang et al., 2019; Wang et al., 2020; Yang et al., 2019). Nanopartículas sensíveis a estímulos externos, como luz ou campos magnéticos, também têm mostrado grande potencial para futuras aplicações (Zhuo et al., 2023; Wu et al., 2020). Entre as diversas nanopartículas, as nanopartículas lipídicas são amplamente utilizadas como nano transportadores para a entrega de ácidos nucleicos, devido à sua preparação simples, fácil modificação de superfície e excelente biocompatibilidade (Du et al., 2023). Polímeros catiônicos e lipossomos catiônicos são carregados positivamente e, com isso, podem encapsular o sistema CRISPR/Cas9 por meio de interações eletrostáticas com moléculas carregadas negativamente, como o DNA plasmidial, mRNA e sgRNA. Essas interações protegem os ácidos nucleicos da degradação e aumentam sua captação intracelular por endocitose mediada por proteínas reticulares (Kim et al., 2024).

No método físico de microinjeção, os componentes do sistema CRISPR, como DNA plasmidial codificando as proteínas Cas9 e sgRNA, mRNA ou proteínas Cas9 junto com sgRNA no formato RNP (ribonucleoproteínas), são injetados diretamente nas células/embriões. Através de uma agulha microscópica, a membrana celular é perfurada para permitir a entrega precisa do material genético dentro da célula e/ou embrião, evitando obstáculos da matriz extracelular, zona pelúcida de embriões e componentes citoplasmáticos (Javaid et al., 2022). A tecnologia de microinjeção oferece grande versatilidade na entrega dos componentes do sistema CRISPR/Cas9, permitindo a injeção de substâncias de diferentes pesos moleculares e tamanhos, podendo ajustar a dosagem dos materiais, facilitando o controle de custos e a utilização eficiente dos recursos (Chen et al., 2022). Isso possibilita a aplicação em diversos tipos

de células e contextos experimentais. No entanto, a microinjeção é limitada a algumas centenas de células por vez, o que resulta em baixa eficiência e torna o processo demorado (Du et al., 2023). Além disso, são necessários equipamentos de custo elevado e mão de obra altamente qualificada. Nos últimos anos, a microinjeção passou por um processo de automação com a integração das técnicas de microinjeção à tecnologia de máquinas, resultando em melhorias na eficiência. O surgimento da microinjeção automática de alto rendimento apresenta um grande potencial como uma abordagem mais eficiente e precisa para a microinjeção de células ou embriões (Du et al., 2023). Entretanto os sistemas robotizados de microinjeção são ainda extremamente caros.

A eletroporação utiliza pulsos de alta voltagem para formar poros temporários na membrana celular, facilitando a entrada dos reagentes do sistema CRISPR. Recentemente, a eletroporação com RNP tem mostrado maior eficiência em comparação com o uso de vetores, resultando em taxas mais altas de mutagênese e menor mosaicismos (Javaid et al., 2022). Essa técnica é menos dependente do tipo celular em comparação com outras abordagens de entrega, possibilitando a transferência eficiente de material genético para células que, normalmente, são difíceis de manipular e transfectar (Lino et al., 2018). No entanto, ela exige condições específicas para diferentes tipos celulares, o que pode aumentar os custos e demandar otimização da voltagem e do tempo dos pulsos para aplicações particulares. Dessa forma, é essencial selecionar cuidadosamente as condições de eletroporação para garantir uma transfecção bem-sucedida sem comprometer a viabilidade celular (Du et al., 2023). Devido ao seu potencial de escalabilidade (*high throughput*) e facilidade de uso, a eletroporação tem o potencial de se tornar a plataforma ideal para possibilitar a edição genômica de alto rendimento, principalmente quando se utiliza embriões produzidos *in vitro* (Lin & Van Eenennaam, 2021).

2.7 Eletroporação em embriões bovinos

O método padrão para introduzir componentes de edição genômica em zigotos de animais de produção tem sido a microinjeção citoplasmática (MI). Este método exige equipamentos caros e é altamente trabalhoso e demorado, pois é

necessário um indivíduo altamente qualificado para microinjetar os reagentes de edição genômica em zigotos individualmente. Microinjeções em grande número de zigotos podem levar horas, aumentando assim o mosaicismo. Nesse contexto, eletroporação possui um processo relativamente rápido, já que é possível eletroporar simultaneamente de 35 a 100 zigotos. Devido ao seu potencial de escalabilidade e facilidade de uso, a eletroporação tem o potencial de se tornar a plataforma para possibilitar a edição genômica em alto rendimento em espécies de animais de produção (Lin & Van Eenennaam, 2021).

A voltagem, o tempo de pulso e a concentração de Cas9/sgRNA são cruciais para a sobrevivência dos embriões e a eficiência das mutações (Hashimoto & Takemoto, 2015). O eletroporador emite pulsos de correntes elétricas através dos zigotos por meio de eletrodos, criando poros temporários na zona pelúcida (ZP) e na membrana plasmática, permitindo que os reagentes de edição genômica entrem nos zigotos. Embora voltagens e concentrações mais altas aumentem a eficiência da edição, elas também reduzem a viabilidade embrionária. A otimização das condições de eletroporação requer um equilíbrio entre a taxa de mutação e a viabilidade dos embriões, sendo que os parâmetros ideais variam conforme a espécie do animal e o tipo de edição (*knock-out* ou *knock-in*). Os tipos mais comuns de pulsos são os de onda quadrada (*square-waves*), com voltagem constante por um tempo determinado, e de decaimento exponencial, com voltagem decrescente ao longo do tempo. Na eletroporação de embriões, são utilizados os pulsos de onda quadrada, com dois subtipos principais: os chamados de "*poring pulse*", de voltagem intermediária e curta para abrir os poros nas membranas celulares, e o "*transfer pulse*", de voltagem baixa e longa duração, para transportar moléculas de PTN, DNA ou RNA para dentro das células e núcleos. A eletroporação com pulsos combinados, que alterna entre pulsos *poring* e *transfer*, pode aumentar a eficiência da entrega das partículas ao interior da célula (Lin & Van Eenennaam, 2021).

Em zigotos bovinos, a otimização da voltagem e do tempo é essencial, com maiores voltagens correlacionando-se com taxas aumentadas de mutação, embora a formação de blastocistos diminuísse com voltagens acima de 20 V/mm (Namula et al., 2019). Manter a zona pelúcida intacta após a eletroporação melhora a qualidade dos blastocistos. Eletroporar zigotos bovinos 10 horas após

inseminação (hpi) gerou melhores taxas de mutação do que 15 horas após inseminação. Camargo et al. (2020) realizaram um estudo para otimizar as condições de eletroporação em embriões bovinos, com o objetivo de realizar o *knock-out* do gene OCT4. Eles observaram que pulsos de voltagem entre 10V e 20V permitiram a passagem de um corante pela membrana dos embriões, mas pulsos de 20V prejudicaram o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Resultados semelhantes haviam sido descritos em estudos anteriores, onde pulsos de 20, 25 e 30V resultaram em menor desenvolvimento de blastocistos bovinos (Miao et al., 2019). Diante disso, pulsos de 15V, que não comprometeram o desenvolvimento embrionário, foram escolhidos como a voltagem ótima para a eletroporação nesse estudo.

2.8 Safe harbor, locus H11

Existem duas estratégias que podem ser utilizadas para inserção de genes de interesse: inserção em locais aleatórios ou integração em local específico, conhecida como *Targeting* (Li et al., 2019). A inserção aleatória é mais fácil de se obter e foi usada por meio de microinjeção em embriões para obtenção dos primeiros AGMs como camundongo, coelho, ovinos e bovinos (Brinster et al., 1981; Hammer et al., 1985; Melo et al., 2007). Entretanto, a inserção de genes aleatória está sujeita a efeitos de posição, o que pode resultar em fenótipos indesejados, inativação do gene de interesse caso ele seja inserido em regiões estruturalmente inativas do genoma, como regiões de heterocromatina, regiões centroméricas ou regiões teloméricas (Fujiwara et al., 2003, Yanez and Porter, 2002). Outros fatores que podem influenciar negativamente a expressão dos genes introduzidos aleatoriamente no genoma são a orientação da inserção (permissiva v.s. não permissiva) e o estado de metilação do DNA circundante (Feng et al., 2001). Além dos efeitos de posição na expressão do gene inserido, também existe a possibilidade da inserção do DNA exógeno romper a estrutura de um gene endógeno ativo e, dessa forma, alterar o transcriptoma do organismo alvo, com efeitos no fenótipo que podem variar de leves até letais (Capecchi, 2005). A alternativa para tais limitações é a inserção de genes de interesse em locais específicos que não ocasionem tais

efeitos indesejáveis, locais caracterizados como portos seguros (*safe harbors*) do genoma alvo (Li et al., 2019).

Quando se busca a inserção em locais específicos do genoma, a localização alvo é escolhida de acordo com o objetivo da pesquisa (Li et al., 2019). Os locais descritos na literatura para inserção de genes que não gerem efeitos negativos para os organismos são conhecidos como *locus* “*safe harbor*”. São locais no genoma que permitem a satisfatória expressão de genes alógenos sem alterar as funções dos genes ao seu redor (Ruan et al., 2015). Um dos *locus* mais conhecidos e utilizados atualmente é o *locus* Rosa26 (Ma et al., 2017). Embora o *locus* Rosa26 seja muito utilizado, ele não é ideal para alguns tipos de inserções onde o promotor *Rosa26* pode interferir na expressão do transgene (Irion et al., 2007; Li et al., 2014). Diferente do *locus* Rosa26, o *locus* H11 não possui um promotor endógeno, o que torna esse *locus* uma alternativa para expressão de genes de interesse com promotor próprio, como por exemplo utilizando promotores tecido-específicos (Li et al., 2019).

O *locus* H11 foi descrito por Hippenmeyer et al. (2010). No estudo, o local escolhido para procura de um *safe harbor* foi o cromossomo 11 de camundongos. Procurava-se um *locus* para *knock-in* de genes que se localizasse perto da região centromérica, que fosse uma região intergênica para minimizar as chances de interferência na expressão de genes endógenos e que a região também permitisse uma expressão bialélica forte. Foi encontrado então uma região entre os genes *Eif4enif1* e *Drg1* que era compatível com o que se procurava e essa região recebeu o nome de *locus* Hipp11 (Hippenmeyer et al., 2010). Ruan et al. (2015) em seu trabalho com suínos corroborou a afirmativa que o *locus* Hipp11, ou H11, se tratava de um *safe harbor* e que transgenes inseridos nesse local tinham alta expressão em células, embriões e animais. Esse estudo também sugere que a região do *locus* H11 seja uma região de cromatina aberta e funcione como um *hot spot* para inserção de genes (Ruan et al., 2015). Experimentos realizados *in vivo* demonstraram que a integração e a expressão bialélica dos transgenes no *locus* H11 não afetaram a viabilidade ou a fertilidade dos camundongos (Tasic et al., 2011), evidenciando a segurança desse *locus* como um ponto de inserção genômica. Além disso, a expressão do transgene no *locus* H11 humano em células-tronco embrionárias humanas e em

células-tronco pluripotentes induzidas mostrou-se consistente (Zhu et al., 2014), confirmando sua adequação para inserções de genes de interesse, com uma expressão eficaz em diversos tipos celulares. Em camundongos o *locus* H11 se localiza na região centromérica do cromossomo 11 (Hippenmeyer et al., 2010). Em humanos o *locus* H11 se localiza no cromossomo 22 (Zhu et al., 2014). Em suínos se localiza no cromossomo 14 (Ruan et al., 2015). Já em bovinos, o ortólogo desse *locus* foi recentemente descrito no cromossomo 17 (Henning et al., 2020; Owen et al., 2021).

2.9 Maiores informações sobre o tema podem ser encontradas no apêndice 8.3: Capítulo do livro *Animal Transgenesis and Cloning: Combined Development and Future Perspectives* (Yamashita & Melo, 2023).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O projeto visa avaliar os melhores parâmetros para a aplicação da tecnologia de edição genômica CRISPR/Cas9, visando o *knock-in* do gene eGFP no *locus* H11 em células e embriões bovinos.

3.2 Objetivos específicos

- I. Construção dos vetores contendo o sistema CRISPR/Cas9 e o gene eGFP
- II. Transfecção em células bovinas com os vetores construídos e geração de células editadas contendo o gene repórter
- III. Produção de embriões bovinos editados contendo o gene eGFP no *locus* H11 e avaliação da expressão de eGFP durante o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Construção dos vetores

O vetor utilizado neste estudo foi desenvolvido com base no sistema CRISPR do tipo II, destinado à edição do genoma de células de mamíferos (Cong et al., 2013). Para a construção dos módulos de gRNA que direcionam a Cas9 para o local específico, uma sequência de 20 nucleotídeos foi sintetizada para reconhecer um sítio único no *locus* H11 e foi fusionada ao tracrRNA presente no vetor, por meio de clonagem com oligonucleotídeos sintéticos. O vetor contém, portanto, as unidades de transcrição para os gRNAs H11 e PITCh, bem como o cassete de expressão do gene Cas9 (SpCas9). Foram desenhados e testados nove gRNAs distintos para a região do *locus* H11, utilizando a ferramenta online CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>). O guia denominado gRNA BMC foi desenvolvido conforme descrito por Owen et al. (2021), servindo como controle positivo, uma vez que já demonstrou sua capacidade de promover INDELS no *locus* H11 bovino. Adicionalmente, o guia gRNA Bi1 foi projetado exatamente na mesma posição de um ortólogo publicado em um estudo que editou células de suíno de forma eficiente (Ruan et al., 2015).

O vetor empregado nas construções foi o vetor pX330E, criado a partir de dois vetores comerciais. Para a construção do vetor pX330E, o vetor pX330A-1x2 (Addgene #58766) foi digerido com a enzima de restrição Bsal, para permitir a inserção de um fragmento contendo o cassete de expressão do gRNA PITCh. O cassete PITCh foi obtido por digestão com Bsal do vetor pX330S-2-PITCh (Addgene #63670) e clonado no vetor pX330A-1x2, resultando no vetor que denominamos pX330E. Esta sequência PITCh transcreve um RNA guia que apresenta homologia com a sequência PITCh flanqueando o gene de interesse (eGFP) no vetor doador.

A digestão com enzima de restrição foi realizada em um volume final de 15 µL, utilizando os seguintes componentes: 1X de tampão 10X, 10 U da enzima de restrição, 200 ng do vetor e água MilliQ para completar o volume final. A digestão foi incubada a 37°C por aproximadamente 16 horas, seguida pela aplicação do produto em gel de agarose a 1,0% para análise por eletroforese.

Após a eletroforese, o vetor linearizado e o fragmento PITCh foi extraído e purificado do gel utilizando o kit PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante.

Para a clonagem, a reação de ligação foi preparada em um volume final de 20 μ L, contendo os seguintes componentes: 1X de tampão de ligação 10X, 3 U de T4 DNA ligase (Invitrogen), 15 ng do vetor pX330A-1x2 linearizado e 10 ng da sequência PITCh, com o volume final completado com água MilliQ. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 1 hora seguido de 16 horas a 16°C. Os vetores foram transformados e replicados em bactérias *E. coli* (DH5 α) usando o método de transformação por choque térmico (Inoue et al., 1990). Os plasmídeos foram extraídos com o Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) e quantificados por espectrofotometria no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific). A clonagem foi confirmada por digestão com as enzimas de restrição ApaI e PstI.

O vetor pX330E por sua vez foi digerido com a enzima BbsI para clonagem dos gRNAs. A digestão foi conforme descrito anteriormente para os vetores pX330A-1x2 e pX330S-2-PITCh.

A preparação dos RNAs guias para a clonagem incluiu uma etapa de hibridização dos oligonucleotídeos, na qual foram utilizados 2 μ M de cada fita sintetizada. Em seguida, a mistura foi incubada em um termociclador para hibridização, utilizando os seguintes parâmetros: 95°C por 5 minutos, seguido de um resfriamento (*ramp down*) até 25°C a uma taxa de 5°C/minuto (*ramp rate* de 3,5%). Após a hibridização dos oligonucleotídeos, estes foram diluídos para uma concentração de 0,05 μ M, a fim de serem utilizados na ligação com o vetor. A reação de ligação foi preparada em um volume final de 10 μ L, contendo os seguintes componentes: 1X de tampão de ligação 10X, 3 U de T4 DNA ligase, 20 ng de vetor linearizado e 0,1 μ M de oligos, com o volume final completado com água MilliQ. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 1 hora e depois 16°C por 16 horas. Os vetores foram transformados e replicados em bactérias *E. coli* (DH5 α) usando o método de transformação por choque térmico (Inoue et al., 1990). Os plasmídeos foram extraídos com o Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) e quantificados por espectrofotometria no espectrofotômetro

NanoDrop (Thermo Scientific). A clonagem foi confirmada por PCR e sequenciamento do tipo Sanger (Macrogen – Coreia). As sequências de todos os oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho estão descritas no apêndice 8.1.

Para confirmar a clonagem do guia utilizando a PCR foi utilizado o primer pX330E seq FWD2 e como primer reverso o próprio oligo do guia. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 20 μ L, utilizando os seguintes componentes: diluição 1:1000 do vetor usado como DNA molde, 3 pmol (0,15 μ M) de cada primer (primer *forward* e primer *reverse*), 0,2 mM de cada dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 U de Taq DNA polimerase, 1,5 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e 1X de tampão 10X. A solução foi ajustada para um volume final com água livre de nucleases. A reação de PCR foi iniciada com uma desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto e 30 segundos. Durante o processo de amplificação, foram realizados 40 ciclos, com as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 20 segundos, seguida de anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos. Após esses ciclos, uma extensão final foi realizada a 72°C por 3 minutos. O protocolo foi encerrado com a manutenção a 4°C, para preservar os produtos amplificados até a análise posterior. Foi utilizada a Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen) para a realização da PCR, que foi verificada por eletroforese em gel de agarose. Os vetores cuja clonagem foi confirmada por PCR foram, então, enviados para sequenciamento tipo Sanger.

Para a construção do vetor contendo o gene repórter eGFP foram desenhados *primers* contendo a sequência de homologia ao PITCh, uma sequência de microhomologia a região do H11 que o guia direciona a clivagem e uma sequência de homologia ao vetor pEF-GFP (Connie Cepko; Addgene #11154), para amplificação do cassete de expressão do eGFP. Os primers utilizados nessa PCR foram: H11-GFP FWD e H11-GFP REV. A reação de PCR foi preparada em um volume final de 25 μ L, contendo os seguintes componentes: 4 ng do vetor pEF-GFP, 0,2 μ M (5 pmol) de cada primer, 200 μ M de cada um dos dNTPs, 1 U de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 1 mM de $MgSO_4$ e 1X de tampão de reação. O volume total foi ajustado com água livre de nucleases para alcançar o volume final desejado. As concentrações de cada componente foram otimizadas para garantir a amplificação eficiente e

específica do fragmento de interesse. A reação de PCR foi iniciada com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, para garantir a completa separação das fitas do DNA. Durante a amplificação, foram realizados 40 ciclos, com as seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos, e extensão a 68°C por 4 minutos. Após os ciclos de amplificação, foi realizada uma etapa de extensão final a 68°C por 5 minutos, para assegurar a completa extensão dos fragmentos amplificados. A reação foi finalizada com a manutenção a 4°C, para conservar o produto da PCR até a análise posterior. O fragmento amplificado na PCR foi aplicado em eletroforese de gel de agarose e purificado do gel usando o kit PureLink Link Quick Gel Extraction and PCR Purification (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante. O fragmento de 2284 pb foi clonado então no vetor de clonagem pGEM-Teasy (Promega) na proporção 3:1 (fragmento:vetor). A reação de ligação foi realizada em um volume final de 10 µL, contendo: 1X de tampão de ligase (10X), 3 U de T4 DNA ligase, 25 ng do vetor pGEM-Teasy e 56 ng do fragmento. O volume final foi ajustado com água MilliQ. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 1 hora e depois 16°C por 16 horas. A ligação foi transformada e replicada em bactérias *E. coli* (DH5α) usando o método de transformação por choque térmico (Inoue et al., 1990). Os plasmídeos foram extraídos com o Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) e quantificados por espectrofotometria no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific). A clonagem foi confirmada por digestão com a enzima de restrição PstI. Esse vetor recebeu nome de pGEM+PITCh-Bi5-GFP e foi confirmado por sequenciamento do tipo Sanger (Macrogen – Coreia)

Também foi construído, seguindo os mesmos parâmetros, um *amplicon* que não continha a região de homologia do PITCh, contendo então a microhomologia ao H11 e o cassete de expressão do eGFP. Essa construção não foi clonada em vetor de clonagem, sendo então armazenada na forma linear, para testar e comparar as duas formas de entrega do gene repórter.

4.2 Cultivo celular

Todos os meios de cultivo usados nesse estudo estão descritos em detalhes no apêndice 8.2. Os fibroblastos bovinos, as células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney Epithelial Cells*) e as células do cumulus de ovário de abatedouro foram cultivados em meio *Dulbecco's Minimum Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 100 ui/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina, 290 mg/L de L-Glutamina (2 mM), 110 mg/L de piruvato de sódio, 4500 mg/mL de glicose e 10% de soro fetal bovino (SFB), nomeado DMEM-USO. As células imortalizadas MAC-T (*Bovine Mammary Epithelial Cells*) foram cultivadas em meio *Dulbecco's Minimum Eagle Medium* (DMEM) como descrito acima acrescido de 5 µg/mL de insulina, nomeado de DMEM-MAC-T. Todos os tipos celulares foram cultivados em garrafas 25 cm² em estufa umidificadas a 37°C e com 5% de dióxido de carbono.

4.3 Transfecção

As células foram cultivadas até atingirem uma confluência de aproximadamente 90-100%, momento em que foram tripsinizadas, quantificadas utilizando a câmara de Neubauer e semeadas em placas de 24 poços (9,5 cm²/poço) a uma densidade de 50.000 a 60.000 células/poço, ajustada conforme o tipo celular. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera com 5% CO₂ para que as células atingissem uma confluência de 60-80%. A densidade celular foi ajustada de modo que, após 24 horas de plaqueamento, as células atingissem essa faixa de confluência.

A eficiência da transfecção pode variar entre diferentes tipos celulares devido a características específicas de cada linhagem. Por isso, é importante otimizar e testar diferentes reagentes, pois cada tipo celular pode responder melhor a um método específico. A transfecção das células de cumulus foi realizada utilizando lipossomos catiônicos com o reagente Lipofectamine LTX (Invitrogen), seguindo o protocolo estabelecido no laboratório (Melo et al., 2005). Para os outros três tipos celulares (fibroblastos, células MDBK e células MAC-T), diferentes reagentes de transfecção foram testados para determinar a melhor abordagem para cada uma delas. Para os fibroblastos, foram avaliados os

reagentes Lipofectamine LTX (Invitrogen) e os polímeros Xfect (Takara Bio). Para as células MDBK, testou-se Lipofectamine 2000 (Invitrogen) e os polímeros Xfect (Takara Bio). Já para as células MAC-T, foram testados Lipofectamine 2000, Lipofectamine LTX e os polímeros Xfect (Takara Bio). Todas as transfecções foram conduzidas seguindo as recomendações dos respectivos fabricantes para cada reagente.

O meio de transfecção utilizado para as células de cumulus, fibroblastos e MDBK foi DMEM sem suplementação, e a transfecção teve duração de 6 horas. Após esse período, foi adicionado meio DMEM-USO para continuidade do cultivo. Para as células MAC-T, testou-se diferentes condições de meio de transfecção: DMEM sem suplementação, DMEM-MACT suplementado com 10% de SFB e sem a adição de antibióticos e DMEM-MACT suplementado com 20% de SFB e sem a adição de antibióticos. Esses testes foram realizados para determinar a condição mais eficiente para a transfecção dessas células.

Como controle positivo, foi utilizado 500 ng do vetor pEF-GFP, permitindo a avaliação da eficiência de transfecção em cada ensaio por meio da expressão de GFP. As células foram avaliadas 48 horas após a transfecção quanto à mortalidade, possíveis alterações morfológicas e, quando aplicável, à expressão de eGFP.

Todos os experimentos de transfecção foram realizados em triplicatas técnicas, conduzidas em dias independentes. Cada réplica técnica foi realizada em duplicata.

4.4 Otimização do ensaio de T7E1

A enzima T7E1 (T7 endonuclease 1) é eficaz na detecção de mutações do tipo INDELS (inserções e deleções), comumente geradas pelo sistema CRISPR/Cas (Vouillot et al., 2015). Isso ocorre porque a T7E1 reconhece heteroduplexes de DNA, que formam alças de DNA de fita simples (*missmatch*) durante a hibridação, as quais são reconhecidas e digeridas pela enzima (figura 6). Para otimizar o protocolo de digestão com essa enzima, diferentes parâmetros foram testados, incluindo a quantidade de enzima, a quantidade de

DNA e o tempo de incubação, visando determinar as condições com melhor eficiência

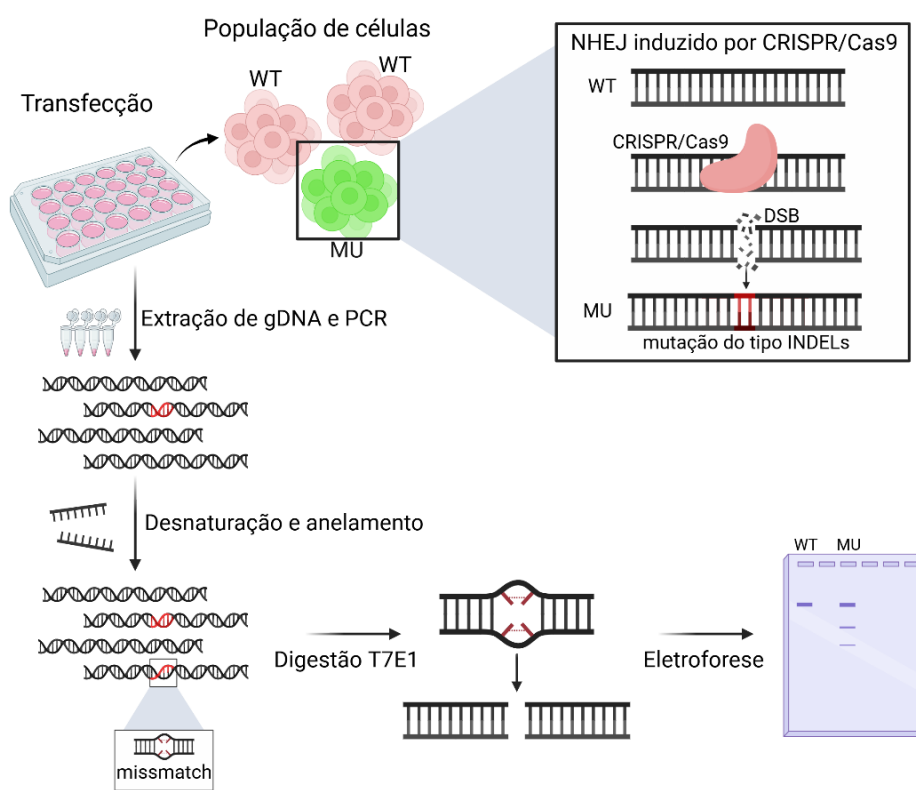


Figura 6. Mecanismo de ação do ensaio de T7E1. Após a amplificação por PCR da região alvo do gRNA, as fitas de DNA mutado e não mutado podem formar heteroduplexes, contendo *missmatch* na região da mutação. A enzima T7E1 reconhece essas imperfeições na dupla hélice e realiza a clivagem nos pontos de despareamento, gerando fragmentos de DNA. Esses fragmentos podem ser analisados por eletroforese, permitindo a detecção de INDELS.

Fonte: Elaborado pelo autor utilizando BioRender.

A primeira etapa da digestão envolve uma desnaturação seguida de anelamento para a formação dos heteroduplexes. Os parâmetros utilizados foram: 95°C por 10 minutos, seguidos de um *ramp down* para 85°C a -0,4°C/seg, e de 85°C para 25°C a -0,1°C/seg. Em seguida, foi adicionada a enzima T7E1, e a reação foi incubada a 37°C pelo tempo determinado. Para parar a reação, foi adicionado 20 mM de EDTA. O volume final da reação foi de 20 µL. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, realizada por 3 horas a 60V.

Foram testadas as concentrações de 200 ng e 300 ng de produto de PCR purificado contendo o sítio alvo dos gRNAs analisados, além de diferentes

quantidades de T7E1 (10U, 5U e 2U) e tempos de incubação de 15, 30 e 60 minutos. A enzima T7E1 utilizada foi da New England BioLabs, e o protocolo recomendado pelo fabricante sugere o uso de 200 ng do *amplicon*, 10 U de T7E1 e 15 minutos de incubação. Os ensaios de T7E1 foram realizados em triplicatas técnicas, conduzidas em dias independentes.

As células de cumulus, fibroblastos, MDBK e MAC-T transfectadas com os diferentes guias foram utilizadas no ensaio de T7E1 para avaliar a eficiência de cada guia na indução de mutações do tipo INDELS.

4.5 Sequenciamento e alinhamento de região do *locus* H11 entre os diferentes tipos celulares

Foi realizada a PCR da região do *locus* H11, utilizando os primers Bi H11 FWD4 e Bi H11 REV10, que amplificam o fragmento denominado F4R10 (1014 pb), em todos os tipos celulares empregados neste estudo. O objetivo foi caracterizar a sequência de DNA do *locus* H11 na região estabelecida para ser alvo do sistema CRISPR/Cas9 e analisar possíveis polimorfismos dessa região entre os diferentes tipos celulares, evitando-se assim o uso de primers e gRNAs que anelassem em regiões polimórficas do *locus* H11. Os *amplicons* obtidos foram clonados no vetor de clonagem pGEM-Teasy. As clonagens foram transformadas e replicadas em bactérias *E. coli* (DH5 α), utilizando o método de transformação por choque térmico, conforme descrito por Inoue et al. (1990). Após a transformação, os plasmídeos foram purificados utilizando o Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) e quantificados por espectrofotometria no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific). Os clones positivos foram enviados para sequenciamento Sanger (Macrogen - Coreia) para análise da sequência.

4.6 Análise molecular para detectar a eficiência do gRNA em promover INDELS no *locus* H11

As células transfectadas foram avaliadas quanto à eficiência do gRNA na indução de INDELS no *locus* H11, com o objetivo de selecionar o gRNA mais

eficaz. O DNA genômico (gDNA) das células transfectadas foi extraído e purificado utilizando o PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Este gDNA foi então utilizado em um ensaio de PCR, empregando primers para regiões que flanqueiam o sítio de clivagem do gRNA no locus H11. Os produtos amplificados foram purificados com o PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen), quantificados e, em seguida, submetidos à digestão com a T7 Endonuclease I (BioLabs), nas condições otimizadas nesse estudo, para identificar possíveis mutações INDELS inseridas pela Cas9+gRNAs.

Após a realização dos ensaios de T7E1 e a seleção do gRNA mais eficiente, o fragmento de PCR foi clonado no vetor de clonagem pGEM-Teasy (Promega). A reação de ligação foi transformada e replicada em bactérias *E. coli* (DH5 α), utilizando o método de transformação por choque térmico descrito por Inoue et al. (1990). Os clones positivos foram isolados e o DNA plasmidial extraído utilizando o Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Um total de 25 clones foi enviado para sequenciamento (MacroGen - Coreia) com o objetivo de confirmar a eficiência da edição promovida pelo gRNA. O resultado do sequenciamento dos clones foi analisado através do software DECODR (<https://decodr.org>) (Bloh et al., 2021).

Diversos *primers* foram desenhados para a avaliação de cada um dos gRNAs testados. As sequências dos primers estão disponíveis no Apêndice 8.1. A figura 7 ilustra de forma esquemática os locais de anelamento de cada *primer* na região do *locus* H11 bovino.



Figura 7. a) Representação esquemática do locus H11, flanqueado pelos genes DRG1 e EIF4ENIF1 no cromossomo 17 bovino, e o conjunto de primers utilizados no presente trabalho. **b)** Representação esquemática aproximada de onde os primers e guias anelam.

Fonte: Elaborado pelo autor utilizando SnapGene.

4.7 Ensaio de transfecção para inserção do eGFP no *locus* H11 e isolamento de clones editados

As células MAC-T foram transfectadas conforme descrito anteriormente, utilizando 500 ng do vetor pX330E Bi5 e 500 ng do vetor ou do fragmento linear contendo o cassete de expressão do eGFP. Após a transfecção, as células foram avaliadas quanto à mortalidade e à eficiência da transfecção, por meio da expressão transiente de eGFP.

Foram testadas três metodologias para o isolamento de linhagens clonais editadas. Nas duas primeiras metodologias, as células foram contadas utilizando

câmara de Neubauer e, em seguida, 200 células foram semeadas em uma placa de cultivo de 60 mm x 15 mm. Após a adesão celular, as células isoladas foram identificadas e monitoradas por alguns dias (figura 8a). Aproximadamente cinco dias depois, as células formaram aglomerados (colônias), o que permitiu o isolamento das colônias. O primeiro método testado utilizou cilindros de vidro estéreis (figura 8b). Os cilindros eram posicionados sobre as colônias, 100 µL de tripsina eram adicionados, e a incubação era feita por 5-10 minutos. Após a retirada da tripsina, as células eram transferidas para uma placa de cultivo de 24 poços. O segundo método utilizou discos de clonagem (Sigma-Aldrich), que eram imersos em tripsina e, em seguida, colocados sobre a colônia a ser isolada (figura 8c). O disco era incubado por 5 minutos e, em seguida, transferido para uma placa de cultivo de 24 poços.

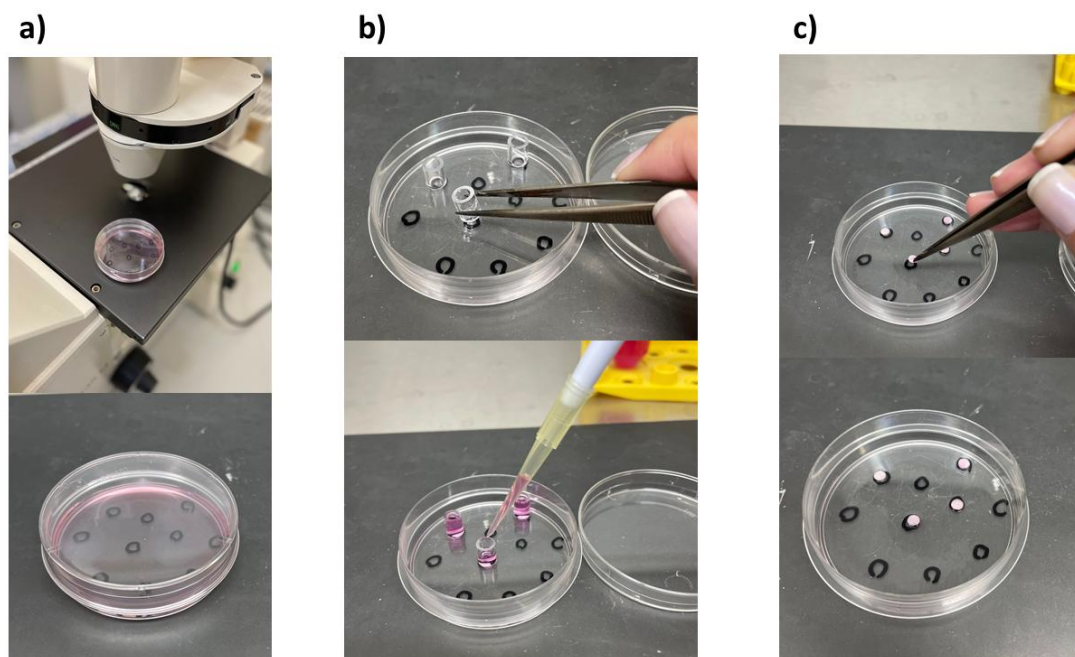


Figura 8. Métodos testados para isolamento de linhagens clonais editadas. **a)** as células isoladas eram marcadas para isolamento. **b)** Isolamento de linhagem clonal utilizando cilindros de vidro. **c)** Isolamento de linhagem clonal utilizando filtros clonais.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O terceiro método testado para o isolamento de clones editados foi a diluição crítica. Aproximadamente 48 horas após a transfecção, as células foram contadas utilizando câmara de Neubauer e, em seguida, realizada uma diluição para obter 200 células em 10 mL de meio DMEM-MACT (20 células/mL). Essa

diluição foi calibrada experimentalmente para otimizar o número de poços com apenas uma célula em cada poço de uma placa de 96 poços, buscando o melhor aproveitamento no isolamento de colônias. Foi adicionado 100 µL dessa diluição em cada poço da placa de 96 poços. Cada poço foi, então, avaliado para confirmar se continha nenhuma célula, apenas uma célula ou mais de uma célula. Os poços que continham somente uma célula foram analisados quanto à expressão de eGFP. Os poços GFP positivos foram acompanhados por cerca de uma semana para verificar se a expressão era transiente ou se houve integração efetiva do gene no *locus* H11. Os poços que, no início do ensaio, continham nenhuma célula ou mais de uma célula foram registrados para cálculo de eficiência futura, mas desconsiderados nas etapas subsequentes de avaliação de GFP e crescimento de colônias.

4.8 Análise molecular para detectar a inserção do eGFP no *locus* H11

As células transfectadas foram investigadas quanto a inserção do eGFP no *locus* H11. O DNA genômico das células transfectadas foi extraído e purificado com o kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Esse gDNA foi utilizado como *template* em uma PCR utilizando primers que tem homologia a uma região dentro do gene eGFP e primers com homologia a região no *locus* H11, amplificando assim somente se a célula foi editada e o eGFP inserido na região alvo no H11. Foram utilizados dois conjuntos de primers, um para amplificar a região inicial do gene, chamo de “fragmento H11-GFP UP” e um a porção final do cassete de expressão, nomeado “Fragmento H11-GFP DOWN”. No primeiro *amplicon* (495pb) o primer FWD foi o Bi H11 FWD5 e como primer REV foi utilizado um primer dentro do promotor EF1α, o qPCR H11-GFP REV1. Já para o segundo fragmento (658pb) o primer FWD utilizado foi o GFP H11 FWD, um primer que anela no gene eGFP, e o reverso foi o Bi H11 REV5.

A reação de PCR foi preparada em um volume final de 20 µL, contendo os seguintes componentes: 100 ng de gDNA, 0,15 µM (3 pmol) de cada primer, 200 µM de cada um dos dNTPs, 1,5 U de Taq DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂ e 1X de tampão de reação. O volume final foi ajustado com água livre de

nucleases. A reação de PCR foi iniciada com uma desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto e 30 segundos. Durante a amplificação, foram realizados 40 ciclos, compostos pelas seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto e 20 segundos. Após os ciclos de amplificação, foi realizada uma etapa de extensão final a 72°C por 3 minutos, para garantir que todos os fragmentos amplificados estivessem completamente estendidos. A reação foi finalizada com a manutenção a 4°C, visando conservar o produto amplificado até a análise posterior. Esses parâmetros foram cuidadosamente ajustados conforme as especificidades dos primers e do DNA alvo, com o objetivo de otimizar a eficiência e a especificidade da amplificação do fragmento desejado. Foi utilizada a enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). O fragmento amplificado na PCR foi aplicado em eletroforese de gel de agarose e purificado do gel usando o kit PureLink Link Quick Gel Extraction and PCR Purification (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante. Os fragmentos foram clonados no vetor de clonagem pGEM-Teasy (Promega) na proporção 3:1 (fragmento:vetor). A ligação foi transformada e replicada em bactérias *E. coli* (DH5 α) usando o método de transformação por choque térmico (Inoue et al., 1990). Os clones foram isolados e o DNA plasmidial extraído com o Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). 8 clones, sendo 4 de cada fragmento, foram enviados para o sequenciamento (Macrogen - Coreia) a fim de confirmar a sequência.

4.9 Ensaio de transfecção para inserção do eGFP no *locus* H11 com auxílio de SCR7, RS-1 e L755507

As células MAC-T foram transfectadas conforme descrito anteriormente, utilizando 500 ng do vetor pX330E Bi5 e 500 ng do vetor pGEM+PiTCh-Bi5-GFP. Após a transfecção, as células foram avaliadas quanto à mortalidade e à eficiência de transfecção, sendo esta última medida por meio da expressão transiente do eGFP. Para avaliar a possibilidade de aumentar a inserção do eGFP no genoma bovino, diferentes compostos foram adicionados tanto ao meio de transfecção quanto ao meio pós-transfecção. Os fatores utilizados foram: 80 μ M de SCR7, 15 μ M de RS-1 e 20 μ M de L755507, em poços separados. Como

controle positivo da transfecção, foi utilizado 500 ng do vetor pEF-GFP, permitindo avaliar a eficiência de transfecção de cada ensaio com base na expressão do eGFP. Cada tratamento foi realizado em duplicatas técnicas, com os fatores sendo administrados durante a transfecção e nas primeiras 48 horas após o procedimento. Sete dias após a transfecção, o gDNA foi extraído e purificado utilizando o PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). O gDNA extraído foi então armazenado para uso posterior. Este ensaio foi realizado em triplicatas técnicas, conduzidas em dias independentes.

4.10 qPCR para analisar qual fator auxilia no *knock-in* do eGFP

O gDNA extraído das transfecções que utilizaram diferentes compostos foram utilizados em um ensaio de qPCR para quantificar qual tratamento resultava no maior número de células com *knock-in* do gene eGFP. Para normalização do ensaio foi desenhado um par de *primers* em uma região próxima à região editada, no *locus* H11, usada como referência para o ensaio. Foram desenhados dois pares de *primers* para avaliar a inserção, um na região do início do gene e o outro na região final do eGFP. Em ambos casos um *primer* era no *locus* H11 e o outro no gene eGFP, amplificando assim somente caso o *knock-in* tenha acontecido no sítio desejado. As sequências dos primers estão disponíveis no Apêndice 8.1.

A reação de qPCR foi preparada em um volume final de 25 µL, contendo 150 ng de gDNA, 0,2 µM de cada primer e 12,5 µL do Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas). As reações foram realizadas em um sistema 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). As condições incluíram uma etapa inicial de *holding* a 50°C por 20 segundos e 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento/extensão), finalizando com uma curva de dissociação (ou curva de *melting*) de 60°C a 95°C. As amostras foram analisadas em triplicata técnica. A eficiência dos *primers* variou entre 90-100%. A especificidade de cada produto de PCR foi determinada pela análise da curva de dissociação (*melting curve*) e pelo tamanho do *amplicon* em gel de agarose. O *threshold* foi ajustado

para 0,02 Δ RN e a linha de base foi definida como padrão do programa qPCR. O *amplicon* de referência foi utilizado para a normalização dos dados.

4.11 Cultivo de embriões

Todos os meios de cultivo usados nesse estudo estão descritos em detalhes no apêndice 8.2. Os ovários foram obtidos de abatedouro, de bovinos *Bos taurus*. Primeiramente, os ovários foram lavados com solução salina contendo penicilina e estreptomicina. Em seguida, preparou-se um béquer com cerca de 100 mL de meio de cultura OCM (Oocyte Culture Medium) suplementado. Para colher os complexos cúmulo-ovócito imaturos (COCs), a superfície de cada ovário foi cortada com um bisturi. Os ovários foram então imersos no meio OCM, agitados para permitir que os COCs caíssem no meio de coleta. Para cada béquer foi coletado de 10 a 15 ovários. O meio de coleta contendo os COCs foi filtrado com um filtro de 100 μ m, e os COCs foram lavados com OCM utilizando uma seringa para enxaguar as células aderidas ao filtro. Após a coleta, os COCs foram cuidadosamente rastreados com uma pipeta e transferidos para uma placa tipo "X" (X-plate) com OCM. Os COCs foram lavados pelo menos três vezes para garantir a remoção de detritos, e apenas aqueles com citoplasma uniforme e pelo menos duas camadas de células do cúmulus foram selecionados. Grupos de 50 COCs foram então colocados em cada poço de uma placa de maturação e incubados a 38,5°C por 21 -24 horas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ para a maturação dos ovócitos.

Após o período de maturação, os COCs foram lavados duas vezes em meio HEPES-TALP e transferidos para uma placa de 35 mm contendo 1,7 mL de meio IVF-TALP para a fertilização. A fertilização foi realizada com espermatozoides de um único touro *Bos taurus*. Os espermatozoides foram purificados a partir de palhetas congeladas utilizando um gradiente de Percoll, seguido de centrifugação por 5 minutos a 5000 rpm. 100 μ L do pellet de espermatozoides foi transferido para um tubo com 1 mL de HEPES para lavagem. Foi lavado duas vezes com HEPES e centrifugado a 3000 rpm em cada lavagem. Os espermatozoides foram contados e, em seguida, diluídos em IVF-TALP para atingir uma concentração final de 10⁷ espermatozoides/mL na placa

de fertilização. Para melhorar a motilidade espermática e promover a fertilização, foi adicionada uma solução de penicilamina-hipotaurina-epinefrina (PHE) à placa de fertilização. A fertilização foi realizada por 14 horas a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂.

4.12 Preparo dos complexos ribonucleoproteicos (RNPs) para uso na eletroporação dos embriões bovinos

O crRNA, tracrRNA e a proteína Cas9 foram comprados da IDT (Integrated DNA Technologies). O crRNA utilizado foi o escolhido previamente nos ensaios com células. crRNA e tracrRNA foram ressuspensos para uma concentração de 1000 ng/μL e anelados usando quantidades iguais, aquecendo a 95°C por 5 minutos e, em seguida, resfriados de 95°C para 25°C com uma taxa de decaimento de -1°C/12seg em um termociclador Veriti 96-well (ThermoFisher). Após o processo de anelamento, a solução foi diluída para obter uma concentração de 300 ng/μL do complexo crRNA-tracrRNA (gRNA). A Cas9 foi diluída para concentração final de 500 ng/μL. Foi utilizado o cassete de expressão do eGFP de forma linear, contendo então a microhomologia ao H11 e o eGFP.

A solução RNP foi preparada antes da eletroporação, em um volume final de 12 μL, contendo os seguintes componentes: 50 ng/μL do complexo gRNA-tracrRNA, 125 ng/μL de Cas9, 62,5 ng/μL de eGFP e 0,01 ng/μL de citocalasina B. O volume final foi ajustado com meio OPTI-MEM. Após a preparação, a solução RNP foi incubada em gelo por 5 a 10 minutos antes de ser utilizada na eletroporação.

4.13 Eletroporação de embriões bovinos com RNPs

Os zigotos foram coletados da placa de fertilização, com o mínimo de líquido sendo usado durante o processo. Os zigotos foram então transferidos para um tubo de 1,5 mL com hialuronidase e vortexados por 5 minutos. Para o processo de lavagem, preparou-se uma placa tipo "X" (X-plate): no poço 1 colocou-se o conteúdo do tubo; nos poços 2 e 3, adicionaram-se três grandes

gotas de HEPES-TALP cada; e no poço 4, prepararam-se gotas adicionais de HEPES-TALP para lavagem, se necessário.

O conteúdo do tubo foi colocado na seção 1 da *X-plate*, e o tubo foi enxaguado com HEPES-TALP, transferindo o líquido para a mesma seção. Em seguida, os zigotos foram cuidadosamente transferidos para as gotas de HEPES-TALP na seção 2 da placa. O objetivo foi retirar todos os zigotos da hialuronidase o mais rápido possível e colocá-los nas gotas de HEPES. Os zigotos foram lavados pelo menos três vezes, movendo-os de uma gota para outra, descartando-se qualquer zigoto visivelmente danificado ou em processo de degeneração.

Os zigotos foram incubados em pronase 0,1% por 30 segundos para o afinamento da zona pelúcida antes de prosseguirem para a etapa seguinte. Em uma placa foram feitas 3 gotas de OPTI-MEM e 2 gotas menores com 6 μ L cada da solução de RNP, como mostrado na figura 9. Os zigotos foram lavados rapidamente nas gotas de OPTI-MEM e lavados 1x na solução RNP. Foram transferidos então para gota final de RNP e colocados na placa do eletroporador.

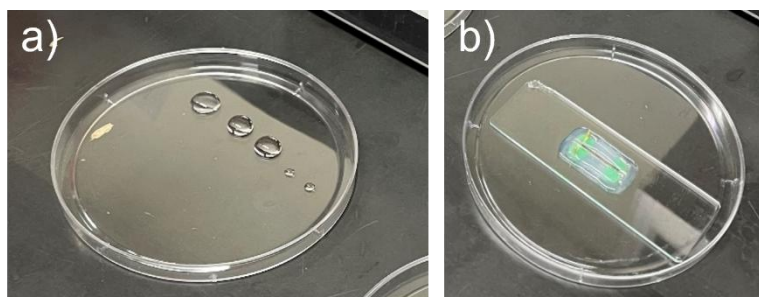


Figura 9. a) Placa com 3 gotas de OPTI-MEM e as 2 gotas da solução RNP. b) Placa da eletroporação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A impedância no eletroporador precisa estar entre 0.18 e 0.22. Se não tiver é preciso remover ou adicionar meio até que esteja dentro desses valores. Os pulsos de formação de poros (*Poring pulse*) foram aplicados com uma tensão de 20 V, consistindo em 6 pulsos de 1,5 ms, com intervalos de 50 ms e uma taxa de decaimento de 10%. Para os pulsos de transferência (*Transfer pulse*), a tensão foi ajustada para 3 V/mm, com 5 pulsos de 50 ms, intervalos de 50 ms e

uma taxa de decaimento de 40%. O processo de eletroporação pode ser visualizado na figura 10. Após a eletroporação os zigotos foram lavados 3 vezes em HEPES, lavados em SOF-BE2 e colocados na placa de cultivo. A placa de cultivo foi preparada contendo 500 μ L de SOF-BE2 cobertos com 300 μ L de óleo mineral. A estufa foi ajustada para uma temperatura de 38,5°C, com capacidade para manter um ambiente gasoso com 5% (v/v) de CO₂ e 5% (v/v) de O₂ em ar umidificado. O desenvolvimento embrionário foi avaliado pela taxa de clivagem no D3 e pela taxa de formação de blastocistos no D8. No D8, os blastocistos foram congelados individualmente em tubos de 0,2 mL, com um volume final de 4 μ L de PBS 1X para posterior lise celular, liberação do gDNA, amplificação por PCR e sequenciamento.

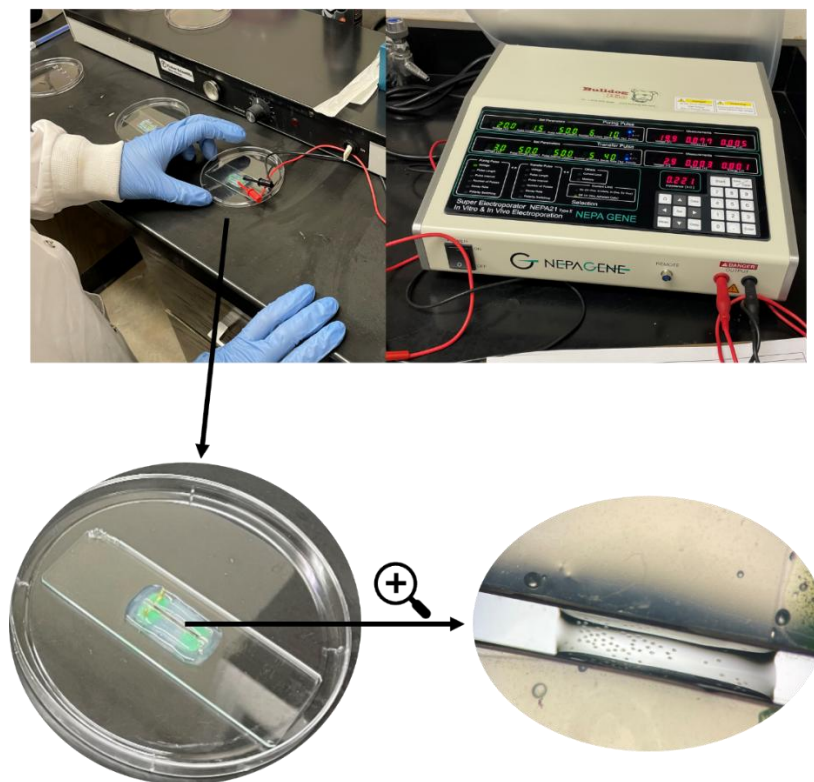


Figura 10. Processo de eletroporação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.14 Lise dos embriões

Os embriões foram lisados utilizando a solução QuickExtract DNA (LGC). Foram testados diferentes volumes da solução de lise (6 μ L, 8 μ L e 11 μ L), gerando volumes finais de 10 μ L, 12 μ L e 15 μ L, respectivamente, com o objetivo

de determinar o volume ideal para o experimento. Embriões do grupo controle foram utilizados para a realização desse teste. No grupo teste 1, foi utilizado 6 µL da solução de lise; no grupo teste 2, 8 µL; e no grupo teste 3, 11 µL. Após a determinação do volume ideal de solução de lise, todos os embriões eletroporados foram lisados utilizando o procedimento estabelecido. O preparo das amostras consistiu na adição da solução QuickExtract DNA a tubos contendo os embriões em 4 µL de PBS 1X, seguidos de vortexação por 15 segundos. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 65°C por 6 minutos. Após esse período, as amostras foram vortexadas novamente por 15 segundos e aquecidas a 98°C por 2 minutos, sendo armazenadas a -20°C até serem utilizadas na PCR.

4.15 Análise molecular para detectar a edição gênica no *locus* H11 nos embriões bovinos

Primeiramente foi realizada PCR nos grupos teste com os diferentes volumes de solução de lise. Os primers utilizados foram Bi H11 FWD5 e Bi H11 REV5. Para esse teste foi utilizado o DreamTaq Hot Start PCR Master Mix (Thermo Scientific). A reação de PCR foi preparada em um volume final de 25 µL, contendo os seguintes componentes: 3 a 7 uL do gDNA, 0,2 µM (5 pmol) de cada primer, 12,5 µL do master mix. O volume final foi ajustado com água livre de nucleases.

Para avaliar os embriões lisados com diferentes volumes de solução de lise, foi realizada a PCR utilizando os seguintes volumes:

- 5 µL do teste 1
- 3 µL do teste 1
- 5 µL do teste 2
- 4 µL do teste 2
- 5 µL do teste 3
- 7 µL do teste 3

A reação de PCR foi iniciada com uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos. Durante a amplificação, foram realizados 40 ciclos, compostos pelas seguintes etapas: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os ciclos de amplificação, foi realizada uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

A reação foi finalizada com a manutenção a 4°C. 5 µL do produto da PCR foi aplicado em eletroforese de gel de agarose para confirmação. O gel foi comprado da BioRad: Wide Mini ReadyAgarose 1% TBE EtBr (ref 1613004).

Uma vez definido o melhor volume do tampão de lise, todos os embriões eletroporados e lisados com o volume escolhido foram submetidos a PCR para analisar a geração de INDELS. A reação de PCR foi preparada em um volume final de 25 µL, contendo os seguintes componentes: 5 uL do gDNA, 0,2 µM (5 pmol) de cada primer, 200 µM de cada um dos dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerase, 2,0 mM de MgSO₄ e 1X de tampão de reação. O volume final foi ajustado com água livre de nucleases. A reação de PCR foi iniciada com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos. Durante a amplificação, foram realizados 40 ciclos, compostos pelas seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, e extensão a 68°C por 40 segundos. Após os ciclos de amplificação, foi realizada uma etapa de extensão final a 68°C por 5 minutos. A reação foi finalizada com a manutenção a 4°C, visando conservar o produto amplificado até a análise posterior. Foi utilizada a enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) e 2 uL do produto da PCR foi aplicado em eletroforese de gel de agarose para confirmação. Os géis foram comprados da BioRad: Wide Mini ReadyAgarose 1% TBE EtBr (Ref 1613034 para o de 32 poços, 1613010 para o de 12 poços e 1613004 para o de 8 poços). Após confirmação, o produto de PCR foi purificado usando o Micro Kit PureLink (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. Os *amplicons* purificados foram quantificados utilizando o Agilent BioTek microplate readers e enviados para o sequenciamento Sanger (Eton Bioscience-EUA) a fim de confirmar as sequências de DNA do *locus* H11.

4.16 Análise estatística

Inicialmente, todas as variáveis foram analisadas de maneira descritiva. Para as variáveis quantitativas, realizou-se a verificação dos valores mínimo e máximo, bem como o cálculo da média, desvio-padrão e mediana. Para as variáveis qualitativas, foram calculadas as frequências absolutas e relativas. Em seguida, foi conduzido um teste de normalidade para avaliar se as variáveis

seguiram uma distribuição normal, o que determinaria a aplicação de métodos paramétricos, ou se seriam mais adequadas análises não paramétricas. Para a comparação de médias entre dois grupos, utilizou-se o teste t de Student para amostras independentes, no caso de variáveis paramétricas, e o teste de Mann-Whitney para variáveis não paramétricas. Quando a comparação envolveu três ou mais grupos, foi utilizado o teste de ANOVA para variáveis paramétricas e o teste de Kruskal-Wallis para variáveis não paramétricas. Para a análise de homogeneidade de proporções entre os grupos, utilizou-se o teste Qui-quadrado. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5% (valor de $p < 0,05$). As análises foram realizadas no software estatístico R (R Core Team, 2024), utilizando-se o pacote multcomp (versão 1.4.26) e os gráficos foram montados no programa GraphPad Prism 8.0.1

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção dos vetores

Na figura 11 é possível ver a representação esquemática da construção do vetor pX330E, o qual foi utilizado na clonagem dos gRNAs.

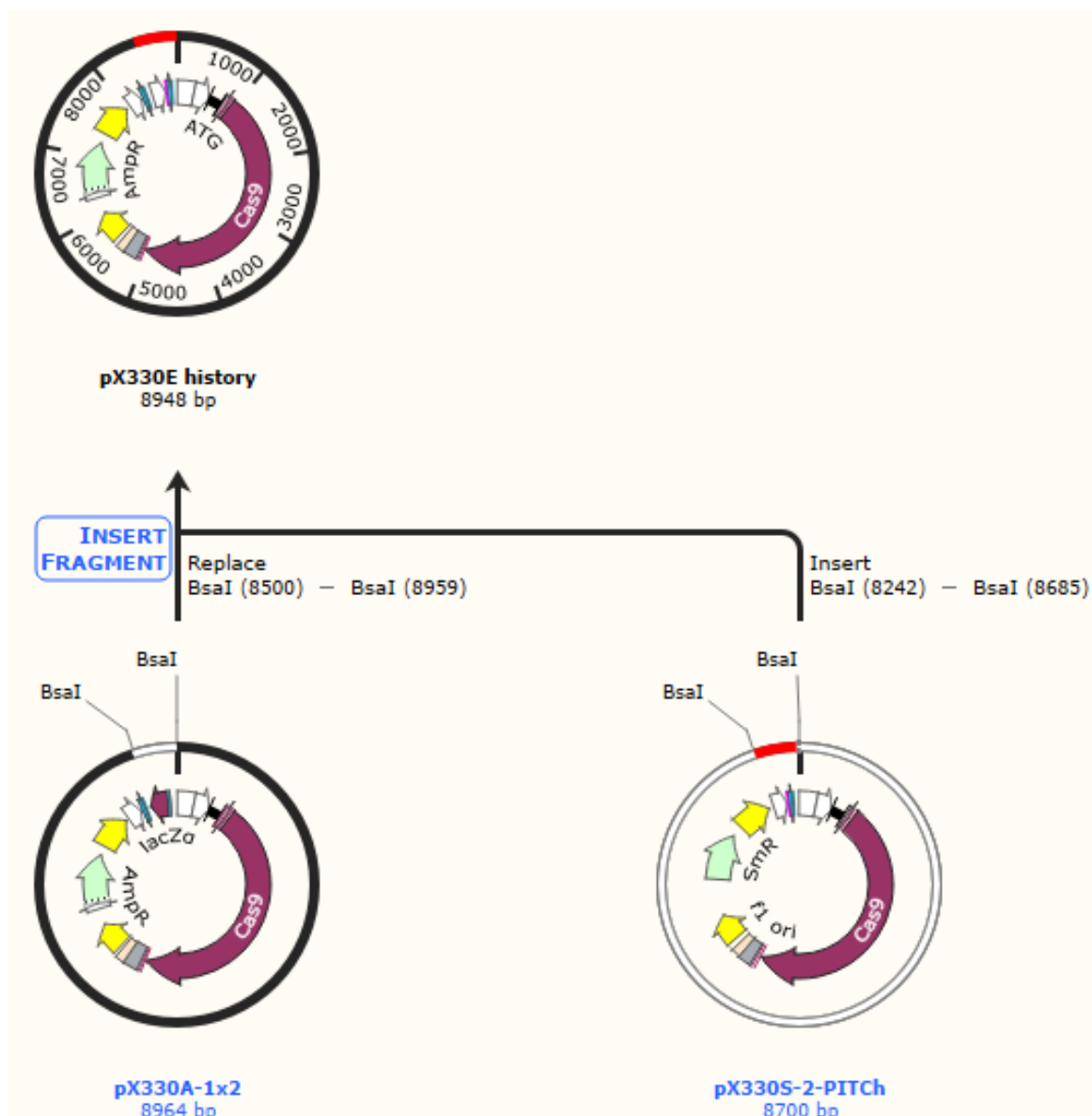


Figura 11. Construção esquemática do vetor pX330E. O vetor foi construído a partir do pX330A-1x2 digerido com BsaI e do fragmento PITCH retirado do vetor pX330S-2-PITCH por digestão com BsaI. A sequência codificadora do gRNA PITCH está destacada em vermelho.

Fonte: Elaborado pelo autor utilizando SnapGene

A clonagem do vetor pX330E foi confirmada por meio de digestão com as enzimas de restrição Apal e PstI. O padrão esperado de digestão para cada vetor é apresentado na tabela a seguir:

Tabela 1. Padrão de digestão do vetor com as enzimas Apal e PstI

ApaI		
pX330E	pX330A 1x2	pX330S PITCH
8948pb	6441pb	8700pb
	2523pb	
PstI		
pX330E	pX330A 1x2	pX330S PITCH
3016pb	3016pb	3211pb
1744pb	2202pb	1743pb
1422pb	1422pb	1422pb
1212pb	1212pb	1212pb
878pb	878pb	878pb
442pb	204pb	204pb
204pb	30pb	30pb
30pb		

Fonte: Elaborado pelo autor.

A confirmação da clonagem do vetor pX330E foi realizada por digestão com as enzimas de restrição Apal e PstI, conforme mostrado na figura 12. Além disso, os vetores foram validados por sequenciamento.

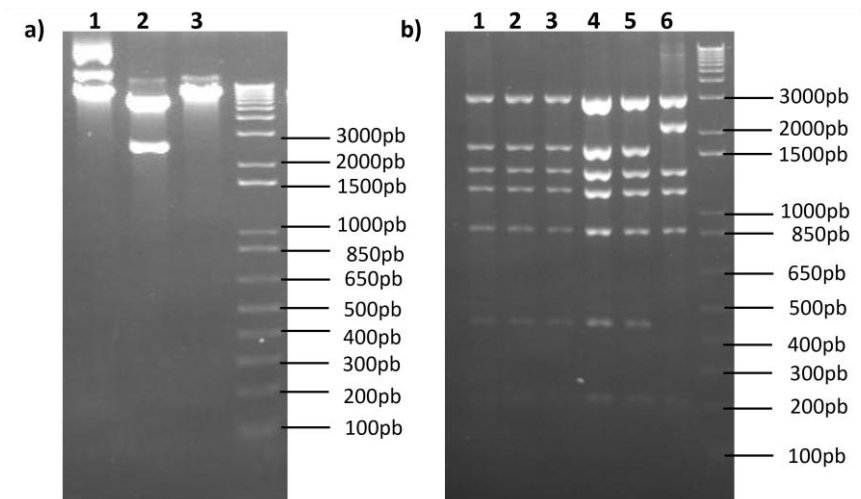


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose. **a)** Digestão com Apal, com o poço 1 representando o vetor pX330E, o poço 2 o vetor pX330A 1x2 e o poço 3 o vetor pX330S-2-PITCh. **b)** Digestão com PstI, com os poços 1 a 5 correspondendo ao pX330E e o poço 6 ao pX330A 1x2.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos os nove guias foram clonados com sucesso no vetor pX330E e confirmados por PCR e sequenciamento. A figura 13 apresenta, de forma esquemática, a localização de homologia de cada guia no *locus* H11.

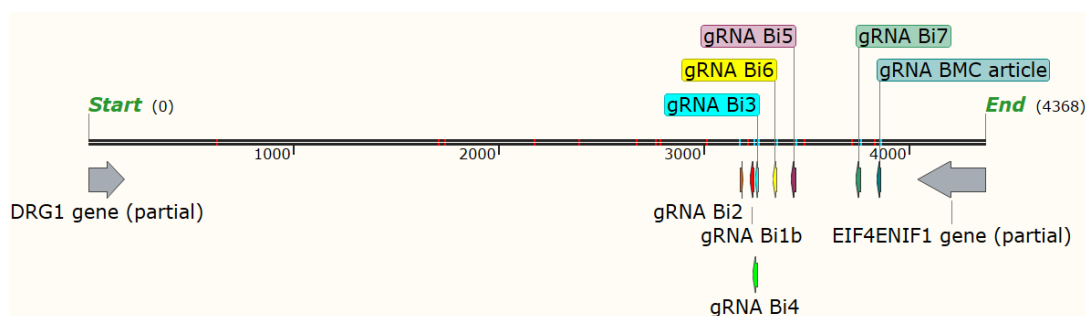


Figura 13. Imagem esquemática do *locus* H11 e a localização dos 9 guias desenhados.

Fonte: Elaborado pelo autor utilizando SnapGene.

Após os testes com a enzima T7E1, o RNA guia selecionado foi o gRNA Bi5. As construções contendo o gene repórter foram desenhadas com microhomologia de 20 pb para a região guiada pelo Bi5. A figura 14b apresenta a eletroforese da PCR que amplificou a construção. A figura 14a mostra a construção de forma esquemática. Foi confirmado por sequenciamento.

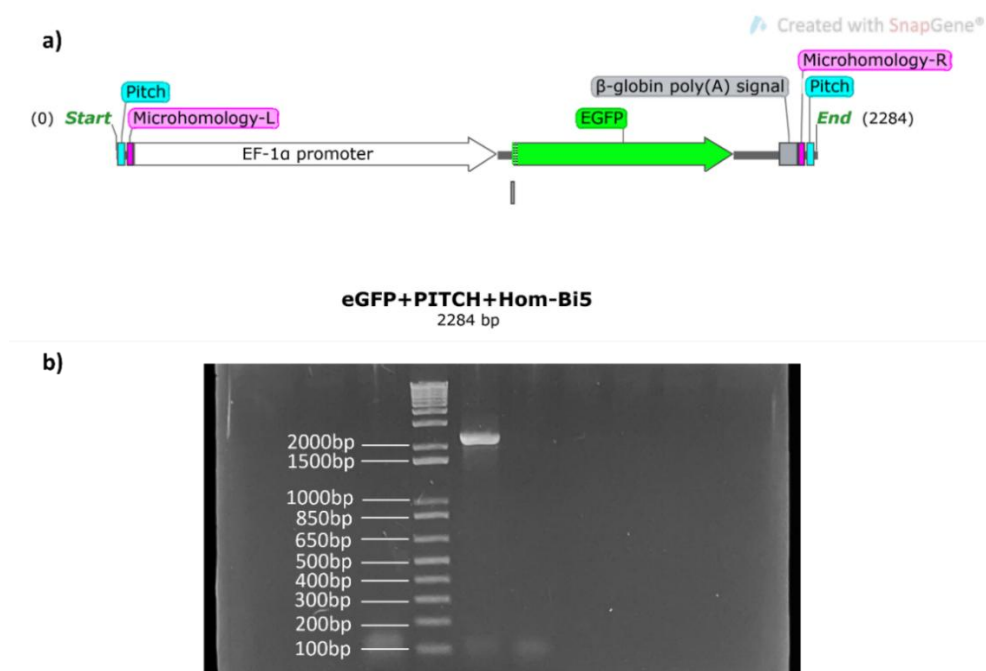


Figura 14. a) Representação esquemática do *amplicon* contendo a sequência PITCh, a microhomologia ao *locus* H11 e o cassete de expressão do eGFP. **b)** Resultados de eletroforese em gel de agarose do *amplicon*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma vez confirmado, o cassete de expressão do eGFP foi mantido na forma linear para os ensaios com embriões bovinos e clonado no vetor pGEM-Teasy para os ensaios com células. A clonagem no pGEM-T foi inicialmente confirmada por digestão com a enzima de restrição EcoRI (figura 15a), seguida de digestão com a enzima PstI (figura 15b), utilizada para verificar a orientação do fragmento clonado. A tabela 2 apresenta o padrão de digestão esperado, considerando a ausência do fragmento no vetor ou a clonagem do fragmento nas orientações *clockwise* (CW) ou *counter-clockwise* (CCW). A confirmação final foi realizada por sequenciamento do tipo Sanger (Macrogen - Coreia).

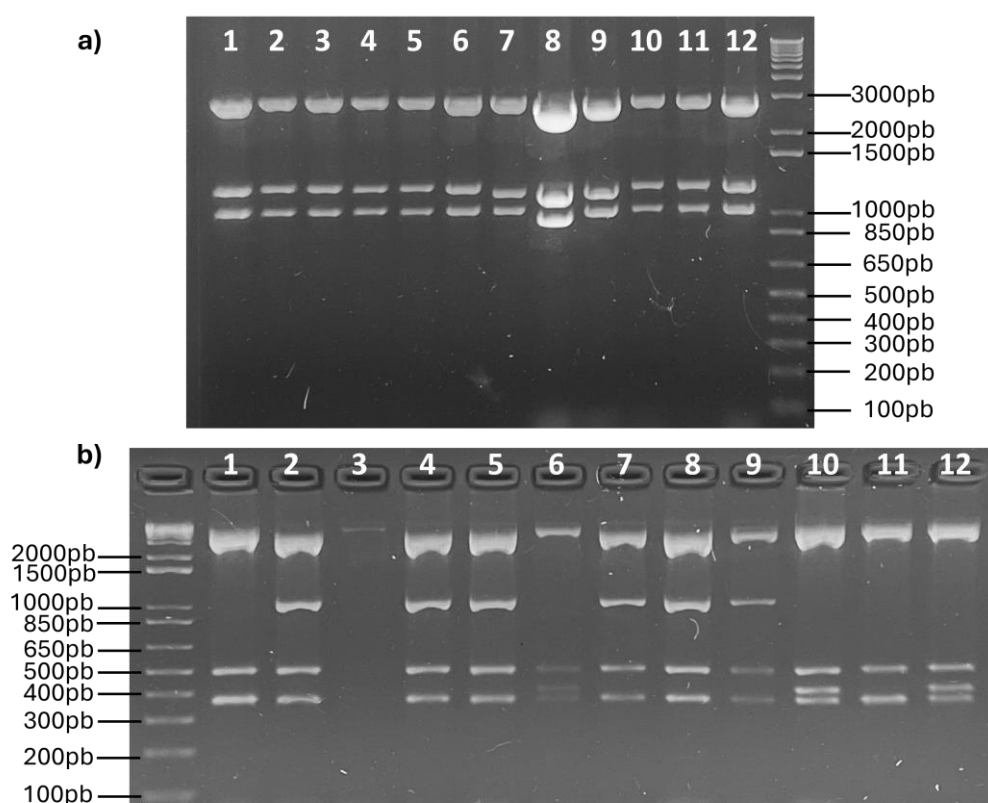


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose. **a)** Digestão com EcoRI. **b)** Digestão com PstI.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como pode ser observado na figura 15b, foi possível clonar o *amplicon* tanto CW como CCW. Para todos os ensaios desse trabalho foi utilizado o vetor pGEM+PITCH-Bi5-GFP CW.

Tabela 2. Padrão de digestão do vetor pGEM-Teasy com as enzimas EcoRI e PstI

EcoRI		
pGEM-T	pGEM+PITCH-Bi5-GFP CW	pGEM+PITCH-Bi5-GFP CCW
3015pb	2997pb	2997pb
	1262pb	1256pb
	1040pb	1046pb
PstI		
pGEM-T	pGEM+PITCH-Bi5-GFP CW	pGEM+PITCH-Bi5-GFP CCW
3015pb	3371pb	4018pb
	1055pb	505pb
	505pb	408pb
	368pb	368pb

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Sequenciamento de 1014pb do locus H11 de células do cumulus, fibroblastos, MDBK e MAC-T e alinhamento.

O resultado do sequenciamento e alinhamento das sequências pode ser visualizado na figura a seguir (figura 16). Foram identificados apenas cinco polimorfismos do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) na região do locus H11 sequenciada (> 1.000 bp), e nenhum deles está localizado dentro das sequências dos gRNAs desenhados e utilizados neste estudo. Os nucleotídeos com variação entre os tipos celulares (SNPs) estão destacados em rosa. As sequências de reconhecimento do gRNA Bi5 (o guia mais eficiente) e o sítio PAM estão destacadas em verde e vermelho, respectivamente.

MACT	ATGGAATTTGATCCAGGTTTCTGTTTGGCCACTGTTGCTTGAGACTGTTTTCCAGATTTT	60
MDBK	ATGGAATTTGATCCAGGTTTCTGTTTGGCCACTGTTGCTTGAGACTGTTTTCCAGATTTT	60
CUM	ATGGAATTTGATCCAGGTTTCTGTTTGGCCACTGTTGCTTGAGACTGTTTTCCAGATTTT	60
FIB	ATGGAATTTGATCCAGGTTTCTGTTTGGCCACTGTTGCTTGAGACTGTTTTCCAGATTTT	60

MACT	TTGTTTATGAAACAAAGCATTTGTGAGAATTCTAAACAGGGCTTATTTCTGAGTTGACT	120
MDBK	TTGTTTATGAAACAAAGCATTTGTGAGAATTCTAAACAGGGCTTATTTCTGAAGTTGACT	120
CUM	TTGTTTATGAAACAAAGCATTTGTGAGAATTCTAAACAGGGCTTATTTCTGAAGTTGACT	120
FIB	TTGTTTATGAAACAAAGCATTTGTGAGAATTCTAAACAGGGCTTATTTCTGAAGTTGACT	120

MACT	CACTCAGGTCCCCTGCAGGGAGGGAGGGGTGAAGCTGAAGTACTATGAAAAGGCAGACC	180
MDBK	CACTCAGGTCCCCTGCAGGGAGGGAGGGGTGAAGCTGAAGTACTATGAAAAGGCAGACC	180
CUM	CACTCAGGTCCCCTGCAGGGAGGGAGGGGTGAAGCTGAAGTACTATGAAAAGGCAGACC	180
FIB	CACTCAGGTCCCCTGCAGGGAGGGAGGGGTGAAGCTGAAGTACTATGAAAAGGCAGACC	180

MACT	TCATGCTCAATCCACAAAGCCAGGTTTTGTGAAAAGT	GACTTGCTATTGTTCTTGGA	240
MDBK	TCATGCTCAATCCACAAAGCCAGGTTTTGTGAAAAGCGACTTGCTATTGTTCTTGGA		240
CUM	TCATGCTCAATCCACAAAGCCAGGTTTTGTGAAAAGCGACTTGCTATTGTTCTTGGA		240
FIB	TCATGCTCAATCCACAAAGCCAGGTTTTGTGAAAAGCGACTTGCTATTGTTCTTGGA		240

MACT	GTATAGGGCAGGGTGGGCAGCTCCAGGTTTATAGGCTGCACCCCTAACCCCTAGGCTGTT		300
MDBK	GTATAGGGCAGGGTGGGCAGCTCCAGGTTTATAGGCTGCACCCCTAACCCCTAGGCTGTT		300
CUM	GTATAGGGCAGGGTGGGCAGCTCCAGGTTTATAGGCTGCACCCCTAACCCCTAGGCTGTT		300
FIB	GTATAGGGCAGGGTGGGCAGCTCCAGGTTTATAGGCTGCACCCCTAACCCCTAGGCTGTT		300

MACT	TTTTTAACCTTTTCAGTCAAAATCCAGTCATCTTGCTAACTTCACTTGTCGCCGAACCAGAA		360
MDBK	TTTTTAACCTTTTCAGTCAAAATCCAGTCATCTTGCTAACTTCACTTGTCGCCGAACCAGAA		360
CUM	TTTTTAACCTTTTCAGTCAAAATCCAGTCATCTTGCTAACTTCACTTGTCGCCGAACCAGAA		360
FIB	TTTTTAACCTTTTCAGTCAAAATCCAGTCATCTTGCTAACTTCACTTGTCGCCGAACCAGAA		360

MACT	TGGTCTCATTATTTGAGCCTCTACTATGAAGTCAAAGTCTAGAGTTGAGGGCCCTAAATGGA		420
MDBK	TGGTCTCATTATTTGAGCCTCTACTATGAAGTCAAAGTCTAGAGTTGAGGGCCCTAAATGGA		420
CUM	TGGTCTCATTATTTGAGCCTCTACTATGAAGTCAAAGTCTAGAGTTGAGGGCCCTAAATGGA		420
FIB	TGGTCTCATTATTTGAGCCTCTACTATGAAGTCAAAGTCTAGAGTTGAGGGCCCTAAATGGA		420

MACT	TAAGAAGTGA	AAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGCACCTCAGATTG	480
MDBK	TAAGAAGTGA	AAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGCACCTCAGATTG	480
CUM	TAAGAAGTGA	AAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGCACCTCAGATTG	480
FIB	TAAGAAGTGA	AAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGCACCTCAGATTG	480

MACT	GGAGGAATAAAAAACCTTCAGTCAGGAAAGGGGACTCAAGGCCATAGTTATTCTGGTAGA		540
MDBK	GGAGGAATAAAAAACCTTCAGTCAGGAAAGGGGACTCAAGGCCATAGTTATTCTGGTAGA		540
CUM	GGAGGAATAAAAAACCTTCAGTCAGGAAAGGGGACTCAAGGCCATAGTTATTCTGGTAGA		540
FIB	GGAGGAATAAAAAACCTTCAGTCAGGAAAGGGGACTCAAGGCCATAGTTATTCTGGTAGA		540

MACT	ATCCTTTTCCCCAGTGTTGTGCATGTAGTTACGGTACACAGAATAACGGAACGGGAGAAGT		600
MDBK	ATCCTTTTCCCCAGTGTTGTGCATGTAGTTACGGTACACAGAATAACGGAACGGGAGAAGT		600
CUM	ATCCTTTTCCCCAGTGTTGTGCATGTAGTTACGGTACACAGAATAACGGAACGGGAGAAGT		600
FIB	ATCCTTTTCCCCAGTGTTGTGCATGTAGTTACGGTACACAGAATAACGGAACGGGAGAAGT		600

MACT	AAGAACACAGAAGAAGTTAACACAGGCACCAGAGTCTTGAGGGAAGTTCTATATGAAAAA		660
MDBK	AAGAACACAGAAGAAGTTAACACAGGCACCAGAGTCTTGAGGGAAGTTCTATATGAAAAA		660
CUM	AAGAACACAGAAGAAGTTAACACAGGCACCAGAGTCTTGAGGGAAGTTCTATATGAAAAA		660
FIB	AAGAACACAGAAGAAGTTAACACAGGCACCAGAGTCTTGAGGGAAGTTCTATATGAAAAA		660

MACT	AATTCTGGAATGAATCAGAATACTAAGGCTCCATTTTCCCTATTGGGGACTCTGACTTG		720
MDBK	AATTCTGGAATGAATCAGAATACTAAGGCTCCATTTTCCCTATTGGGGACTCTGACTTG		720
CUM	AATTCTGGAATGAATCAGAATACTAAGGCTCCATTTTCCCTATTGGGGACTCTGACTTG		720
FIB	AATTCTGGAATGAATCAGAATACTAAGGCTCCATTTTCCCTATTGGGGACTCTGACTTG		720

MACT	GAGAC	CAGGAAGCCAACGTGTGACTTTTGCCCCAGTAAACGTGACAAAGGACCATATAC	780
MDBK	GAGACCCAGGAAGCCAACGTGTGACTTTTGCCCCAGTAAACGTGACAAAGGACCATATAC		780
CUM	GAGACCCAGGAAGCCAACGTGTGACTTTTGCCCCAGTAAACGTGACAAAGGACCATATAC		780
FIB	GAGACCCAGGAAGCCAACGTGTGACTTTTGCCCCAGTAAACGTGACAAAGGACCATATAC		780

MACT	CTGATTACCCAATAAATTATTTTCTCTAGTTGGGTTTAATTTTAGAAATTACACATTATC		840
MDBK	CTGATTACCCAATAAATTATTTTCTCTAGTTGGGTTTAATTTTAGAAATTACACATTATC		840
CUM	CTGATTACCCAATAAATTATTTTCTCTAGTTGGGTTTAATTTTAGAAATTACACATTATC		840
FIB	CTGATTACCCAATAAATTATTTTCTCTAGTTGGGTTTAATTTTAGAAATTACACATTATC		840

MACT	ATCTGATATTAGCCATAAGACTACCTATAGGGTCAGCTCAGTCTAAACTCACCATTGGA		900
MDBK	ATCTGATATTAGCCATAAGACTACCTATAGGGTCAGCTCAGTCTAAACTCACCATTGGA		900
CUM	ATCTGATATTAGCCATAAGACTACCTATAGGGTCAGCTCAGTCTAAACTCACCATTGGA		900
FIB	ATCTGATATTAGCCATAAGACTACCTATAGGGTCAGCTCAGTCTAAACTCACCATTGGA		900

MACT	GTCATTAGGCTCAAGAAAGAGGGCCATGGCTTCCTCCTCCAGTCAGAGTTCAGGTCCAT		960
MDBK	GTCATTAGGCTCAAGAAAGAGGGCCATGGCTTCCTCCTCCAGTCAGAGTTCAGGTCCAT		960
CUM	GTCATTAGGCTCAAGAAAGAGGGCCATGGCTTCCTCCTCCAGTCAGAGTTCAGGTCCAT		960
FIB	GTCATTAGGCTCAAGAAAGAGGGCCATGGCTTCCTCCTCCAGTCAGAGTTCAGGTCCAT		960

MACT	GAGTCCTACAGAAAAA	CAAGGTAATTTCCCTCAAGAACCTACTGAAGAGGC	1014
MDBK	GAGTCCTACAGAAAAA	CAAGGTAATTTCCCTCAAGAACCTACTGAAGAGGC	1014
CUM	GAGTCCTACAGAAAAA	CAAGGTAATTTCCCTCAAGAACCTACTGAAGAGGC	1014
FIB	GAGTCCTACAGAAAAA	CAAGGTAATTTCCCTCAAGAACCTACTGAAGAGGC	1014

Figura 16. Alinhamento do sequenciamento da região do H11. MACT são as células MAC-T, MDBK as células MDBK, CUM são células de cumulus e FIB para células de fibroblastos.

Fonte: Resultado gerado pelo Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

A verificação da presença de SNPs nas regiões de homologia dos guias, nos tipos celulares utilizados neste estudo, é de fundamental importância para garantir a eficácia da edição genética. A presença de SNPs pode comprometer o pareamento entre o guia e a sequência alvo, o que resulta em uma diminuição da eficiência do guia. Isso ocorre porque, em casos de pareamento não absoluto, a Cas9 pode não ser devidamente direcionada para o local correto no genoma, impedindo a clivagem da sequência alvo. Portanto, a identificação e o monitoramento rigoroso dos SNPs nas regiões de homologia são essenciais para evitar a redução da eficiência do sistema CRISPR/Cas9 e assegurar o sucesso da edição genética no modelo celular em questão.

5.3 PCR de regiões do *locus* H11

A região do *locus* H11, na qual cada guia apresenta homologia, foi amplificada por PCR para possibilitar a digestão com a enzima T7E1. Esse procedimento teve como objetivo preparar o material genético para a análise da eficiência da edição, através da detecção de possíveis variações ou modificações na sequência alvo.

Para os gRNAs Bi1, Bi1b, Bi2, Bi3 e Bi4, os primers utilizados foram Bi H11 FWD e Bi H11 REV3, os quais amplificaram o fragmento denominado FR3 (614 pb), conforme ilustrado na figura 17. Para os gRNAs Bi5 e Bi6, os primers empregados foram Bi H11 FWD5 e Bi H11 REV5, gerando o fragmento denominado F5R5 (513 pb), apresentado na figura 18. Por fim, para os gRNAs Bi7 e BMC, os primers Bi H11 FWD10 e Bi H11 REV10 foram utilizados, amplificando o fragmento denominado F10R10 (567 pb), conforme mostrado na figura 19.

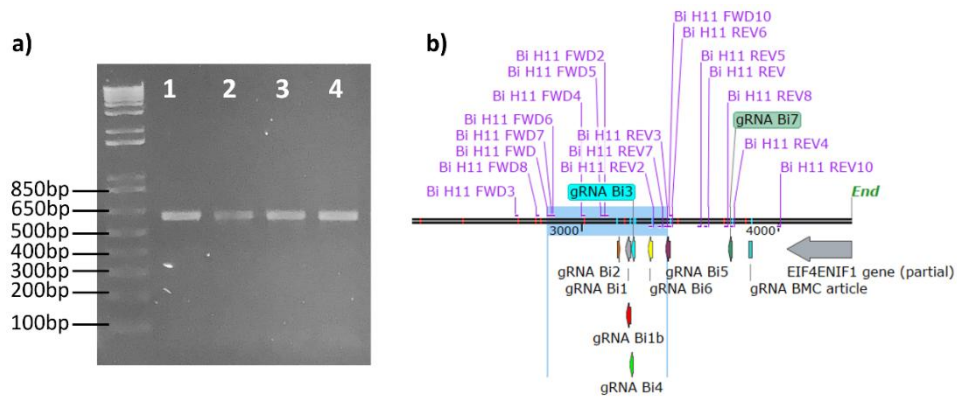


Figura 17. *Amplicon* FR3 (614 pb). **a)** Eletroforese em gel de agarose mostrando a PCR da região do H11 amplificado a partir do gDNA de fibroblastos bovinos. **b)** Em azul a localização esquemática do *amplicon*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

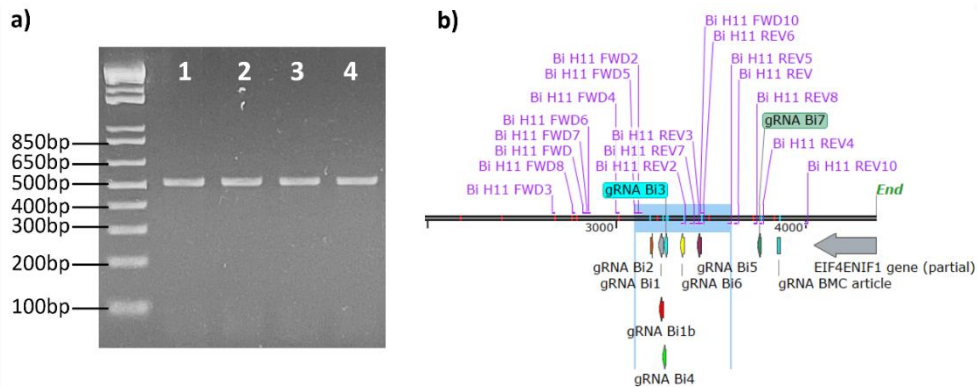


Figura 18. *Amplicon* F5R5 (513 pb). **a)** Eletroforese em gel de agarose mostrando a PCR da região do H11 amplificado a partir do gDNA de células MAC-T. **b)** Em azul a localização esquemática do *amplicon*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

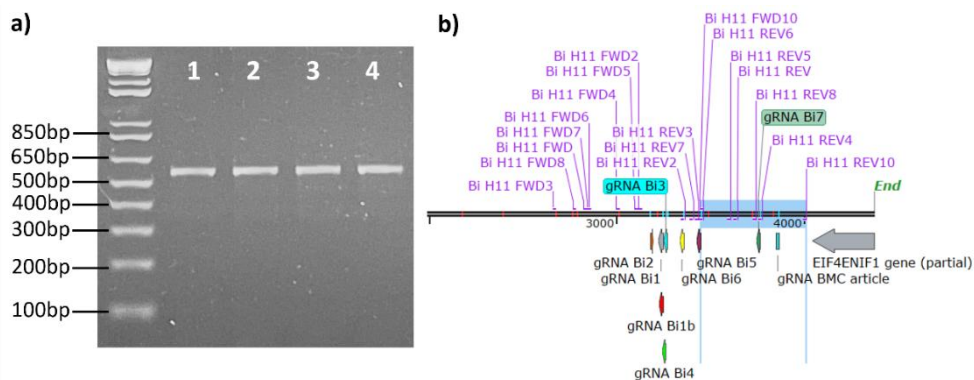


Figura 19. *Amplicon* F10R10 (567 pb). **a)** Eletroforese em gel de agarose mostrando a PCR da região do H11 amplificado a partir do gDNA de células MAC-T. **b)** Em azul a localização esquemática do *amplicon*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Otimização do ensaio T7E1

Para otimizar os ensaios de T7E1, inicialmente foi testado o uso de 5U e 10U da enzima, sendo 10U o recomendado pelo fabricante, com 200 ng do *amplicon* e tempo de incubação de 30 minutos. O fragmento de PCR utilizado foi o FR3 (614 pb, amplificado de células de cumulus). Como mostrado na figura 20a, não houve diferença consistente entre 5U e 10U. Em seguida, esses parâmetros foram ajustados, utilizando 5U com 300 ng do *amplicon*, com o objetivo de melhorar a visualização na eletroforese. Como pode ser observado na figura 20b, o uso de 5U e 300 ng resultou em uma banda mais forte e com melhor poder analítico, embora o uso de 5U ou 10U com 200 ng também tenha mostrado resultados viáveis. Uma vez que 5U foi suficiente, foi testado se seria possível reduzir ainda mais a concentração da enzima, utilizando 2U. A figura 20c mostra que a digestão também foi bem sucedida com 2U, embora o uso de 5U tenha apresentado resultados melhores. Com base nisso, optou-se pela utilização de 5U da enzima T7E1.

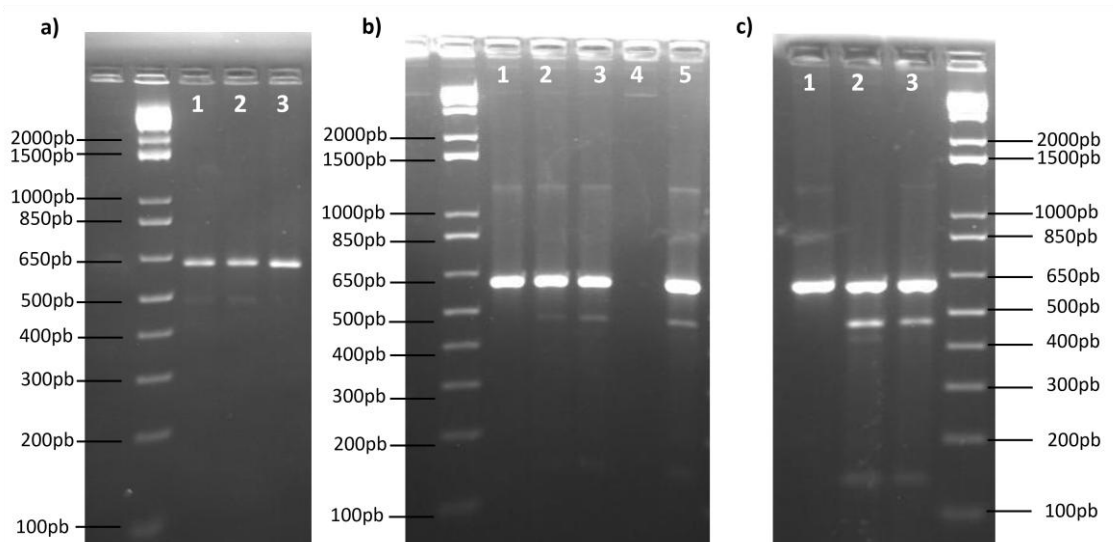


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose contendo as digestões com a enzima T7E1 em diferentes concentrações. **a)** teste comparando o uso de 5U e 10U de T7E1 para 200ng do *amplicon*, sendo o poço 1 - 10U de T7E1, o poço 2 - 5U de T7E1 e o poço 3 - controle não digerido. **b)** teste comparando 5U e 10U de T7E1 com 200ng do *amplicon* e 300ng do *amplicon* digerido com 5U de T7E1. Poço 1 – controle não digerido, poço 2 – 200ng DNA com 5U de T7E1, poço 3 – 200ng DNA com 10U de T7E1 e poço 5 – 300ng DNA com 5U de T7E1. **c)** teste comparando uso de 5U e 2U de T7E1 para 300ng do *amplicon*, sendo o poço 1 - controle não digerido, o poço 2 - 5U de T7E1 e o poço 3 - 2U de T7E1.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi comparado o tempo de incubação de 30 minutos, que estava sendo utilizado, com o tempo sugerido pelo fabricante, de 15 minutos, e o tempo de 60 minutos. A figura 21a mostra o resultado da incubação por 30 minutos, enquanto a figura 21b exibe a incubação por 15 minutos. As figuras 21c e 21d mostram os resultados para os tempos de 30 minutos e 60 minutos, respectivamente.

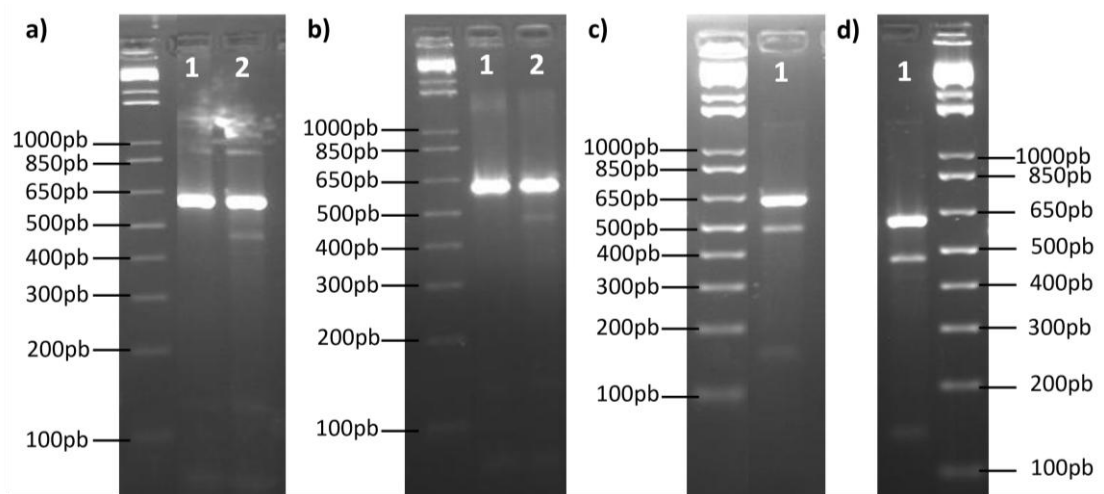


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose contendo as digestões com 5U da enzima T7E1 e diferentes tempos de incubação. **a)** teste utilizando 30 minutos de incubação. Poço 1 - controle não digerido e poço 2 – fragmento digerido. **b)** teste utilizando 15 minutos de incubação. Poço 1 - controle não digerido e poço 2 – fragmento digerido. **c)** teste utilizando 30 minutos de incubação. **d)** teste utilizando 60 minutos de incubação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a análise das digestões, foi determinado que o tempo de incubação seria de 30 minutos. O tempo de 15 minutos resultou em uma banda mais fraca, enquanto entre os tempos de 30 e 60 minutos não foi observada diferença. Com base nesses resultados, nos ensaios subsequentes, adotou-se a utilização de 300 ng do produto de PCR, 5U da enzima T7E1 e um tempo de incubação de 30 minutos.

O protocolo foi otimizado para atender às especificidades dos ensaios conduzidos, em vez de ser seguido estritamente conforme as recomendações do fabricante. O objetivo foi melhorar a utilização dos recursos, utilizando 5U de enzima, em vez dos 10U recomendados, o que resultou em uma redução na quantidade de reagentes sem comprometer a eficácia. Além disso, adotamos o tempo de incubação de 30 minutos, ao invés dos 15 minutos sugeridos,

alcançando um equilíbrio entre a eficiência do processo e o uso racional dos recursos disponíveis.

5.5 Transfecção com células do cumulus, fibroblasto e MDBK

A figura 22 apresenta células do cumulus bovinas transfectadas com o vetor pEF-GFP, observadas sob luz ultravioleta (UV). A transfecção foi realizada utilizando Lipofectamine LTX, de acordo com o protocolo estabelecido previamente no laboratório. A fluorescência característica da GFP (*Green Fluorescent Protein*) foi visível, permitindo a identificação das células transfectadas.

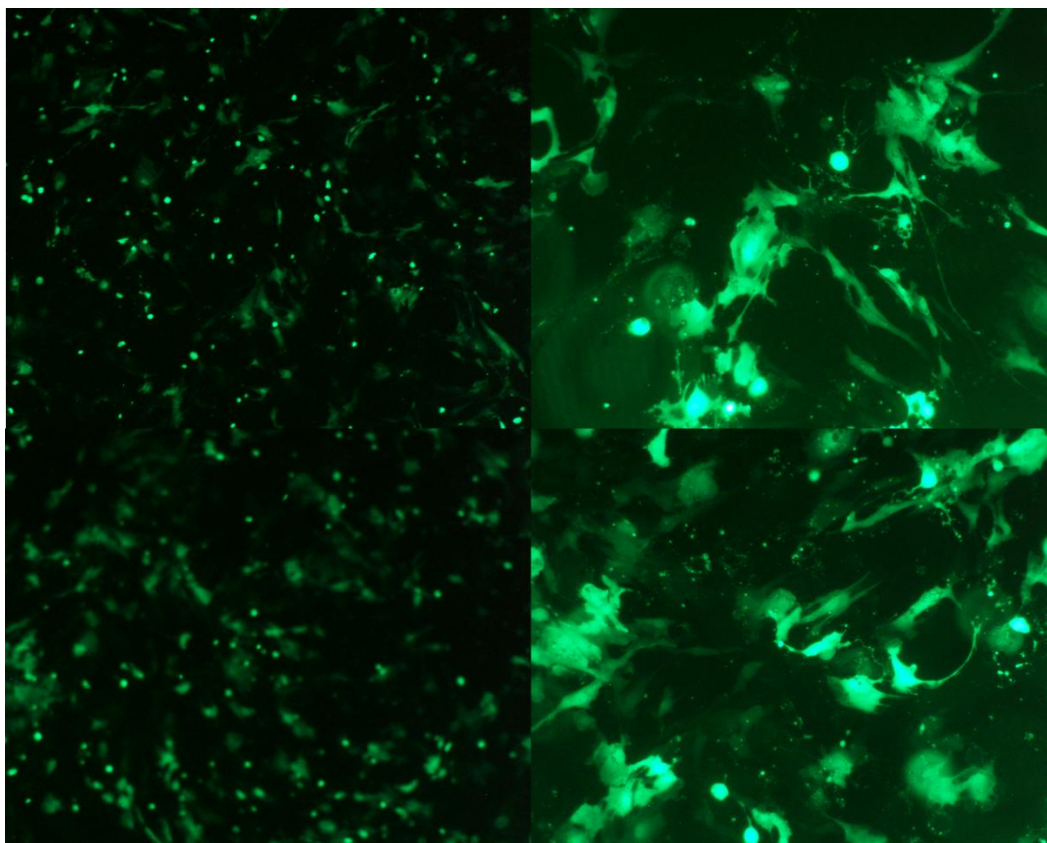


Figura 22. Células de cumulus transfectadas com pEF-GFP sobre luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x (primeira e terceira imagens) e de 10x (segunda e quarta imagens).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram testados diferentes reagentes de transfecção para fibroblastos e células MDBK, utilizando 500 ng de pEF-GFP. Na figura 23, são apresentados

os testes realizados com fibroblastos, utilizando os reagentes Lipofectamine LTX e Xfect. Os resultados demonstraram que a Lipofectamine LTX apresentou uma menor taxa de mortalidade celular e melhor eficiência de transfecção.

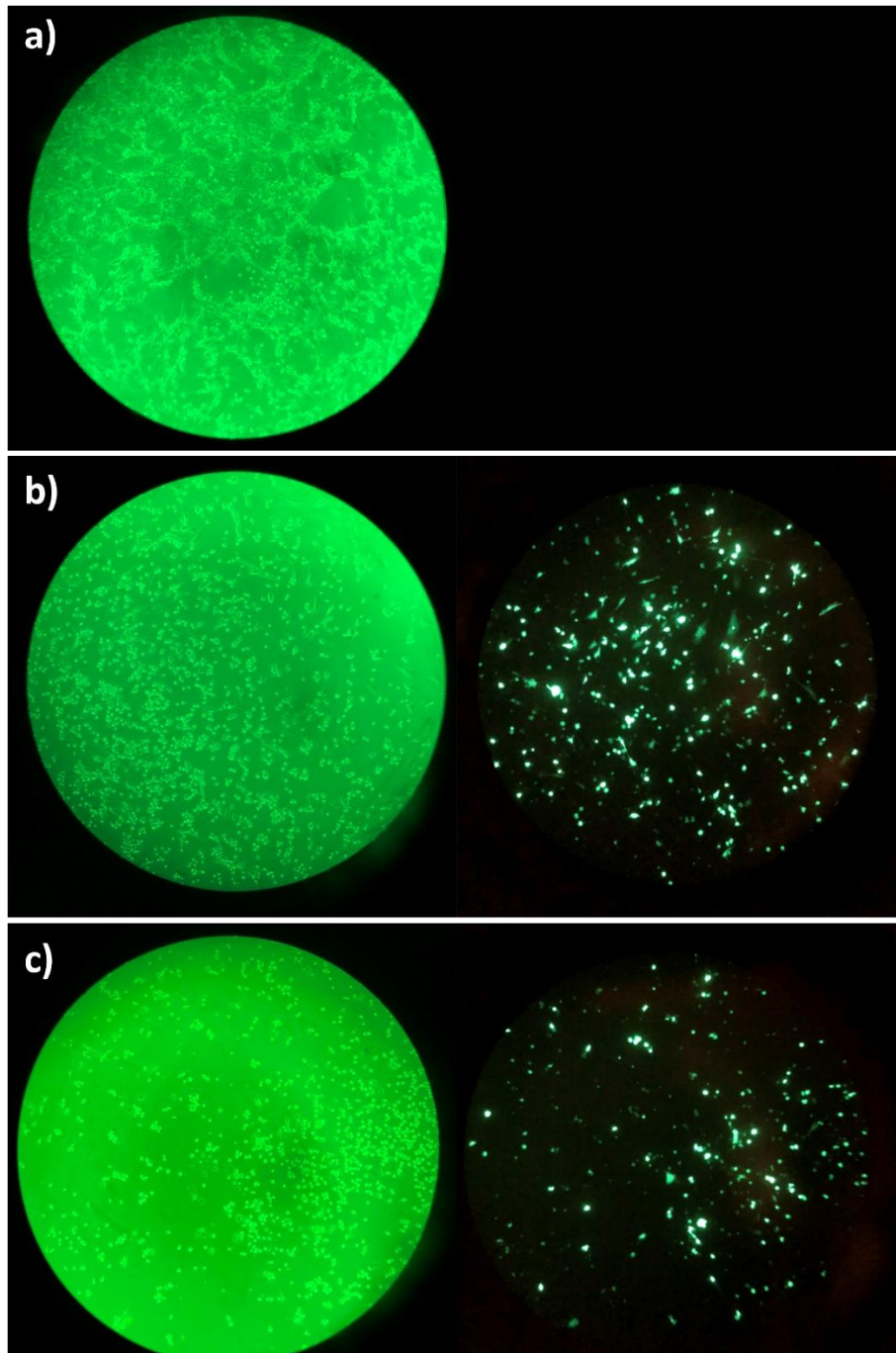


Figura 23. Fibroblastos bovinos transfectados com o vetor pEF-GFP, observados sob luz visível e luz UV. **a)** Controle negativo não transfectados, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. **b)** Transfecção realizada utilizando Lipofectamine LTX, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. **c)** Transfecção realizada utilizando Xfect, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 24, são apresentados os testes realizados com células MDBK, utilizando os reagentes Lipofectamine 2000 e os polímeros Xfect. Observou-se que os polímeros, além de apresentarem uma menor toxicidade em comparação a Lipofectamine 2000, demonstraram uma maior eficiência de transfecção. Contudo, apesar desses resultados promissores com o uso dos polímeros, as células MDBK, de modo geral, apresentaram uma eficiência de transfecção relativamente baixa, independentemente do reagente utilizado. Além disso, foi constatada uma alta taxa de mortalidade celular para ambos os reagentes de transfecção, o que pode ser atribuído à natureza das células MDBK e sua suscetibilidade aos agentes de transfecção empregados.

Todos os ensaios de transfecção incluíram um controle negativo, composto por células não transfectadas, a fim de descartar sinais de autofluorescência ou interferências no ensaio. Como esperado, nenhuma fluorescência foi detectada nessas amostras, confirmando que a sinalização observada nas células transfectadas era exclusivamente decorrente da expressão transiente do eGFP. Os ensaios foram realizados em triplicatas técnicas, conduzidas em dias independentes.

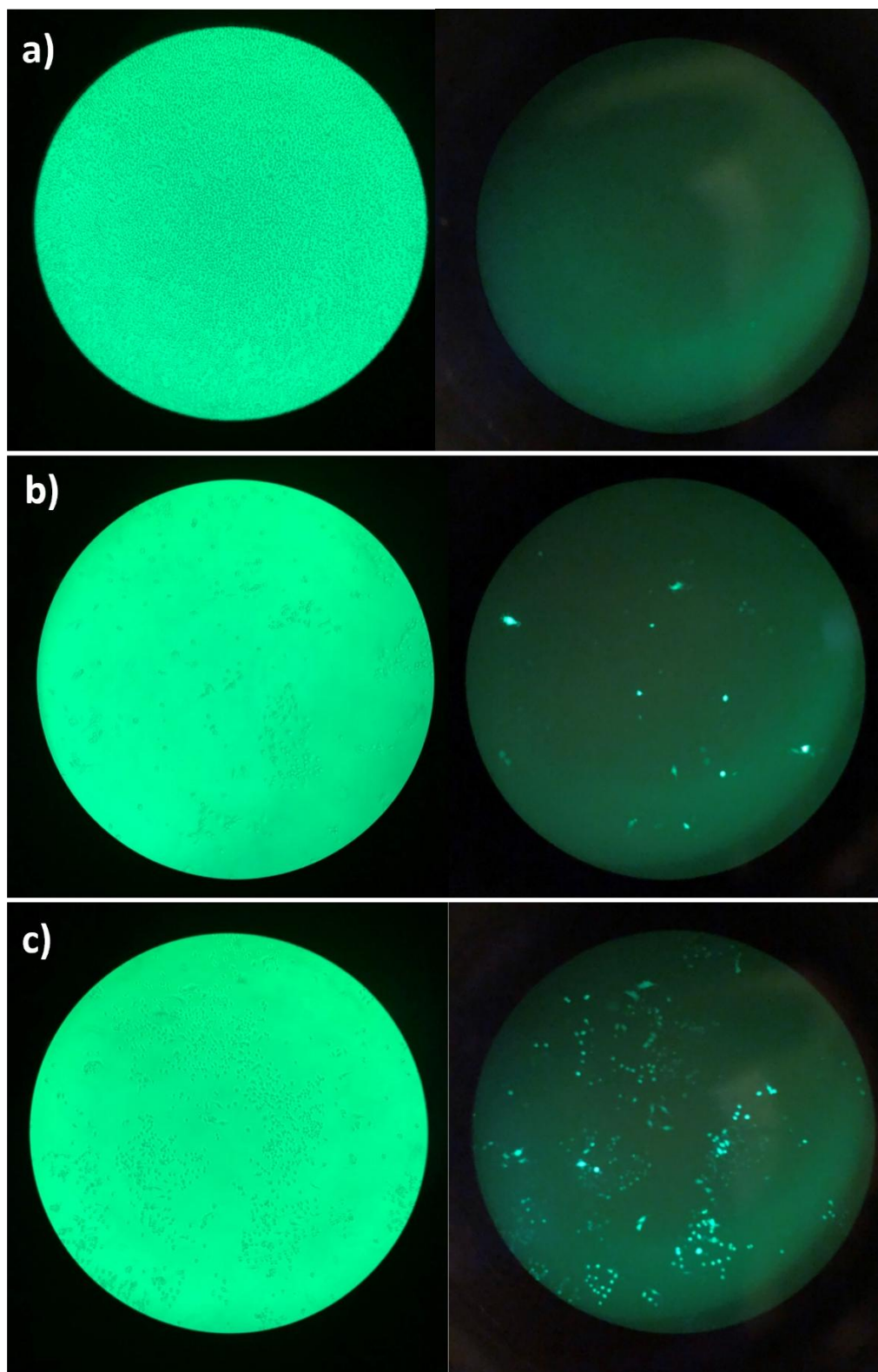


Figura 24. Células MDBK transfectadas com o vetor pEF-GFP, observados sob luz visível e luz UV. **a)** Controle negativo não transfectados, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. **b)** Transfecção realizada utilizando Lipofectamine 2000, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. **c)** Transfecção realizada utilizando Xfect, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 Ensaio de T7E1 com células do cumulus, fibroblastos e MDBK

Foram testados os guias Bi1, Bi1b, Bi2, Bi3 e Bi4 nas células de cumulus, fibroblastos e MDBK. A partir do gDNA extraído do *pool* de células transfectadas, foi realizada PCR para amplificar a região flanqueadora dos guias. O fragmento FR3, descrito anteriormente e ilustrado na figura 17, foi amplificado. As bandas esperadas após a digestão com T7E1 variaram de acordo com o guia utilizado: Bi1 e Bi1b (192 pb e 422 pb), Bi2 (255 pb e 359 pb), Bi3 (170 pb e 444 pb) e Bi4 (178 pb e 436 pb).

Nas células de cumulus, conforme apresentado na figura 25, todos os *amplicons* apresentaram bandas de digestão com a enzima T7E1, o que pode indicar a presença de polimorfismos nessa região do DNA desse tipo celular. Esse fator dificultou a interpretação dos resultados do ensaio de T7E1. No entanto, esse efeito inespecífico da enzima T7E1 nos *amplicons* também permitiu a utilização desses fragmentos como controle positivo nos ensaios subsequentes de T7E1.

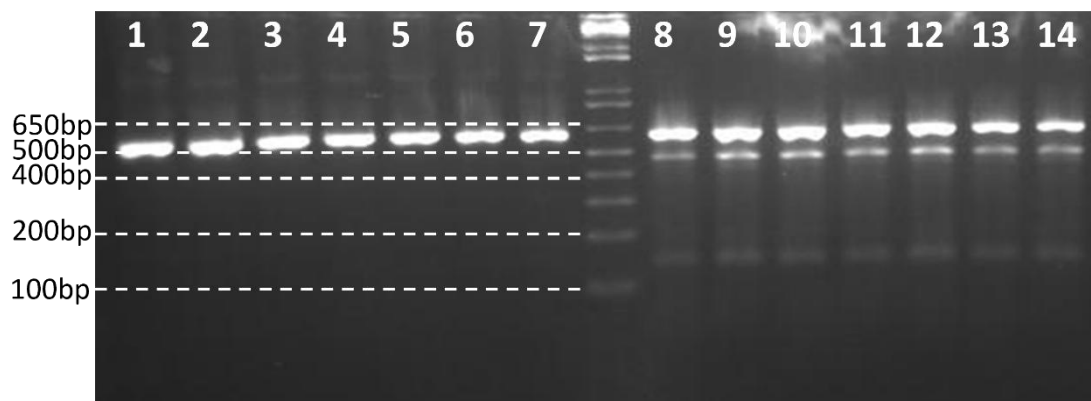


Figura 25. Eletroforese em gel de agarose mostrando a digestão com a enzima T7E1 do *amplicon* FR3, proveniente de células de cumulus. À esquerda do marcador, estão os fragmentos de PCR não digeridos pela enzima T7E1 (controle), enquanto à direita estão os fragmentos digeridos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas células MDBK, conforme mostrado na figura 26, não foi possível identificar a presença de INDELS (inserções ou deleções) nos *amplicons* após a digestão com a enzima T7E1 para os guias testados. Isso sugere que, apesar da aplicação da técnica, os guias utilizados não resultaram em modificações genéticas eficazes no DNA dessas células. Adicionalmente, os guias Bi1 e Bi3

foram também testados, mas não apresentaram resultados positivos, ou seja, não induziram modificações genéticas detectáveis. Uma possível explicação para a ausência de resultados positivos pode ser a baixa eficiência de transfecção observada nas células MDBK, o que pode ter dificultado a introdução dos guias e a consecução da edição gênica desejada.

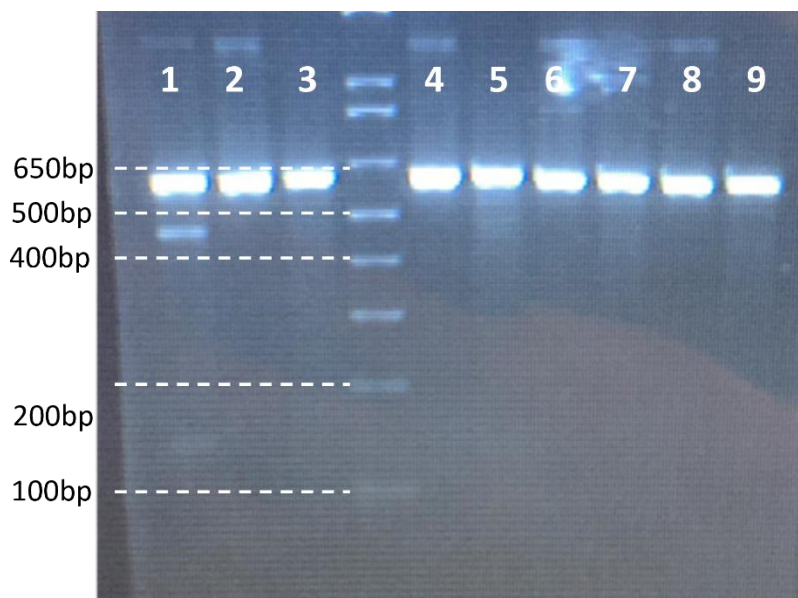


Figura 26. Eletroforese em gel de agarose mostrando a digestão com a enzima T7E1 do *amplicon* FR3, proveniente de células MDBK. O primeiro poço contém o controle positivo, com o fragmento FR3 das células de cumulus. O segundo e terceiro poços correspondem ao controle negativo, com gDNA de células não transfectadas, sendo o segundo poço não digerido e o terceiro digerido com T7E1. O quarto e quinto poços apresentam células transfectadas com o guia Bi1b, com o quarto poço não digerido e o quinto digerido. O sexto e sétimo poços mostram células transfectadas com o guia Bi2, sendo o sexto poço não digerido e o sétimo digerido. Finalmente, o oitavo e nono poços contêm células transfectadas com o guia Bi4, com o oitavo poço não digerido e o nono digerido.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nos fibroblastos (figura 27), durante o ensaio de digestão com a enzima T7E1, observou-se que no controle (células não transfectadas), o gDNA apresentou uma banda distinta após a digestão, o que não era esperado. Isso ocorre porque, teoricamente, a região amplificada não deveria conter *missmatches*, o que é necessário para a ação da T7E1. Esse resultado foi inesperado, uma vez que, em casos em que houvesse a presença de SNPs, como observado nas células do cumulus, ambas as digestões (transfectado e não transfectado) apresentariam bandas. No entanto, nas células transfectadas, não foi observada a formação da banda após a digestão com T7E1, o que indica

que o guia utilizado não foi eficiente na indução de INDELS. Esse resultado impossibilitou a confirmação da eficiência dos guias testados, uma vez que a ausência de clivagem do DNA nas células transfectadas comprometeu a avaliação da eficácia do processo de edição genética. Dessa forma, os ensaios de T7E1 realizados em todos os três tipos celulares não geraram resultados conclusivos.

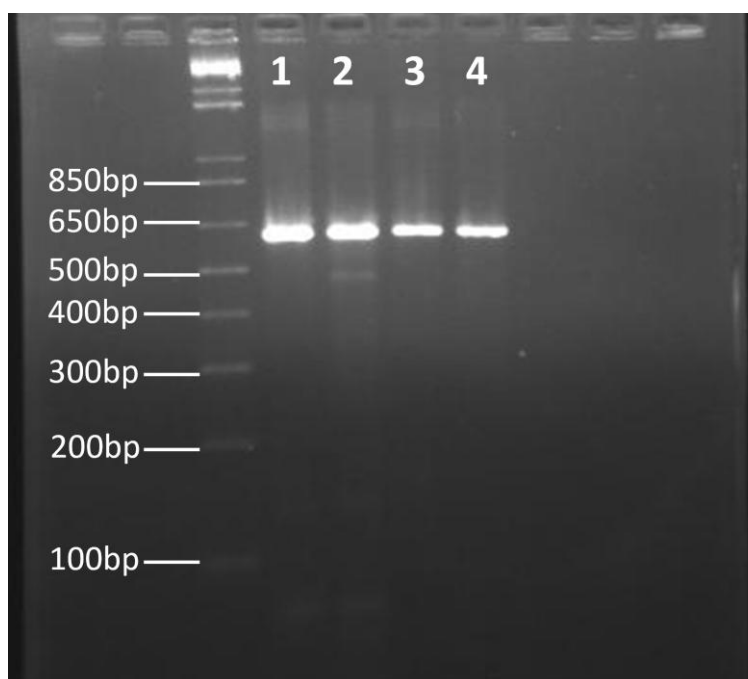


Figura 27. Eletroforese em gel de agarose mostrando a digestão com a enzima T7E1 do *amplicon* FR3, proveniente de fibroblastos bovinos. O poço 1 contém o controle negativo, que é o gDNA não transfectado, não digerido com T7E1, enquanto o poço 2 apresenta o mesmo gDNA não transfectado, mas digerido com T7E1. Os poços 3 e 4 correspondem a gDNA transfectado com o gRNA Bi1b, com o poço 3 contendo o *amplicon* não digerido e o poço 4 apresentando o *amplicon* digerido com T7E1.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados observados podem ser atribuídos a diversos fatores que interferem diretamente na eficiência do processo de edição genética. Primeiramente, a ineficiência dos guias utilizados, uma vez que os guias podem não estar sendo eficazes na indução de INDELS na região alvo. Essa ineficiência pode ocorrer devido a características do próprio guia, como o pareamento inadequado com a sequência alvo. Além disso, a eficiência da transfecção pode ser outro fator relevante. Caso a transfecção não seja suficientemente eficiente, o número de células transfectadas e, conseqüentemente, o número de células

editadas será muito baixo, o que dificulta a observação dos INDELS no ensaio de T7E1. A baixa eficiência de transfecção pode ser atribuída a características específicas das células, como sua capacidade de absorver o reagente de transfecção ou até a toxicidade do reagente utilizado, sendo esses fatores muitos variáveis e específicos para cada tipo celular. Portanto, a combinação de uma ineficaz indução de INDELS pelos guias e a baixa eficiência na transfecção pode resultar em um número insuficiente de células editadas, tornando os resultados do ensaio de T7E1 difíceis de interpretar. Além disso, fatores como a heterogeneidade nas células transfectadas, variabilidade na expressão dos guias e a presença de polimorfismos genéticos nas células podem ter contribuído para a ausência de resultados conclusivos.

5.7 Transfecção com células MAC-T

Com base nos resultados obtidos anteriormente, optou-se por substituir o tipo celular utilizado nos ensaios, escolhendo um modelo com maior eficiência de transfecção, na expectativa de que isso possibilitasse a detecção de INDELS no ensaio de T7E1. De acordo com Osorio & Bionaz (2017), as células MAC-T apresentam uma eficiência de transfecção consideravelmente superior à das células MDBK, o que justifica a escolha dessa linhagem celular para os ensaios subsequentes.

A figura 28 ilustra os testes iniciais realizados com as células MAC-T, com o objetivo de estabelecer o reagente de transfecção mais adequado para este tipo celular, uma vez que o laboratório não possuía um protocolo previamente otimizado para esse modelo celular. Esses testes visaram determinar a condição mais eficiente para a transfecção das células MAC-T, a fim de garantir melhores resultados no processo de edição genética. O reagente que apresentou melhor desempenho foi o Xfect, embora a mortalidade celular ainda tenha sido alta, como pode ser observado na figura 28.

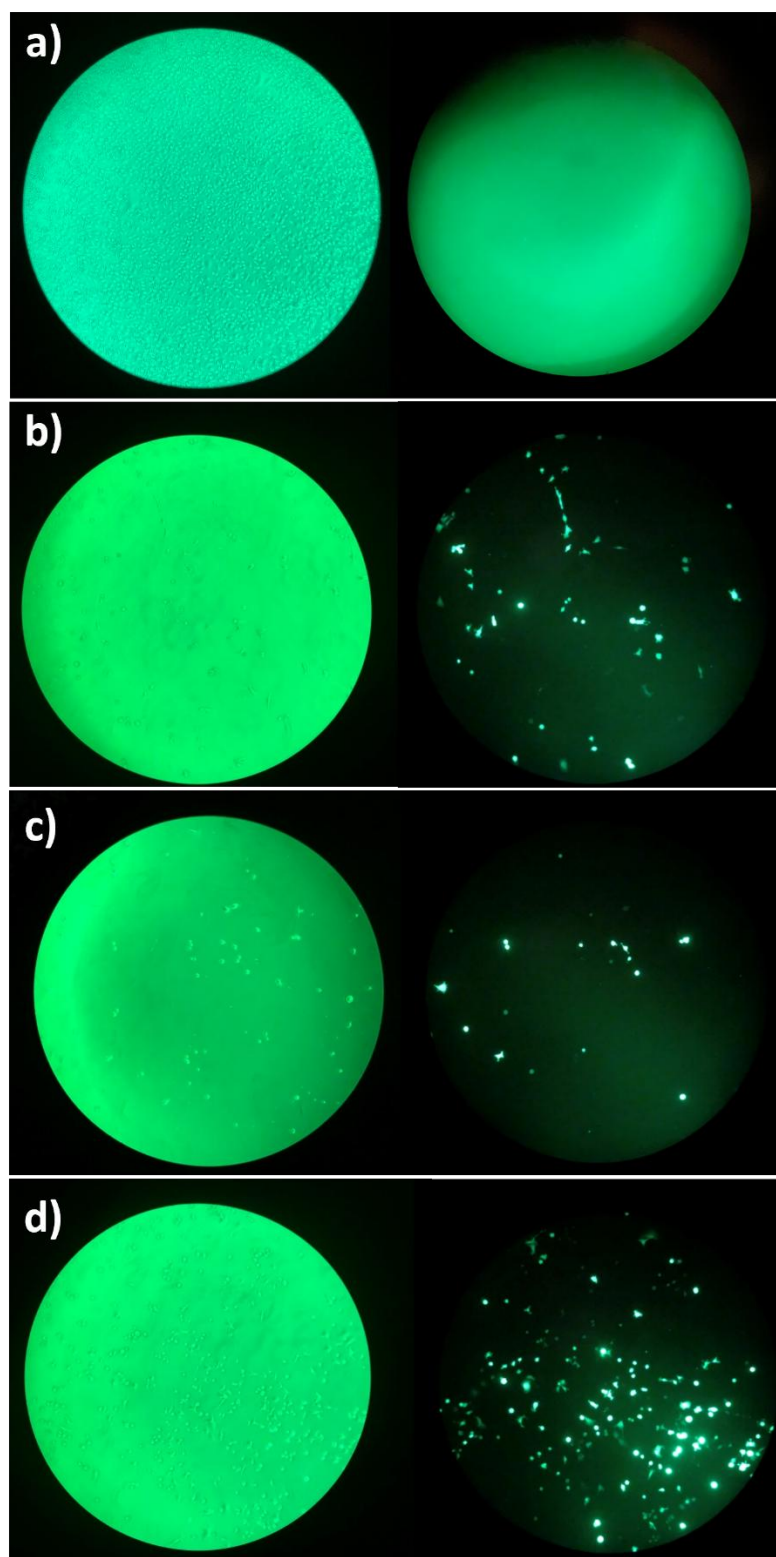


Figura 28. Células MAC-T transfectadas com o vetor pEF-GFP, observados sob luz visível e luz UV. **a)** Controle negativo não transfectados, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. **b)** Transfecção utilizando Lipofectamine 2000, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. **c)** Transfecção utilizando Lipofectamine LTX, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. **d)** Transfecção utilizando Xfect, com a primeira imagem sob luz visível e a segunda sob luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com o intuito de reduzir a mortalidade durante o processo de transfecção, foi realizado um novo teste utilizando um meio contendo SFB nas concentrações de 10% e 20%, além da remoção dos antibióticos do meio de cultura. O objetivo dessa modificação foi avaliar se as condições de cultivo poderiam melhorar a viabilidade celular sem comprometer a eficiência da transfecção. Os resultados deste experimento, na figura 29, possibilitam uma análise detalhada sobre o impacto do SFB na redução da mortalidade celular durante o processo de transfecção. A adição de SFB ao meio de transfecção demonstrou uma influência positiva tanto na eficiência da transfecção quanto na viabilidade celular, como evidenciado pela expressão do gene eGFP observada sob luz UV.

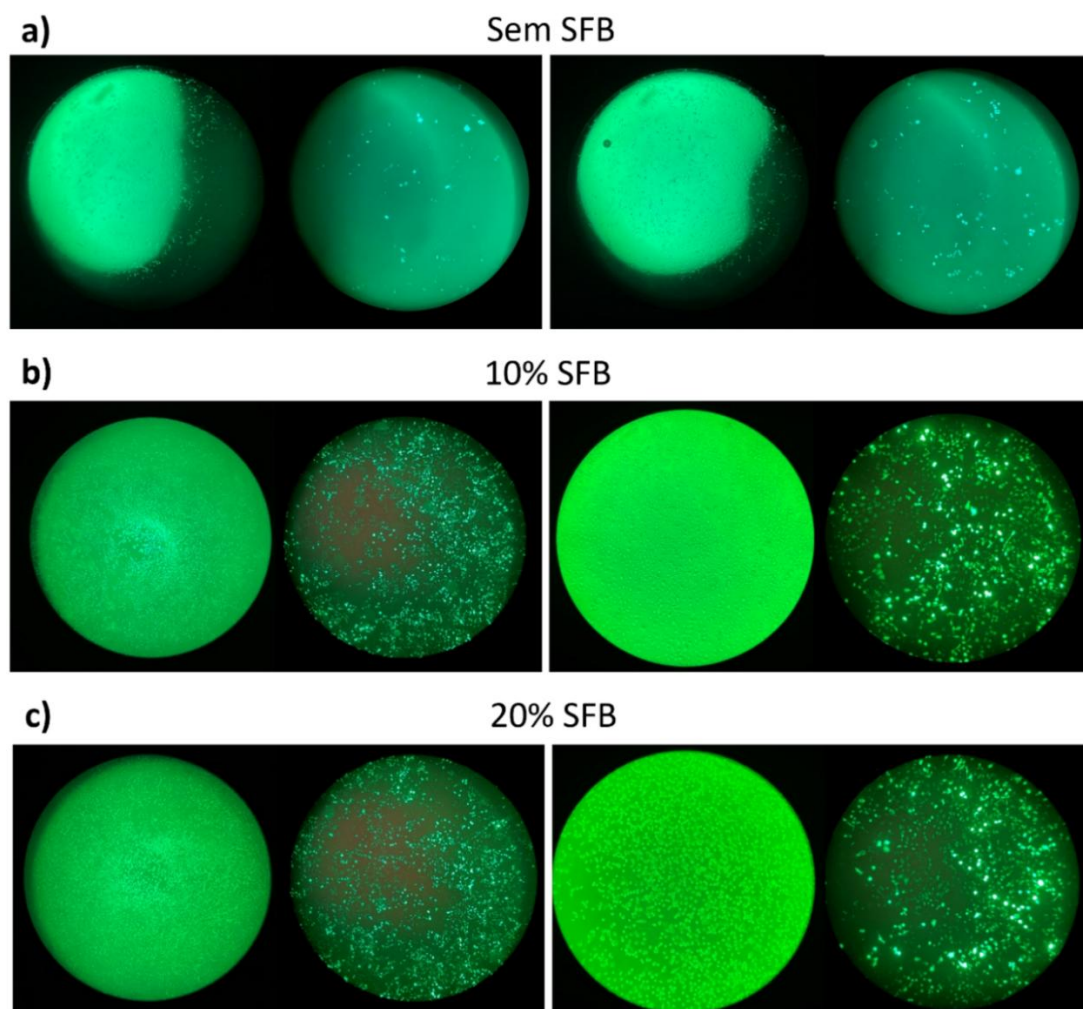


Figura 29. Células MAC-T transfectadas com o vetor pEF-GFP e o reagente Xfect, observadas sob luz visível e luz UV. **a)** Transfecção realizada sem a adição de SFB no meio de transfecção. **b)** Transfecção realizada utilizando 10% de SFB no meio de transfecção. **c)** Transfecção realizada com 20% de SFB no meio de transfecção. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Além disso, foi notada uma redução na mortalidade celular, particularmente quando o SFB foi incluído no meio de transfecção. Esses resultados sugerem que o SFB contribui para a melhoria das condições de viabilidade celular durante a transfecção, sem prejudicar a eficiência da expressão gênica, tornando-o um componente valioso para otimizar o processo de transfecção em células MAC-T. As concentrações de 10% e 20% de SFB apresentaram resultados de transfecção comparáveis, tanto em termos de expressão do gene transfectado quanto na viabilidade celular. Em vista disso, foi utilizado o meio de transfecção composto por DMEM-MACT com 20% de SFB e ausência de antibióticos nos ensaios subsequentes.

5.8 Avaliação em células MAC-T dos RNAs guias através do ensaio de T7E1

Inicialmente, as células MAC-T foram transfectadas com as construções contendo os gRNAs Bi1b, Bi2, Bi3 e Bi4. Em seguida, foi realizada a amplificação da região alvo FR3, conforme procedimento adotado para os tipos celulares anteriores, seguido de ensaios de digestão com a enzima T7E1. Na figura 30, observa-se que, ao utilizar os guias Bi1b e Bi2, não foi possível detectar as bandas esperadas após a digestão com T7E1.

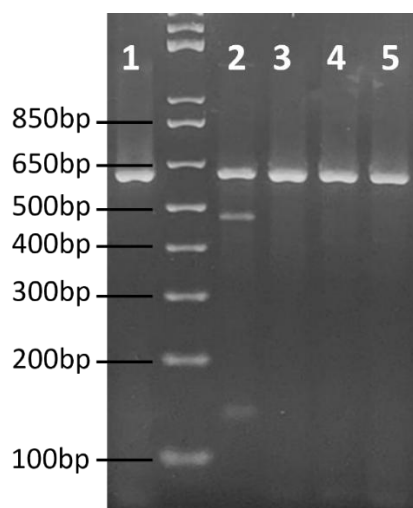


Figura 30. Análise de digestão com a enzima T7E1 em células MAC-T. No poço 1, encontra-se o fragmento de PCR não digerido com a enzima T7E1 (controle negativo). No poço 2 está o fragmento proveniente de células de cumulus, que foi utilizado como controle positivo para a digestão. No 3 a digestão com células não transfectadas. Em seguida, são apresentadas as digestões realizadas com células transfectadas com os guias Bi1b e Bi2 (poços 4 e 5).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Esse resultado sugeriu a hipótese de que a ineficiência observada poderia estar relacionada aos próprios guias, levando à necessidade de uma revisão na escolha dos mesmos. Com base nessa hipótese, os novos guias Bi5, Bi6, Bi7 e o BMC foram sintetizados e testados nas células MAC-T.

Como descrito anteriormente, os *amplicons* para os guias Bi5 e Bi6 correspondem ao fragmento F5R5 (513 pb), enquanto os *amplicons* para os guias Bi7 e BMC é o fragmento F10R10 (567 pb). Após a purificação dos produtos de PCR, realizamos a digestão com a enzima T7E1, visando a detecção de possíveis INDELS na região alvo de cada guia. Para cada guia testado, as bandas esperadas após a digestão com T7E1 foram as seguintes: Bi5 (354 pb e 159 pb), Bi6 (263 pb e 250 pb), BMC (421 pb e 146 pb) e Bi7 (321 pb e 246 pb).

As bandas esperadas foram determinadas com base nos tamanhos dos fragmentos que seriam gerados pela clivagem do DNA, caso os guias fossem eficazes na introdução de INDELS na região alvo. A análise dos resultados obtidos por eletroforese em gel de agarose, apresentada na figura 31, revelou que o guia Bi5 apresentou eficiência na geração de INDELS, uma vez que as bandas correspondentes aos fragmentos esperados foram visíveis. Em contraste, os guias Bi6 e Bi7 não geraram os fragmentos esperados, sugerindo que esses guias não tiveram sucesso na indução de modificações no DNA alvo. Para garantir a precisão e a eficácia do procedimento de digestão com T7E1, utilizamos o fragmento FR3 proveniente das células de cumulus como controle positivo, dado que esse fragmento já era conhecido devido aos ensaios anteriores por ser suscetível à digestão pela enzima T7E1. Esse controle permitiu a validação do processo de digestão e ofereceu uma comparação importante para avaliar a eficiência dos guias nas células transfectadas.

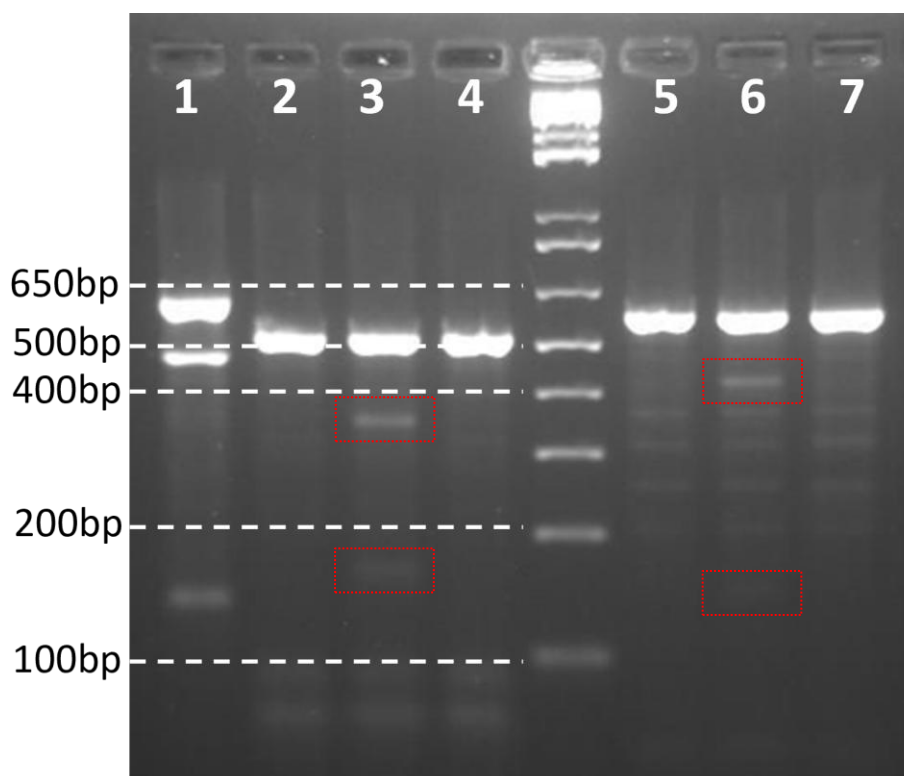


Figura 31. Digestão com a enzima T7E1 dos *amplicons* provenientes das transfecções em células MAC-T. Poço 1: controle positivo, utilizando o fragmento FR3 de células do cumulus. Poço 2: controle negativo, representando o *amplicon* F5R5 de células não transfectadas. Poço 3: *amplicon* F5R5 de células transfectadas com o guia Bi5. Poço 4: *amplicon* F5R5 de células transfectadas com o guia Bi6. Poço 5: controle negativo do *amplicon* F10R10 de células não transfectadas. Poço 6: *amplicon* F10R10 de células transfectadas com o guia BMC. Poço 7: *amplicon* F10R10 de células transfectadas com o guia Bi7. As bandas esperadas estão destacadas em vermelho.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os ensaios de T7E1 foram repetidos em dias independentes, e os resultados obtidos foram consistentes com os experimentos anteriores, confirmando a reprodutibilidade dos dados. Assim, os resultados obtidos com o guia Bi5 demonstram seu potencial como um candidato promissor para ensaios futuros de edição genética.

O *amplicon* F5R5, proveniente da transfecção com o guia Bi5, foi clonado no vetor de clonagem pGEM-Teasy. Após a clonagem, 25 clones foram selecionados e enviados para sequenciamento, permitindo a avaliação da eficiência do guia Bi5 em promover INDELS na região alvo. Na figura 32, são apresentados os resultados do sequenciamento dos clones, nos quais a análise revelou que 11 dos 25 clones apresentaram INDELS, resultando em uma taxa de edição de 44%. Este valor reflete a eficácia do gRNA Bi5 em induzir mutações

na região alvo, confirmando sua competência no processo de edição genética em células MAC-T. A taxa de 44% de INDELs é particularmente relevante, pois leva em consideração que, em experimentos de transfecção de células, a eficiência de transfecção não atinge 100%. Portanto, ao considerar o *pool* de células transfectadas, que inclui tanto células editadas quanto não editadas (caso o reparo do DNA seja perfeito), a célula apresentará genótipo selvagem além das células não transfectadas, uma taxa de 44% de células editadas é um resultado promissor. Isso sugere que o gRNA Bi5 pode ser uma ferramenta eficaz para estratégias de edição genética, com um bom potencial para ser explorado em estudos futuros.

Figura 32. Alinhamento do sequenciamento dos 25 clones. A região em verde na parte superior do alinhamento indica a sequência reconhecida pelo gRNA Bi5, enquanto a sequência em vermelho destaca o sítio PAM. A primeira linha corresponde à sequência selvagem, não editada, servindo como referência para comparação com os clones sequenciados. O software realiza o alinhamento do sequenciamento dos clones, mostrando a ocorrência de INDELS.

5.9 Transfecção de células MAC-T para inserção do eGFP no *locus* H11 e isolamento de clones editados

Os métodos de isolamento utilizando cilindros de vidro e discos de clonagem não produziram os resultados esperados. Ambas as abordagens foram testadas em diversas tentativas, mas não foi possível estabelecer o cultivo de linhagens clonais a partir das células editadas, o que indicou que essas metodologias não eram adequadas para o objetivo proposto. Essas dificuldades podem ter sido causadas por uma combinação de fatores, como a baixa eficiência na obtenção de células clonais viáveis ou a dificuldade em isolar as células editadas com sucesso. Diante desses resultados, o método de diluição crítica foi selecionado como alternativa, uma vez que se trata de uma estratégia amplamente utilizada para isolamento de linhagens clonais de células, com uma abordagem mais simples e controlada. Essa metodologia foi escolhida com o objetivo na obtenção de clones individuais viáveis e homogeneidade no cultivo, aumentando, assim, as chances de isolar e expandir as células clonais editadas de forma eficaz para experimentos subsequentes.

A tabela 3 apresenta os resultados das diversas tentativas de isolamento de linhagens clonais editadas por diluição. Quando as células são transfectadas com o vetor contendo o cassete de expressão do gene eGFP, elas expressam o eGFP de forma transiente, o que significa que, no momento em que são contadas e distribuídas nas placas de 96 poços, apenas aquelas que inicialmente apresentam expressão de eGFP são observadas. No entanto, com o tempo, a expressão transiente desaparece, uma vez que o vetor utilizado na transfecção será degradado pelas células. Caso o gene seja inserido no local desejado, a expressão contínua do eGFP será mantida, confirmando o *knock-in* do gene.

Tabela 3. Resultado dos ensaios para isolar linhagens clonais editadas.

Tentativas de isolamento	Quantidade de placas de 96W	Células GFP+ isoladas no plaqueamento	Células GFP+ após 7 dias	Células que geraram colônias
T1	4	48	0	17
T2	2	17	0	4
T3	6	16	0	9
T4	2	6	0	4
T5	4	11	0	10
TOTAL	18 (1728W)	98 (5,7%)	0	44 (44,9%)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar de ser possível isolar linhagens clonais, nenhuma delas foi GFP positiva, ou seja, nenhuma célula editada foi identificada entre os clones isolados. Esse resultado sugere que a técnica de isolamento precisa ser aprimorada. Além disso, é relevante ressaltar que o evento de *knock-in* do eGFP no *locus* H11 não ocorre com alta frequência, o que torna ainda mais difícil a obtenção de células editadas. Esse fator contribui para a baixa taxa de sucesso no isolamento das linhagens clonais editadas, tornando esse processo desafiador e exigindo ajustes adicionais nas abordagens experimentais.

As células MAC-T transfectadas foram avaliadas quanto à ocorrência do evento de *knock-in*, com o objetivo de confirmar a inserção do gene alvo no *locus* H11. Para isso, foram desenhados primers específicos: um localizado no próprio *locus* H11 e o outro dentro do cassete de expressão do eGFP. Esse desenho de primers permitiu que a amplificação por PCR ocorresse somente caso o gene tivesse sido corretamente inserido no local alvo. O fragmento H11-GFP UP, que abrange a região inicial do gene, e o fragmento H11-GFP DOWN, que corresponde à porção final, estão ilustrados de maneira esquemática nas figuras 33a e 33b, respectivamente. Essas figuras apresentam, de forma esquemática, a inserção do gene eGFP no *locus* H11, no local preciso determinado pelo guia Bi5.

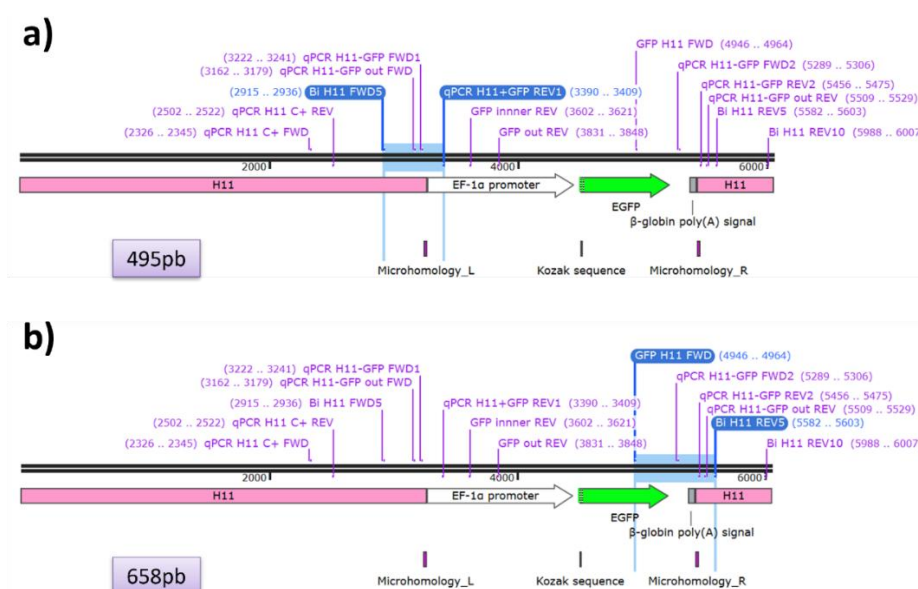


Figura 33. Representação esquemática da inserção do gene eGFP no *locus* H11. **a)** O fragmento H11-GFP UP, representado em azul. **b)** O fragmento H11-GFP DOWN, também destacado em azul.

Fonte: Elaborado pelo autor utilizando SnapGene.

Esses *amplicons* podem ser visualizados na figura 34. Eles foram clonados no vetor de clonagem pGEM-Teasy, e quatro clones de cada fragmento foram selecionados para sequenciamento. A confirmação da inserção foi realizada com base nos resultados obtidos do sequenciamento.

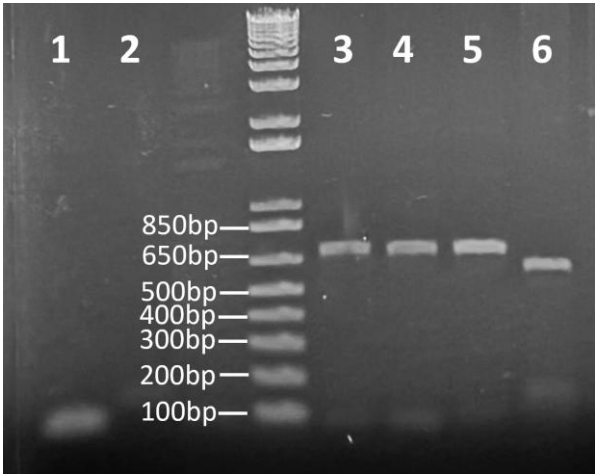


Figura 34. Amplificação por PCR dos fragmentos H11-GFP UP e H11-GFP DOWN. Poço 1: Controle negativo DOWN. Poço 2: Controle negativo UP. Poços 3, 4 e 5: Fragmento DOWN. Poço 6: Fragmento UP.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 35, o alinhamento das sequências dos 4 clones mostra as inserções. Em rosa, está destacada a região de microhomologia; em azul, a sequência PITCh; e, em amarelo, a sequência adicional identificada como fragmento de DNA satélite bovino. Na sequência referência está em sublinhado o que corresponde ao *locus* H11 e em negrito o que corresponde a construção do eGFP.

Ref	<u>AGGGCTTATTTCTGAAGTTGACTCACTCAGGTCCCACTGCAGGGAGGGAGGGGTGAAGCT</u>	60
1	AGGGCTTATTTCTGAAGTTGACTCACTCAGGTCCCACTGCAGGGAGGGAGGGGTGAAGCT	60
2	AGGGCTTATTTCTGAAGTTGACTCACTCAGGTCCCACTGCAGGGAGGGAGGGGTGAAGCT	60
3	AGGGCTTATTTCTGAAGTTGACTCACTCAGGTCCCACTGCAGGGAGGGAGGGGTGAAGCT	60
4	AGGGCTTATTTCTGAAGTTGACTCACTCAGGTCCCACTGCAGGGAGGGAGGGGTGAAGCT	60

Ref	<u>GAAGTACTATGAAAAGGCAGACCTCATGCTCAATCCACAAAGCCAGGTTTGTGTTGAAAAG</u>	120
1	GAAGTACTATGAAAAGGCAGACCTCATGCTCAATCCACAAAGCCAGGTTTGTGTTGAAAAG	120
2	GAAGTACTATGAAAAGGCAGACCTCATGCTCAATCCACAAAGCCAGGTTTGTGTTGAAAAG	120
3	GAAGTACTATGAAAAGGCAGACCTCATGCTCAATCCACAAAGCCAGGTTTGTGTTGAAAAG	120
4	GAAGTACTATGAAAAGGCAGACCTCATGCTCAATCCACAAAGCCAGGTTTGTGTTGAAAAG	120

Ref	<u>YGACTTGCTATTTGTTCTTGGAAGTATAGGGCAGGGTGGGCAGCTCCAGGTTTATAGGCT</u>	180
1	TGACTTGCTATTTGTTCTTGGAAGTATAGGGCAGGGTGGGCAGCTCCAGGTTTATAGGCT	180
2	TGACTTGCTATTTGTTCTTGGAAGTATAGGGCAGGGTGGGCAGCTCCAGGTTTATAGGCT	180
3	TGACTTGCTATTTGTTCTTGGAAGTATAGGGCAGGGTGGGCAGCTCCAGGTTTATAGGCT	180
4	TGACTTGCTATTTGTTCTTGGAAGTATAGGGCAGGGTGGGCAGCTCCAGGTTTATAGGCT	180

Ref	GCACCCCTAACCCCTTAGGCTGTTTTTTTAAACCTTTTCAGTCAAAATCCAGTCATCTTGCTA	240	
1	GCACCCCTAACCCCTTAGGCTGTTTTTTTAAACCTTTTCAGTCAAAATCCAGTCATCTTGCTA	240	
2	GCACCCCTAACCCCTTAGGCTGTTTTTTTAAACCTTTTCAGTCAAAATCCAGTCATCTTGCTA	240	
3	GCACCCCTAACCCCTTAGGCTGTTTTTTTAAACCTTTTCAGTCAAAATCCAGTCATCTTGCTA	240	
4	GCACCCCTAACCCCTTAGGCTGTTTTTTTAAACCTTTTCAGTCAAAATCCAGTCATCTTGCTA	240	

Ref	ACTTCACTTGTGCCGAACCAGAATGGTCTCATTATTTGAGCCTCTACTATGAAGTCAAAC	300	
1	ACTTCACTTGTGCCGAACCAGAATGGTCTCATTATTTGAGCCTCTACTATGAAGTCAAAC	300	
2	ACTTCACTTGTGCCGAACCAGAATGGTCTCATTATTTGAGCCTCTACTATGAAGTCAAAC	300	
3	ACTTCACTTGTGCCGAACCAGAATGGTCTCATTATTTGAGCCTCTACTATGAAGTCAAAC	300	
4	ACTTCACTTGTGCCGAACCAGAATGGTCTCATTATTTGAGCCTTACTATGAAGTCAAAC	300	

Ref	TAGAGTTGAGGGCCCTAAATGGATAAGAAGT GAGAAATCGGCTGAGTTAAG -----	343	
1	TAGAGTTGAGGGCCCTAAATGGATAAGAAGT GAGAAATCGGCTGAGTTAAG CACTGATCTC	360	
2	TAGAGTTGAGGGCCCTAAATGGATAAGAAGT GAGAAATCGGCTGAGTTAAG CACTGATCTC	360	
3	TAGAGTTGAGGGCCCTAAATGGATAAGAAGT GAGAAATCGGCTGAGTTAAG CACTGATCTC	360	
4	TAGAGTTGAGGGCCCTAAATGGATAAGAAGT GAGAAATCGGCTGAGTTAAG CAATGATTCC	360	

Ref	-----	343	
1	GTGGCTATCATGCACTGCTCACGTGGCTGATCATGCAATTCGATT AATATT GCATCGTAC	420	
2	GTGGCTATCATGCACTGCTCACGTGGCTGATCATGCAATTCGATT AATATT GCATCGTAC	420	
3	GTGGCTATCATGCACTGCTCACGTGGCTGATCATGCAATTCGATT AATATT GCATCGTAC	420	
4	-----TCCATATTGCA	372	
Ref	-----TTAACGTGAGGCTCCGGTGCC	372	
1	GCGTACGTGTT TGGATATC GAGAAATCGGCTGAGTTAAG TTAACGTGAGGCTCCGGTGCC	480	
2	GCGTACGTGTT TGGATATC GAGAAATCGGCTGAGTTAAG TTAACGTGAGGCTCCGGTGCC	480	
3	GCGTACGTGTT TGGATATC GAGAAATCGGCTGAGTTAAG TTAACGTGAGGCTCCGGTGCC	480	
4	TATACCGTGTTTGGATATC GAGAAATCGGCTGAGTTAAG TTAACGTGAGGCTCCGGTGCC	432	

Ref	CGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGC	432	
1	CGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGC	540	
2	CGTCAGTGGG T AGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGC	540	
3	CGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGC	540	
4	CGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGC	492	

Ref	AATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAC	492	
1	AATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAC	600	
2	AATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAC	600	
3	AATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAC	600	
4	AATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAC	552	

	Ref	TGG	495
	1	TGG	603
	2	TGG	603
	3	TGG	603
	4	TGG	555

Figura 35. Alinhamento das sequências obtidas de quatro clones UP com a sequência de referência do eGFP inserido no locus H11. No alinhamento, as regiões de microhomologia, estão destacadas em rosa. A sequência PITCH é evidenciada em azul. Já em amarelo, observa-se uma sequência adicional, posteriormente identificada como DNA satélite bovino por análise de similaridade (BLAST). Em negrito na sequência referência, a construção do eGFP. Sublinhado corresponde ao locus H11

Fonte: Resultado gerado pelo Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

A análise dessa sequência adicional feita por alinhamento BLAST (figura 36) revelou sua similaridade com elementos de fragmentos de DNA satélite presentes no genoma bovino. A presença de sequências repetitivas, como o

DNA satélite, é mais comum em regiões heterocromáticas, teloméricas e centroméricas (Šatović-Vukšić & Plohl, 2023). Embora o *locus* H11 bovino não seja tipicamente associado a essas regiões genômicas ricas em sequências repetitivas, a inserção de fragmentos de DNA satélite observada durante a edição genética pode ser explicada pelo processo de reparo das quebras induzidas pelo sistema CRISPR/Cas9. Esse tipo de inserção pode ocorrer quando o sistema de reparo se alinha de forma imprecisa com as sequências repetitivas do genoma, resultando na incorporação de fragmentos de DNA satélite. Mas esse tipo de evento observado ainda não foi relatado na literatura especializada sobre edição gênica, podendo ter algum significado relevante e não relatado do processo de recombinação envolvendo a edição pelo sistema CRISPR/Cas9.

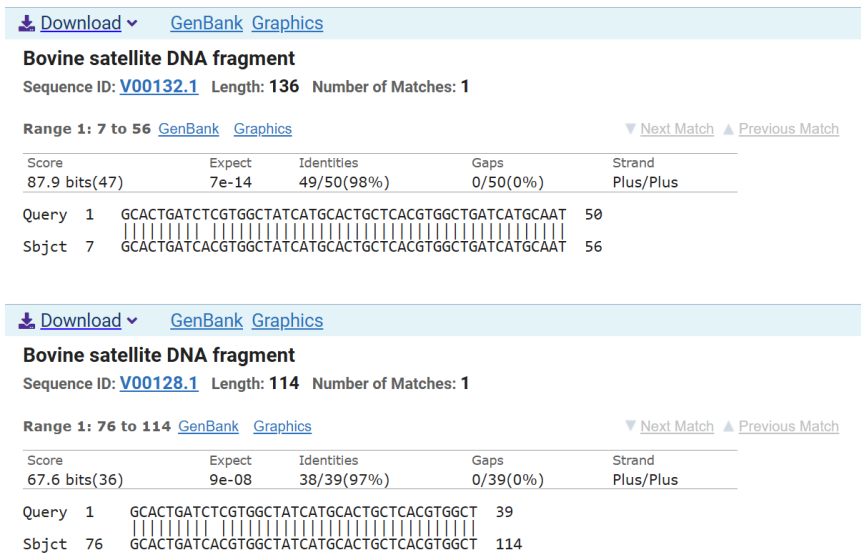


Figura 36. Resultado da análise BLAST da sequência adicional identificada nos clones 1, 2 e 3. BLAST gerado utilizando o NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Fonte: Screenshot do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), acessado em 13/01/2025.

Embora ainda não seja possível determinar se os 3 clones com inserção de fragmentos de DNA satélite representam eventos independentes ou replicações de um mesmo evento clonal, a presença dessa sequência adicional não parece interferir na funcionalidade do *knock-in*. Até o momento, não foram identificados promotores ou elementos funcionais associados a esse fragmento de DNA satélite, o que sugere que ele não deve comprometer a expressão do eGFP ou do gene de interesse inserido. Entretanto, a presença dessa sequência

adicional levanta a possibilidade de um mecanismo de inserção ainda não descrito na literatura. Pesquisas futuras sobre o papel desse fragmento de DNA satélite no contexto da recombinação mediada por CRISPR/Cas9 podem esclarecer se existe um mecanismo específico responsável por sua incorporação.

Os resultados do sequenciamento revelaram que o evento de *knock-in* não foi totalmente preciso. Na região H11-GFP UP, foi observada a inserção adicional de um fragmento de DNA satélite bovino em 3 dos 4 clones sequenciados, juntamente com a sequência PITCh, o que evidencia uma recombinação imperfeita (figura 35). Essa imperfeição pode ser explicada pelo mecanismo de reparo do MMEJ, que é semelhante ao do NHEJ. Nesse processo, cada extremidade da DSB é unida por sequências de microhomologia, o que frequentemente resulta em deleções, inserções e translocações cromossômicas no local da quebra (Lee et al., 2018; Sfeir & Symington, 2015). Como o vetor completo ou quaisquer fragmentos dele não foram inseridos, o gRNA associado ao sistema PITCh parece ter direcionado a clivagem para esta região do vetor. No entanto, a enzima Cas9 não clivou exatamente a 3 nucleotídeos *downstream* do sítio PAM, como esperado, mas a uma dezena de pares de bases *downstream* do PAM. Essa clivagem deslocada, combinada com o possível reparo por MMEJ, resultou na incorporação de parte da sequência PITCh e do DNA satélite bovino na edição final.

No fragmento H11-GFP DOWN, os eventos de recombinação apresentaram maior precisão em comparação à região H11-GFP UP. Em um dos clones sequenciados, a inserção foi perfeita, enquanto nos outros três foi observada apenas a duplicidade da região de microhomologia. Como demonstrado na figura 37, não houve inserção da sequência PITCh nessa região, sugerindo que o mecanismo de reparo foi mais eficiente. Apesar da duplicidade da região de microhomologia em três dos clones, essa modificação não deve interferir na expressão do eGFP ou no funcionamento geral do *knock-in*. Esses resultados reforçam a importância de entender os mecanismos moleculares envolvidos durante a edição para otimizar a precisão do sistema CRISPR/Cas9.

Ref	CAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTT	60
5	CAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTT	60
6	CAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTT	60
7	CAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTT	60
8	CAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTT	60

Ref	CAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAA	120
5	CAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAA	120
6	CAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAA	120
7	CAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAA	120
8	CAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAA	120

Ref	CACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTC	180
5	CACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTC	180
6	CACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTC	180
7	CACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTC	180
8	CACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTC	180

Ref	CGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGAC	240
5	CGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGAC	240
6	CGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGAC	240
7	CGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGAC	240
8	CGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGAC	240

Ref	CGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCACTCCTCA	300
5	CGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCACTCCTCA	300
6	CGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCACTCCTCA	300
7	CGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCACTCCTCA	300
8	CGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCACTCCTCA	300

Ref	GGTGCAGGCTGCCTATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAATA	360
5	GGTGCAGGCTGCCTATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAATA	360
6	GGTGCAGGCTGCCTATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAATA	360
7	GGTGCAGGCTGCCTATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAATA	360
8	GGTGCAGGCTGCCTATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAATA	360

Ref	CCACTGAGATCTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCA	420
5	CCACTGAGATCTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCA	420
6	CCACTGAGATCTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCA	420
7	CCACTGAGATCTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCA	420
8	CCACTGAGATCTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCA	420

Ref	TCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTT	480
5	TCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTT	480
6	TCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTT	480
7	TCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTT	480
8	TCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTT	480

Ref	GTGTCTCTCAGTTAAC-----TCGAGGAGCTT	507
5	GTGTCTCTCAGTTAACTCGAGGAGCTTGAGATTTGTGATATCCAAACAGTCGAGGAGCTT	540
6	GTGTCTCTCAGTTAACTCGAGGAGCTTGAGATTTGTGATATCCAAACAGTCGAGGAGCTT	540
7	GTGTCTCTCAGTTAAC-----TCGAGGAGCTT	507
8	GTGTCTCTCAGTTAACTCGAGGAGCTTGAGATTTGTGATATCCAAACA-----TCGAGGAGCTT	539

Ref	GAGATTTGTACCTCAGATTGGGAGGAATAAAAAACCTTCAGTCAGGAAAGGGGACTCAA	567
5	GAGATTTGTACCTCAGATTGGGAGGAATAAAAAACCTTCAGTCAGGAAAGGGGACTCAA	600
6	GAGATTTGTACCTCAGATTGGGAGGAATAAAAAACCTTCAGTCAGGAAAGGGGACTCAA	600
7	GAGATTTGTACCTCAGATTGGGAGGAATAAAAAACCTTCAGTCAGGAAAGGGGACTCAA	567
8	GAGATTTGTACCTCAGATTGGGAGGAATAAAAAACCTTCAGTCAGGAAAGGGGACTCAA	599

Ref	GGCCATAGTTATTCTGGTAGAATCCTTTTCCCCAGTGTTGTGCATGTAGTTACGGTACAC	627
5	GGCCATAGTTATTCTGGTAGAATCCTTTTCCCCAGTGTTGTGCATGTAGTTACGGTACAC	660
6	GGCCATAGTTATTCTGGTAGAATCCTTTTCCCCAGTGTTGTGCATGTAGTTACGGTACAC	660
7	GGCCATAGTTATTCTGGTAGAATCCTTTTCCCCAGTGTTGTGCATGTAGTTACGGTACAC	627
8	GGCCATAGTTATTCTGGTAGAATCCTTTTCCCCAGTGTTGTGCATGTAGTTACGGTACAC	659

Ref	AGAATAACGGAACGGAGAAGTAAGAACACAG	658
5	AGAATAACGGAACGGAGAAGTAAGAACACAG	691
6	AGAATAACGGAACGGAGAAGTAAGAACACAG	691
7	AGAATAACGGAACGGAGAAGTAAGAACACAG	658
8	AGAATAACGGAACGGAGAAGTAAGAACACAG	690

Figura 37. Alinhamento das sequências obtidas de quatro clones com a sequência de referência do eGFP inserido no locus H11. No alinhamento, as regiões de microhomologia, estão destacadas em rosa. Em negrito na sequência referência, a construção do eGFP. Sublinhado corresponde ao locus H11

Fonte: Resultado gerado pelo Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

O resultado obtido confirma o sucesso parcial da edição genética, com a inserção do gene eGFP no locus H11, embora o sequenciamento tenha revelado imperfeições nas extremidades (fronteiras) do evento de *knock-in*. Na região H11-GFP UP, foi detectada a inserção adicional de um DNA satélite bovino em 3 dos 4 clones sequenciados, e a sequência PITCh também foi incorporada, indicando que a recombinação não ocorreu de forma completamente precisa. Por outro lado, na região H11-GFP DOWN, os resultados foram mais consistentes: um dos clones apresentou inserção perfeita, enquanto os outros três mostraram apenas a duplicidade da região de microhomologia. Apesar da dificuldade em isolar clones editados, o protocolo de *knock-in* demonstrou eficiência ao confirmar a inserção do gene eGFP em um *pool* de células transfectadas. As imperfeições observadas reforçam a necessidade de otimizações futuras e de um maior conhecimento do mecanismo pelo qual o gene repórter está sendo inserido no locus H11, que inclusive pode ser distinto dos mecanismos de recombinação homóloga ou recombinação por microhomologia descritos até o presente momento na literatura. Entretanto, essas imperfeições podem futuramente serem consideradas efeitos do processo de inserção por CRISPR/Cas9. Os resultados obtidos fornecem uma base promissora para o desenvolvimento de linhagens clonais editadas com maior precisão.

5.10 Transfecção de células MAC-T para inserção do eGFP no locus H11 com a utilização de SCR7, RS-1 e L755507

As células MAC-T foram transfectadas com diferentes compostos com o objetivo de avaliar se algum deles poderia aumentar a eficiência do processo de *knock-in* do gene eGFP. Os tratamentos realizados incluíram 80 µM de SCR7,

15 μM de RS-1 e 20 μM de L755507. O SCR7 inibe a via de reparo por NHEJ ao bloquear a DNA ligase IV, mas seus resultados variam entre espécies e modelos celulares. O RS-1 estimula a HDR ativando a proteína Rad51, enquanto o L755507 também melhora a HDR, embora seu mecanismo de ação ainda não esteja totalmente esclarecido.

No controle negativo (células não transfectadas), apresentado na figura 38, nenhuma fluorescência foi detectada, confirmando que a sinalização observada nas células transfectadas resultou da expressão do eGFP. Esse controle é importante para avaliar possíveis efeitos citotóxicos dos tratamentos, servindo como referência para a comparação da mortalidade celular. O controle positivo utilizando o vetor pEF-GFP apresentou resultados satisfatórios, confirmando a eficiência da transfecção (figura 39). Sob luz visível, foi possível observar que a mortalidade celular foi baixa, o que indicou que as condições do experimento foram adequadas e não comprometeram a viabilidade das células MAC-T. Sob luz UV, a fluorescência característica do eGFP foi detectada, evidenciando uma alta eficiência na expressão do gene repórter. Esses resultados validam o sistema experimental e fornecem uma referência para avaliar os demais tratamentos.

No tratamento sem fator (figura 40), a transfecção foi eficiente, com alta taxa de células fluorescentes expressando eGFP. A mortalidade celular também foi relativamente baixa, o que indicou uma boa viabilidade celular.

Com relação ao tratamento com 80 μM de SCR7 (figura 41), a fluorescência das células transfectadas foi visualmente semelhante à do controle sem fator. A mortalidade celular foi também similar à observada no controle, indicando que o SCR7 não teve um efeito negativo significativo sobre a viabilidade celular. No entanto, visualmente não foi possível identificar melhora ou prejuízo na eficiência da transfecção ou na viabilidade celular em relação à condição sem fatores.

No tratamento com 15 μM de RS-1, mostrado na figura 42, a fluorescência das células transfectadas foi semelhante à da condição sem fatores, embora com uma intensidade reduzida. A quantidade de células expressando eGFP foi

visualmente similar. A mortalidade celular foi comparável à das demais condições, indicando que o RS-1 não afetou negativamente a viabilidade celular.

Por fim, no tratamento com 20 μ M de L755507 (figura 43), foi observada uma taxa de mortalidade celular mais alta, o que foi maior em comparação aos outros tratamentos. Apesar disso, a transfecção foi eficiente nas células sobreviventes, com uma fluorescência de eGFP similar aos outros tratamentos. A maior mortalidade observada neste tratamento pode indicar um efeito citotóxico, mas, em termos de eficiência de transfecção, os resultados foram promissores.

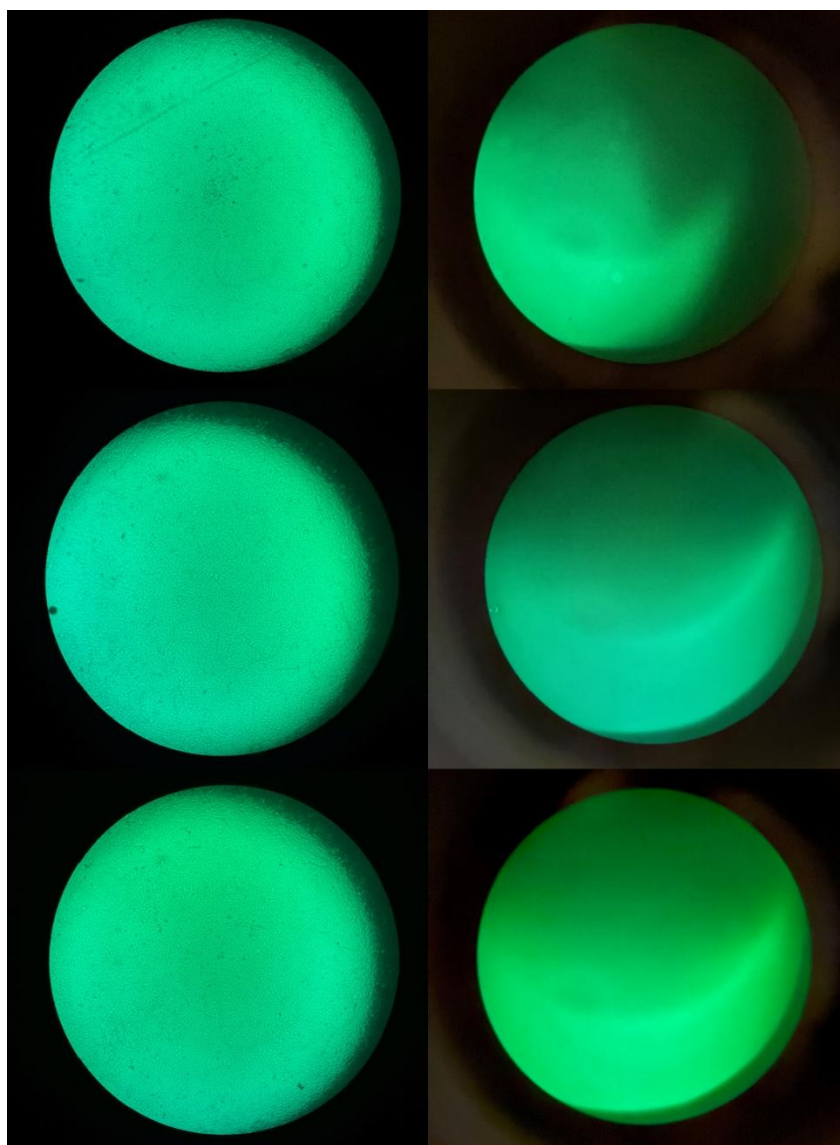


Figura 38. Células MAC-T não transfectadas (controle negativo), observados sob luz visível e luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

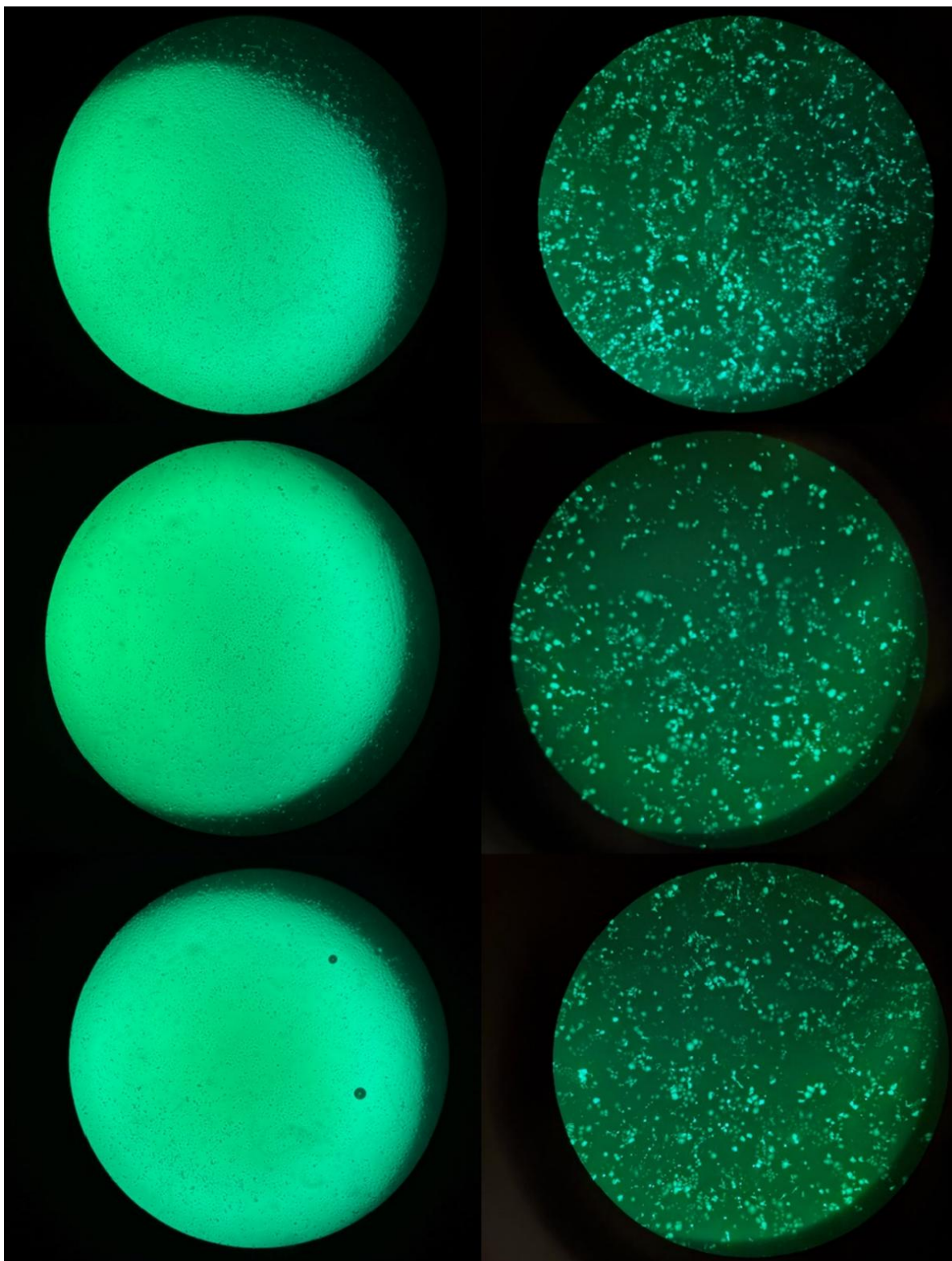


Figura 39. Células MAC-T transfectadas com o vetor pEF-GFP (controle positivo da transfecção), observados sob luz visível e luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

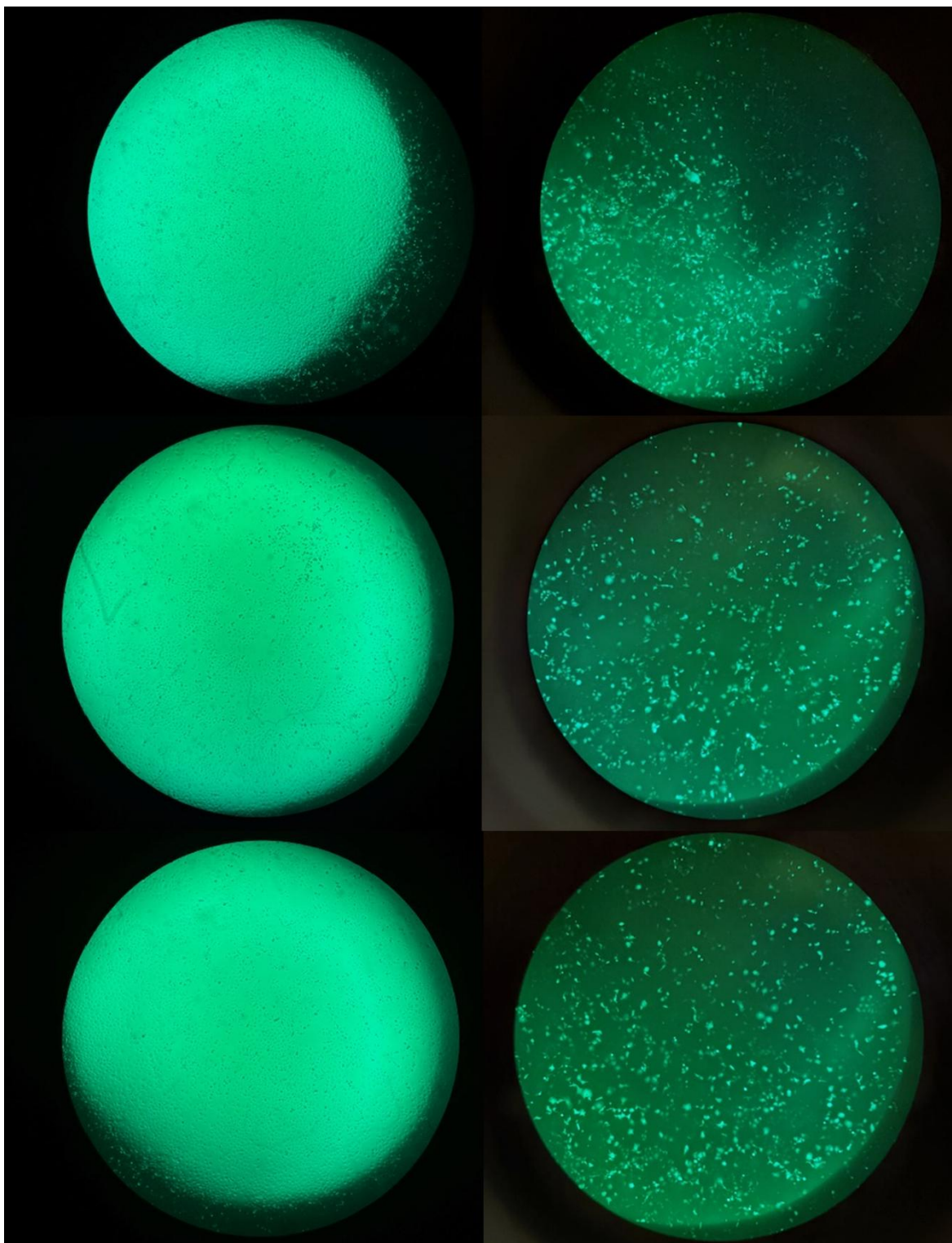


Figura 40. Células MAC-T transfectadas com o vetor pX330E + Bi5 e o vetor pGEM+PITCh-Bi5-GFP, observados sob luz visível e luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.

Fonte: Elaborado pelo autor

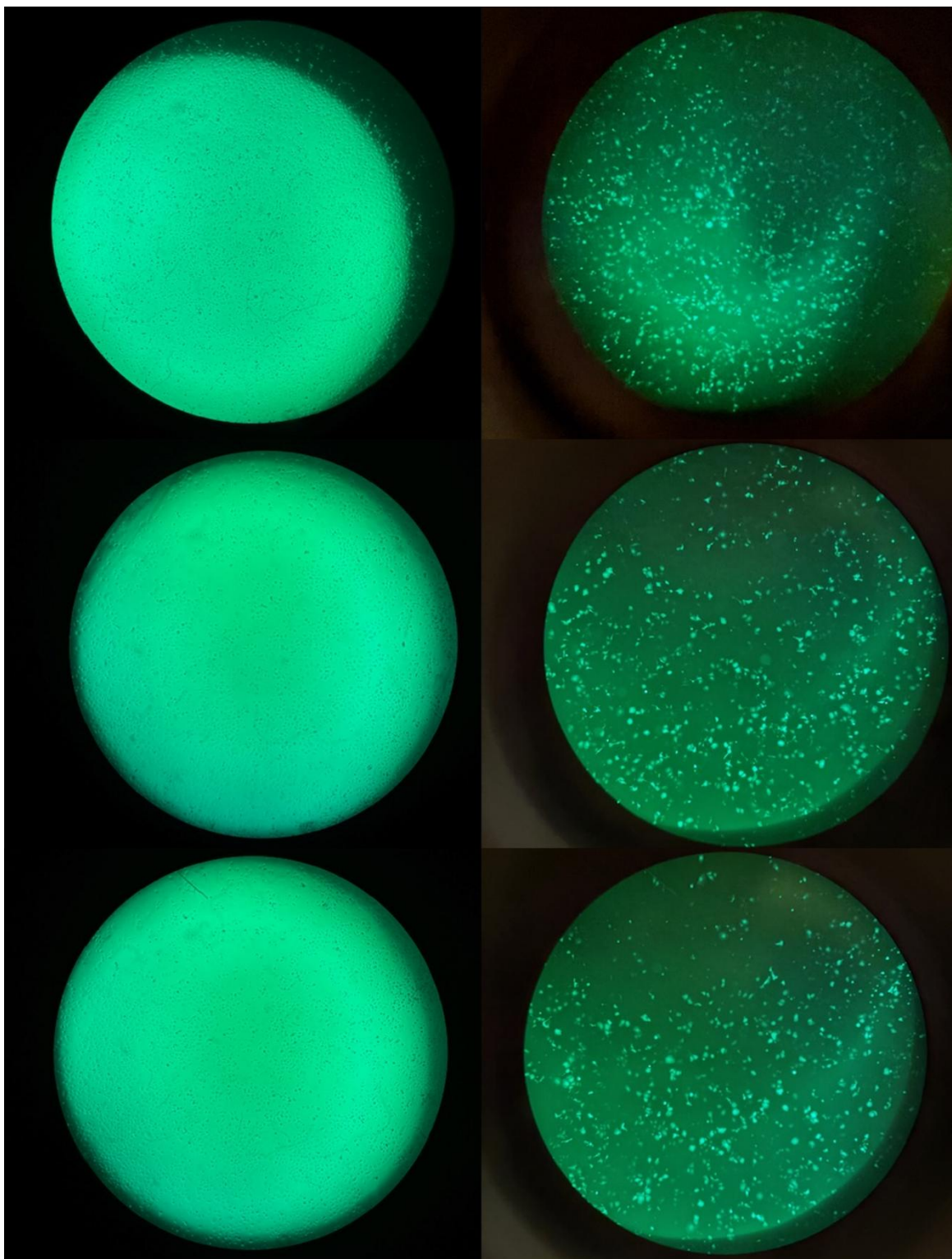


Figura 41. Células MAC-T transfectadas com o vetor pX330E + Bi5 e o vetor pGEM+PiTCh-Bi5-GFP com adição de 80 μ M de SCR7, observados sob luz visível e luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

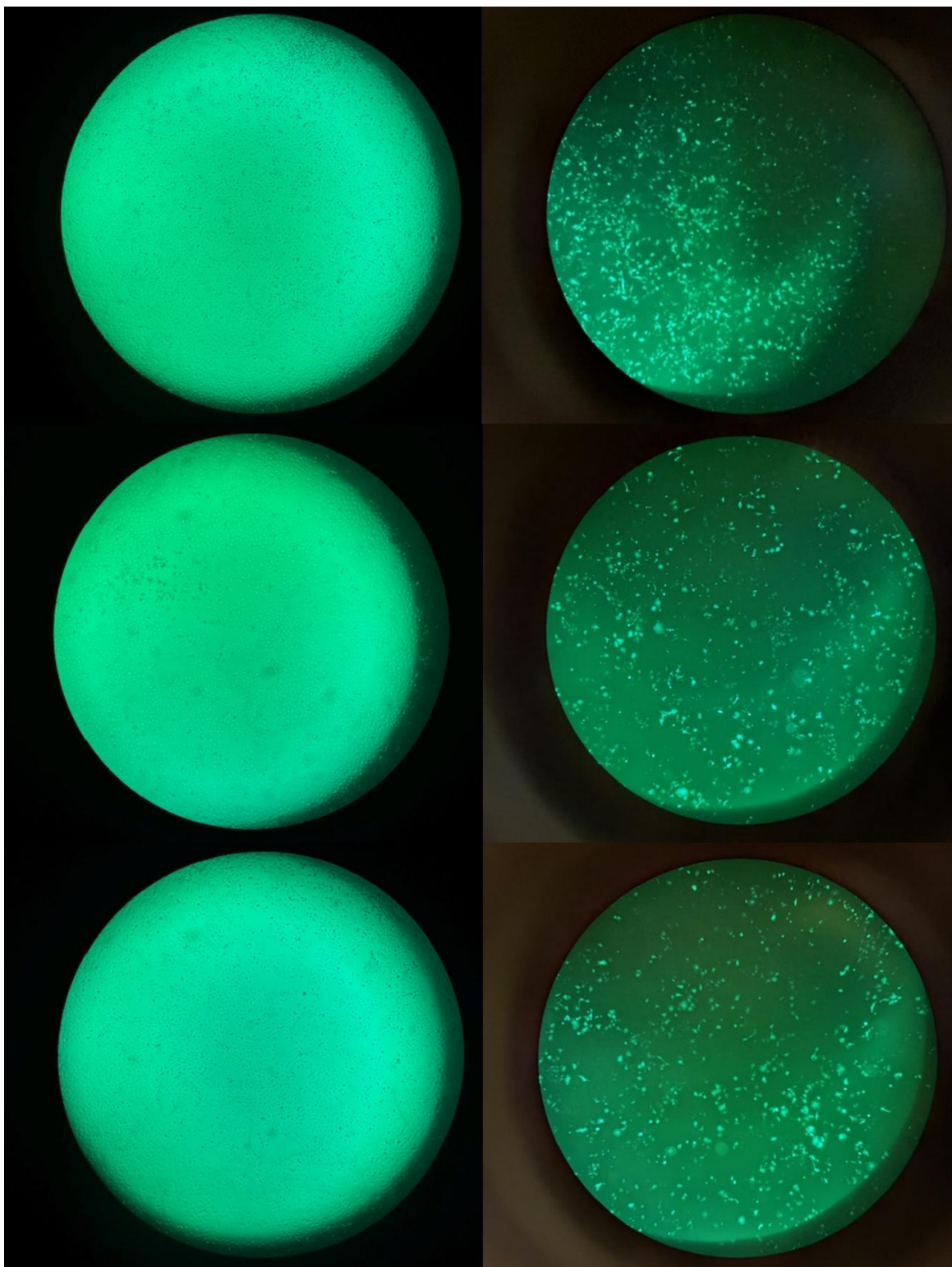


Figura 42. Células MAC-T transfectadas com o vetor pX330E + Bi5 e o vetor pGEM+PiTCh-Bi5-GFP com adição de 15 μ M de RS-1, observados sob luz visível e luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

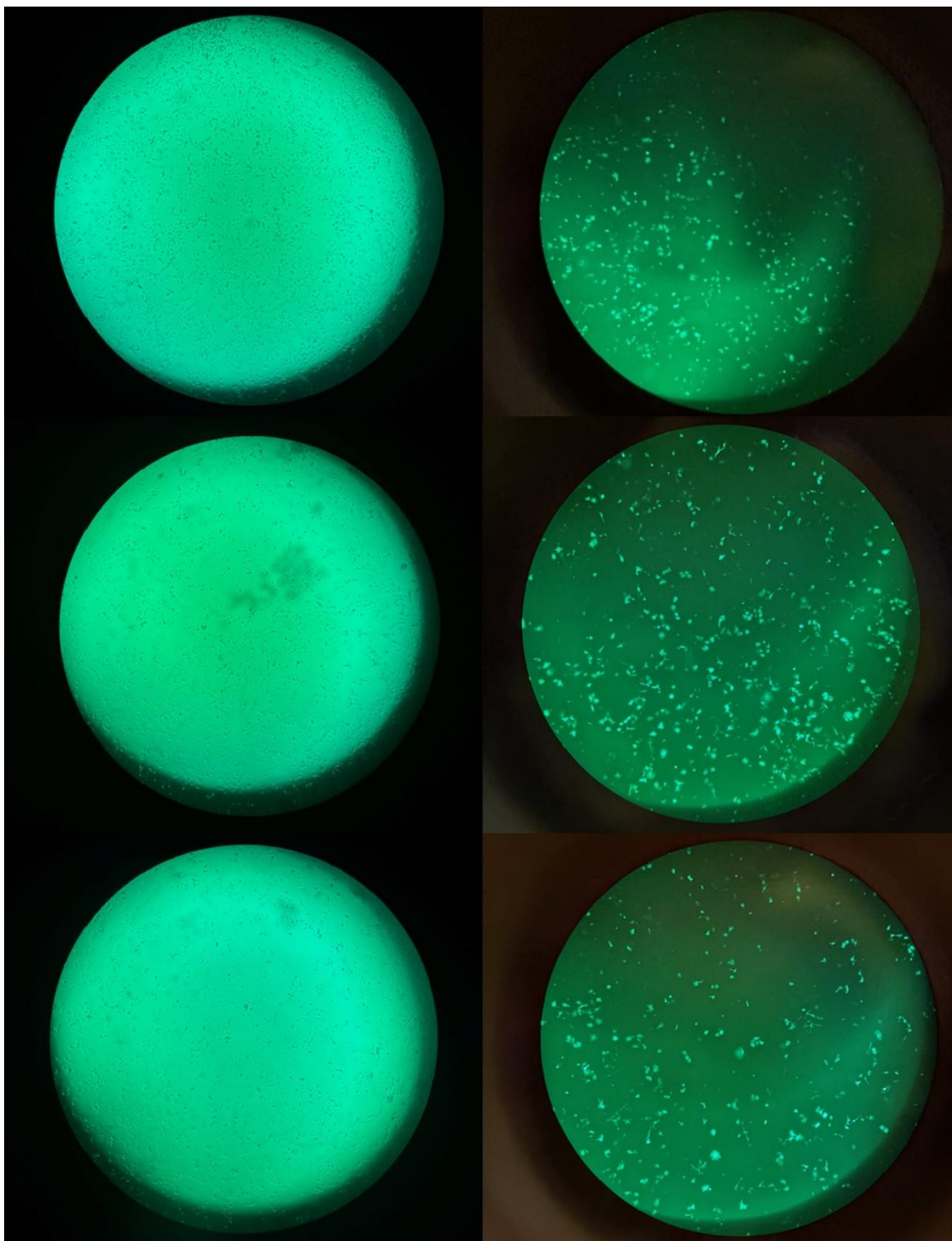


Figura 43. Células MAC-T transfectadas com o vetor pX330E + Bi5 e o vetor pGEM+PITCh-Bi5-GFP com adição de 20 μ M de L755507, observados sob luz visível e luz UV. As fotografias foram capturadas utilizando um microscópio invertido Axiovert (Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 4x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos indicam algumas diferenças notáveis na eficiência de transfecção e mortalidade celular entre os tratamentos. O SCR7, nas condições testadas (80 μ M), não parece ter influenciado significativamente a eficiência de transfecção, apresentando resultados semelhantes aos do controle sem fator. A mortalidade celular e a fluorescência nas células transfectadas não diferiram de forma marcante das condições de controle, sugerindo que o SCR7 não teve um impacto pronunciado sobre a transfecção.

O RS-1 (15 μ M) também não teve um efeito substancial na eficiência de transfecção, mas a intensidade do sinal de fluorescência foi reduzida, indicando que esse fator pode não ser tão eficaz em promover a expressão do eGFP quanto os outros fatores testados. No entanto, essa diminuição na intensidade de fluorescência não reflete diretamente na capacidade do RS-1 de auxiliar no *knock-in* do gene, sugerindo que mais testes são necessários para validar seu impacto. A mortalidade celular foi mantida em níveis semelhantes aos observados no controle, o que sugere que a toxicidade do RS-1 não foi significativa.

O L755507 (20 μ M) apresentou resultados similares em termos de intensidade de fluorescência, com uma boa eficiência de transfecção nas células sobreviventes. No entanto, a mortalidade celular foi mais elevada, o que pode indicar um efeito citotóxico nas células. Esses resultados sugerem que, embora o L755507 possa influenciar positivamente a eficiência de transfecção, ele pode também afetar a viabilidade celular. Estudos adicionais são necessários para otimizar a concentração de L755507 e minimizar os efeitos citotóxicos, a fim de melhorar o equilíbrio entre mortalidade e eficiência de transfecção.

5.11 Quantificação da inserção do eGFP no *locus* H11 por qPCR

Uma análise de qPCR foi realizada para investigar, de maneira quantitativa, a eficácia dos compostos utilizados na transfecção, com o objetivo de avaliar se algum deles poderia facilitar ou otimizar o processo de *knock-in* do gene eGFP no *locus* H11 (*gene targeting*). Essa abordagem permitiu a quantificação precisa da inserção do gene eGFP no *locus* H11, utilizando gDNA das células transfectadas, e a comparação dos diferentes compostos nesse

processo. A estratégia de amplificação envolveu um primer *forward* dentro do gene eGFP e um primer *reverse* dentro do *locus* H11, garantindo que a amplificação ocorresse somente quando o eGFP estivesse inserido no *locus* alvo, confirmando a ocorrência do *knock-in*. Os dados obtidos estão apresentados na figura 44.

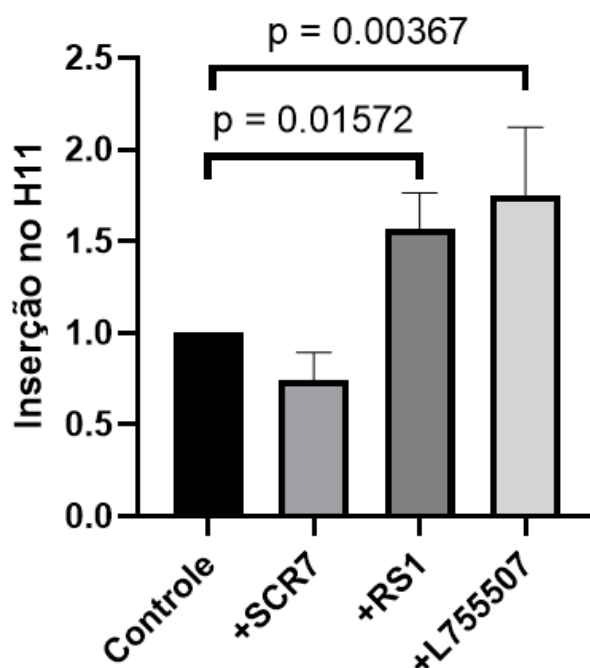


Figura 44. Quantificação da inserção do eGFP no *locus* H11 utilizando qPCR nos diferentes grupos experimentais. O gráfico apresenta a comparação entre o grupo controle (sem fatores), o grupo tratado com SCR7, o grupo tratado com RS-1 e o grupo tratado com L755507. Os grupos foram comparados pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$) e são apresentados como médias $\pm$ desvio padrão.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados obtidos revelaram diferenças significativas na eficiência de inserção do gene repórter entre os tratamentos, considerando o critério de significância estatística de $P > 0,05$. O composto SCR7 não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p = 0,98268$), sugerindo que, nas condições avaliadas, ele não influencia de forma relevante a promoção do *knock-in* do gene eGFP. A literatura sobre o SCR7 apresenta resultados controversos. Estudos anteriores indicaram aumento na eficiência de *knock-in* com seu uso (Chu et al., 2015; Maruyama et al., 2015; Singh et al., 2015),

enquanto outros relatam a ausência de efeitos significativos (Kruglova & Shepelev, 2024; Fu et al., 2021; Song et al., 2016). Esses resultados sugerem que o impacto do SCR7 pode depender de variáveis experimentais, como o modelo celular utilizado, o que reforça a necessidade de investigações futuras para explorar de forma mais detalhada seus efeitos, particularmente em células bovinas. Em contraste, os compostos RS-1 ($p = 0,01572$) e L755507 ($p = 0,00367$) demonstraram um aumento significativo na eficiência de inserção, indicando que ambos possuem impacto positivo no processo de *knock-in*.

O composto RS-1, conhecido por sua capacidade de modular positivamente a atividade da recombinase Rad51, destacou-se como um agente eficaz na promoção da recombinação por microhomologia. Esse composto já foi relatado em melhorar a eficiência de *knock-in* em embriões bovinos (Toranzo et al., 2020) e outras espécies de mamíferos (Pinder et al., 2015; Song et al., 2016).

O L755507, um agonista do receptor β 2-adrenérgico, destacou-se entre os compostos testados por apresentar os resultados mais expressivos na promoção da eficiência de integração gênica. Este composto tem sido associado a efeitos positivos na edição genômica, apesar de o mecanismo de ação exato na via de reparo do DNA ainda não estar totalmente esclarecido. Especula-se que sua atuação possa influenciar vias celulares relacionadas à reparação por recombinação homóloga, mas mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram evidências anteriores que apontam o efeito benéfico do L755507 em sistemas de *knock-in*, conforme demonstrado em modelos experimentais de diferentes espécies (Li et al., 2019; Ryu et al., 2019; Yu et al., 2015). Esses resultados indicam que ambos os compostos possuem propriedades favoráveis que podem ser exploradas para otimizar estratégias de edição genômica.

Os resultados obtidos para RS-1 e L755507 destacam não apenas a eficácia desses compostos, mas também seu potencial de aplicação em abordagens mais amplas de engenharia genética em associação com o sistema CRISPR/Cas visando *knock-in* sítio dirigido. Além disso, são especialmente promissores no contexto da biotecnologia, uma vez que a eficiência de *knock-in* é um fator crítico para a edição de loci específicos em células de interesse

industrial e acadêmico. A capacidade desses compostos de melhorar significativamente a taxa de inserção representa um avanço considerável no desenvolvimento de metodologias mais eficientes e precisas.

A robustez dos resultados para RS-1 e L755507 também reforça a importância de investigações futuras visando a otimização de parâmetros experimentais, como concentrações dos compostos, tempos de exposição, condições celulares e testar a associação dos dois fatores em busca de um efeito sinérgico entre eles, a fim de maximizar ainda mais seu impacto no *gene targeting* assistido por CRISPR/Cas9. Em resumo, os compostos RS-1 e L755507 demonstram potencial para serem incorporados como ferramentas auxiliares em protocolos avançados de edição genômica, contribuindo para a eficiência e a precisão de estratégias de *knock-in* em células bovinas.

5.12 Eletroporação do complexo RNP em embriões bovinos

Os zigotos presumidos foram eletroporados com o complexo RNP e a construção do eGFP na forma linear, e subsequente analisados quanto à taxa de clivagem, taxa de blastocisto e à expressão do eGFP, como parâmetros indicativos da eficiência do processo de eletroporação e do sucesso do *knock-in* do gene. O uso da proteína Cas9 em um complexo com o gRNA, em substituição ao vetor contendo o gene Cas9 ou ao mRNA da Cas9, diminui a chance de mosaico, reduz a ocorrência de eventos *off-target* e aumenta a eficiência da edição (Miao et al., 2019).

Na figura 45, são apresentadas imagens dos ovócitos maturados antes da eletroporação, imagens obtidas durante a análise da taxa de clivagem, realizadas no terceiro dia após a fertilização (D3), e imagens dos blastocistos observados no oitavo dia após a fertilização (D8). As imagens de clivagem e blastocisto mostram que devido ao uso de pronase para facilitar a permeabilidade da zona pelúcida, essa estrutura aparece levemente digerida, o que pode ter influenciado a morfologia dos embriões observados. A análise dessas imagens permite uma avaliação visual das fases do desenvolvimento embrionário, contribuindo para a avaliação da eficiência da eletroporação e do processo de desenvolvimento até o estágio de blastocisto.

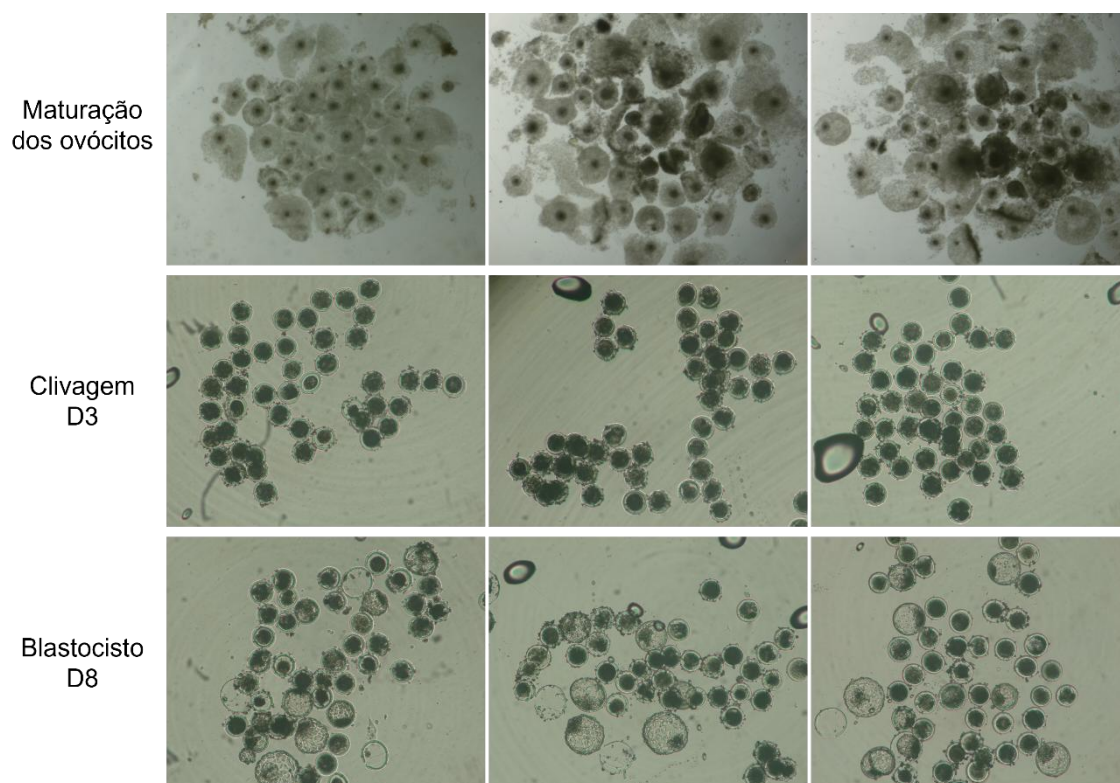


Figura 45. Imagens dos ovócitos maturados, da clivagem em D3 e do blastocisto em D8 das réplicas do experimento de eletroporação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

No grupo controle, um total de 100 zigotos foram analisados, dos quais 90 apresentaram clivagem, resultando em uma taxa de clivagem de 90%. Desses 90 embriões que clivaram, 26 atingiram a fase de blastocisto, correspondendo a uma taxa de blastocisto de 26%. No grupo eletroporado, 336 zigotos foram submetidos ao procedimento, dos quais 268 clivaram, gerando uma taxa de clivagem de 79,8%. Desses 268 embriões clivados, 70 chegaram à fase de blastocisto, representando uma taxa de blastocisto de 20,8%. Esses dados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Dados do número de embriões eletroporados, taxa de clivagem e taxa de blastocisto.

Tratamento	Número de Zigotos	Clivagem (D3)	Taxa de Clivagem (%)	Blastocisto (D8)	Taxa de Blastocisto (%)
Control	100	90	90%	26	26%
Trt	336	268	79,76%	70	20,83%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos indicam que, embora a taxa de clivagem no grupo eletroporado tenha sido de 79,8%, o que é relativamente alto, e embora tenha ocorrido a formação de blastocistos (20,8%), nenhum embrião GFP positivo foi detectado. Isso não implica necessariamente que a Cas9 e o RNA guia não tenham exercido efeito, mas sim que o gene eGFP não foi inserido com sucesso no *locus* alvo. Existem várias explicações possíveis para a ausência de embriões GFP positivos.

Primeiramente, a construção do gene eGFP utilizada no experimento possui 2.222 pb, um tamanho considerável que pode ter dificultado sua entrada no zigoto durante o procedimento de eletroporação. Além disso, o tratamento de 30 segundos com pronase teve como objetivo apenas reduzir a zona pelúcida, preservando sua integridade para não comprometer o desenvolvimento embrionário. No entanto, essa abordagem pode ter representado uma barreira adicional à entrada do material genético no zigoto, uma vez que a zona pelúcida permaneceu parcialmente intacta, o que pode ter sido uma barreira física adicional. Dados do nosso laboratório mostraram que embriões eclodidos expressam bem eGFP quando transfectados, corroborando a hipótese de que a zona pelúcida é uma barreira relevante à entrada de ácidos nucleicos grandes.

Além disso, é importante ressaltar que a construção do gene eGFP foi utilizada na forma linear, o que pode ter contribuído para a falha na inserção do gene. A literatura indica que a eficiência de transfecção de DNA linear em cultivo celular é significativamente mais baixa (Oliveira et al., 2005; von Groll et al., 2006). A forma linear do DNA é conhecida por ter menor estabilidade em comparação ao uso de vetores circulares, o que aumenta o risco de degradação do DNA antes que ele seja incorporado ao genoma do embrião (Lim et al., 2023). Embora o uso de vetores circulares tenha a vantagem de aumentar a estabilidade do DNA e, possivelmente, a eficiência de transfecção, ele também apresenta o risco de integrar inadvertidamente genes de resistência do vetor no genoma do embrião, o que é altamente indesejável, especialmente no contexto da geração de animais transgênicos. A escolha de utilizar a construção linear foi motivada pela necessidade de evitar a inserção acidental de elementos do vetor fora do cassete de expressão do eGFP, mas pode ter comprometido a eficiência, resultando na ausência da inserção do gene eGFP no genoma do embrião.

Uma outra razão para a falha na inserção do gene pode ser a baixa eficiência do RNA guia ou a inatividade da Cas9 inseridos como RNP. O guia utilizado pode não ter sido suficientemente eficaz para induzir a edição no *locus* H11, o que comprometeria a inserção do gene eGFP, ou a atividade da Cas9 poderia ter sido aquém da necessária para promover o DSB no gDNA do embrião. Para investigar essa possibilidade, foi realizada uma análise de INDELS geradas pelo guia, que foi feita amplificando a região alvo do *locus* H11 por PCR e sequenciamentos dos *amplicons* gerados em cada embrião individualmente. Esta análise, apresentada no tópico 5.14, ajudou a determinar se o gRNA ou a Cas9 tiveram algum efeito nesse resultado negativo para expressão do eGFP. Enfim, a combinação de fatores, como a instabilidade e/ou degradação do DNA linear, a barreira da zona pelúcida e a eficiência do guia, pode ter contribuído para o fracasso na inserção do gene.

Ajustes no protocolo experimental, como modificações na construção linear para evitar degradação do mesmo, podem ser necessários para melhorar a eficiência da inserção. Um exemplo disso foi demonstrado por Lim et al. (2023), que modificaram as extremidades da construção linear, criando um fragmento menos suscetível à degradação. Essa modificação resultou em uma maior integração no genoma da célula hospedeira. Incorporar estratégias semelhantes ao protocolo experimental atual poderia aumentar as chances de sucesso no processo de *knock-in* de genes em embriões bovinos, proporcionando uma inserção eficiente.

Uma abordagem alternativa que pode ser explorada para melhorar a eficiência da inserção do gene eGFP é a biobalística, também conhecida como bombardeamento de partículas. Essa técnica utiliza microprojéteis de ouro ou tungstênio revestidos com DNA, que são disparados nas células-alvo, permitindo a inserção do material genético. A biobalística tem sido aplicada com sucesso em diversas espécies, principalmente em vegetais, e pode ser vantajosa para superar barreiras físicas, como a zona pelúcida, que dificulta a entrada do DNA nos zigotos por eletroporação. Contudo, como qualquer metodologia, a biobalística apresenta desafios, como a variabilidade nos resultados e a viabilidade dos embriões após o bombardeamento, uma vez que essa técnica nunca foi relatada em embriões bovinos. Assim, testes futuros utilizando essa

abordagem serão cruciais para avaliar sua eficácia na inserção do gene eGFP, bem como para compará-la aos resultados obtidos pela eletroporação. A combinação dessas metodologias poderá oferecer maior flexibilidade e eficiência na inserção de genes em embriões bovinos, ampliando as possibilidades de manipulação genética e transgenia.

5.13 Teste de volume do reagente de lise em embriões

Embriões D8 controle foram utilizados para testar e otimizar os processos de lise e PCR, a ser realizada com os embriões eletroporados. A necessidade de otimização surgiu devido ao pequeno volume de amostra disponível, o que limitava a margem de erro e impedia a repetição dos experimentos. Assim, os embriões do grupo controle permitiram ajustar as condições experimentais de forma a garantir a precisão e confiabilidade dos resultados, essenciais para a execução bem-sucedida dos procedimentos com os embriões eletroporados.

Foi realizado um teste para otimizar o processo de lise dos embriões individuais, utilizando diferentes volumes de tampão de lise. Para isso, foram adicionados 6 μL (teste 1), 8 μL (teste 2) e 11 μL (teste 3) de tampão de lise aos embriões, que estavam armazenados em 4 μL de PBS 1X, gerando volumes finais de 10 μL , 12 μL e 15 μL , respectivamente. Após a lise, a solução obtida foi utilizada na reação de PCR, com o objetivo de amplificar o fragmento F5R5 (descrito anteriormente no tópico 5.3). Durante a PCR, foram testadas diferentes quantidades dos lisados: 5 μL e 3 μL do teste 1, 5 μL e 4 μL do teste 2, e 5 μL e 7 μL do teste 3, com a finalidade de avaliar qual condição geraria o melhor desempenho na amplificação do fragmento alvo.

Os testes 1 e 2 apresentaram amplificação, enquanto o teste 3 não mostrou resultado. Na figura 46, é possível observar que o teste 1 gerou maior amplificação do que o teste 2, embora não seja possível determinar, com precisão, qual volume utilizado no teste 1 obteve o melhor resultado. Diante disso, optamos pela utilização de 5 μL , que corresponde a metade do volume final do embrião lisado, em conformidade com experimentos descritos na literatura (Camargo et al., 2020), que utilizaram esse volume para PCR de embriões individuais.

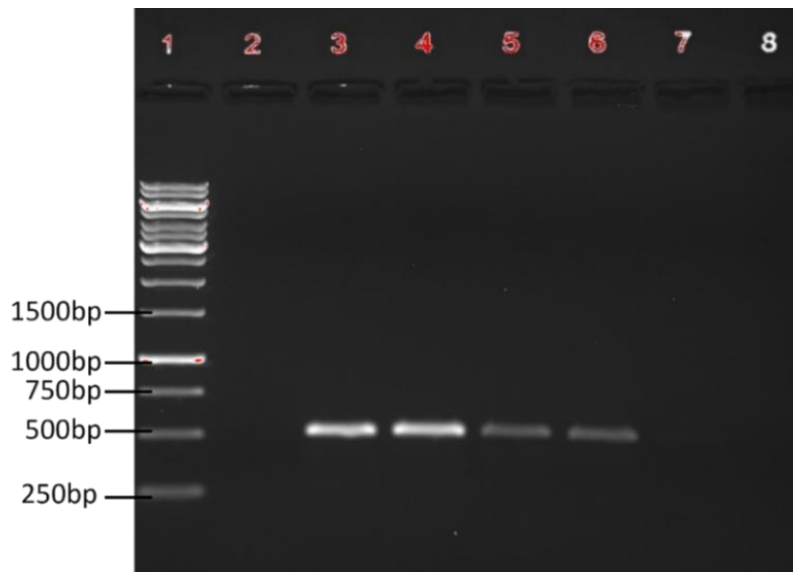


Figura 46. Análise da PCR do *amplicon* F5R5 utilizando diferentes volumes de lisado. Poço 1: Marcador 1Kb. Poço 2: Controle negativo da PCR. Poço 3: PCR utilizando 5 µL do teste 1. Poço 4: PCR utilizando 3 µL do teste 1. Poço 5: PCR utilizando 5 µL do teste 2. Poço 6: PCR utilizando 4 µL do teste 2. Poço 7: PCR utilizando 5 µL do teste 3. Poço 8: PCR utilizando 7 µL do teste 3.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.14 Análise de INDELs dos embriões eletroporados

Os embriões eletroporados foram armazenados individualmente e, posteriormente, submetidos ao processo de lise conforme os parâmetros descritos anteriormente. O fragmento F5R5 foi amplificado por PCR para avaliação. Nenhum embrião apresentou expressão do gene eGFP, então foi analisado a eficiência do guia na indução de INDELs. Dos 70 embriões que atingiram o estágio de blastocisto no dia 8 (D8), 68 foram analisados, pois dois tubos se romperam durante o transporte. A figura 49 apresenta os resultados da amplificação do fragmento F5R5 dos 68 embriões, dos quais 2 não apresentaram amplificação.

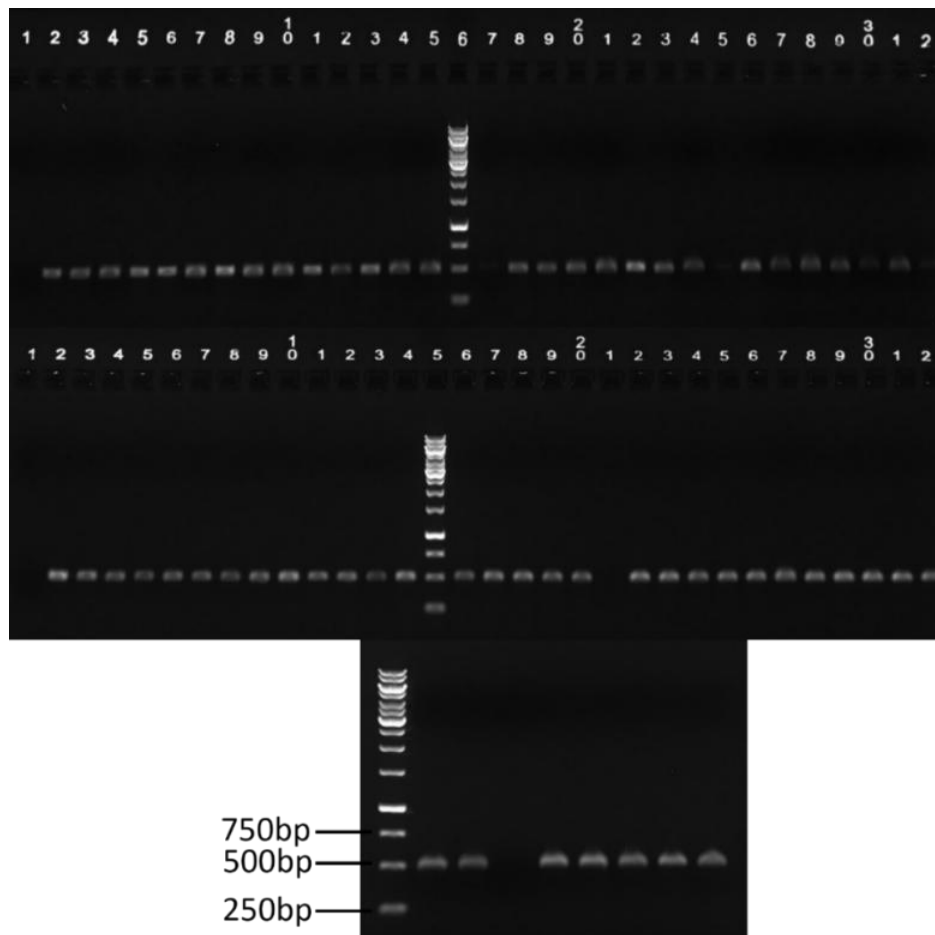


Figura 47. Análise da PCR do fragmento F5R5 de 68 embriões.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O sequenciamento Sanger foi realizado nos produtos de PCR com o objetivo de avaliar a eficiência do guia utilizado na eletroporação. A partir de 68 embriões analisados por PCR, 64 foram sequenciados com sucesso (figura 48). Desses, 60 mostraram evidências de INDELs, o que indica que o guia e o sistema CRISPR/Cas9 estavam efetivamente ativos, promovendo alto nível de edição no *locus* H11. A eficiência na indução de INDELs foi de 94%, conforme ilustrado na figura 49.

115

FILENAME	KO	R ²	INDEL	%	
					CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
31.ab1	23.6	0.87	25	72	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			0	764	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-2	78	CTGAGAAATCGGCTGAGTTA--TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-4	45	CTGAGAAATCGGCTGAGT---TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-29	41	CTGAGAAATCGG-----TCACCTCAGATTGGGAGGAATA
32.ab1	23.1	0.88	25	54	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			4	33	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			0	769	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-2	64	CTGAGAAATCGGCTGAGTTA--TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-4	44	CTGAGAAATCGGCTGAGT---TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-29	36	CTGAGAAATCGG-----TCACCTCAGATTGGGAGGAATA
33.ab1	13.4	0.87	0	866	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	94	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-4	39	CTGAGAAATCGGCTGAGT---TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
34.ab1	9.6	0.88	0	904	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	98	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
35.ab1	17.6	0.86	22	68	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			0	824	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	108	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
36.ab1	13.8	0.87	0	862	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	103	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-28	35	CTGAGAAATCGG-----GTACCTCAGATTGGGAGGAATA
37.ab1	100.0	0.04	1	1000	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			0	892	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	108	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
39.ab1	17.6	0.87	0	824	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	104	CTGAGAAATCGGCTGAGTTA--TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-4	36	CTGAGAAATCGGCTGAGTTA--GAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-28	36	CTGAGAAATCGG-----GTACCTCAGATTGGGAGGAATA
40.ab1	9.8	0.88	0	902	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	98	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
41.ab1	20.9	0.87	25	89	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			0	791	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-2	73	CTGAGAAATCGGCTGAGTTA--TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-29	47	CTGAGAAATCGG-----TCACCTCAGATTGGGAGGAATA
42.ab1	8.2	0.92	1	50	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			0	918	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-41	33	CTGAGAAATCGG-----GGGAGGAATA
43.ab1	14.2	0.87	0	858	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	107	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-28	35	CTGAGAAATCGG-----GTACCTCAGATTGGGAGGAATA
44.ab1	17.6	0.86	0	824	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	98	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-4	40	CTGAGAAATCGGCTGAGTTA--GAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-28	38	CTGAGAAATCGG-----GTACCTCAGATTGGGAGGAATA
45.ab1	10.1	0.87	0	900	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	101	CTGAGAAATCGGCTGAGTTA--TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			0	892	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
46.ab1	10.8	0.86	-1	108	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
47.ab1	100.0	0.05	1	1000	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
48.ab1	23.3	0.87	4	39	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			0	767	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	54	CTGAGAAATCGGCTGAGTTA--TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-2	56	CTGAGAAATCGGCTGAGTTA--TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-16	35	CTGAGAAATCGG-----AGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-29	49	CTGAGAAATCGG-----TCACCTCAGATTGGGAGGAATA
49.ab1	13.5	0.86	0	865	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	95	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-28	40	CTGAGAAATCGG-----GTACCTCAGATTGGGAGGAATA
50.ab1	4.0	0.91	1	40	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			0	960	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
51.ab1	10.1	0.87	0	899	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	101	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
52.ab1	14.2	0.87	0	858	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	107	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-28	35	CTGAGAAATCGG-----GTACCTCAGATTGGGAGGAATA
53.ab1	12.9	0.88	0	871	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	90	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-4	39	CTGAGAAATCGGCTGAGT---TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
54.ab1	24.8	0.86	25	77	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			0	752	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-2	81	CTGAGAAATCGGCTGAGTTA--TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-4	46	CTGAGAAATCGGCTGAGT---TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-29	45	CTGAGAAATCGG-----TCACCTCAGATTGGGAGGAATA
55.ab1	21.2	0.87	0	788	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	112	CTGAGAAATCGGCTGAGTTA--TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-2	50	CTGAGAAATCGGCTGAGTTA--TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-4	50	CTGAGAAATCGGCTGAGT---TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
56.ab1	20.4	0.86	22	65	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			0	795	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	105	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-28	35	CTGAGAAATCGG-----GTACCTCAGATTGGGAGGAATA
57.ab1	0.0	0.99	0	1000	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
58.ab1	54.6	0.50	2	260	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			1	121	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			0	454	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-4	72	CTGAGAAATCGGCTGAGT---TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-93	93	CTGAGAAATCGG-----ACCTCAGATTGGGAGGAATA
59.ab1	11.0	0.87	0	890	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	110	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
60.ab1	100.0	0.01	2	1000	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
61.ab1	11.5	0.86	0	885	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	80	CTGAGAAATCGGCTGAGTTA--TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-28	35	CTGAGAAATCGG-----GTACCTCAGATTGGGAGGAATA
62.ab1	18.3	0.87	0	817	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	98	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-4	50	CTGAGAAATCGGCTGAGTTA--GAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-28	35	CTGAGAAATCGG-----GTACCTCAGATTGGGAGGAATA
63.ab1	21.0	0.86	25	84	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			0	790	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-2	84	CTGAGAAATCGGCTGAGTTA--TCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-29	42	CTGAGAAATCGG-----TCACCTCAGATTGGGAGGAATA
64.ab1	10.1	0.87	0	899	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	101	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
65.ab1	18.2	0.86	22	59	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			0	818	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-1	91	CTGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTCGAGGAGCTTGAGATTGTGACCTCAGATTGGGAGGAATA
			-28	32	CTGAGAAATCGG-----GTACCTCAGATTGGGAGGAATA

Figura 48. Alinhamento do sequenciamento dos 64 embriões. A região em verde na parte superior do alinhamento indica a sequência reconhecida pelo gRNA Bi5, enquanto a sequência em vermelho destaca o sítio PAM. A primeira linha corresponde à sequência selvagem, usada como referência.

Fonte: Resultado gerado pelo Decodr (<https://decodr.org/>).

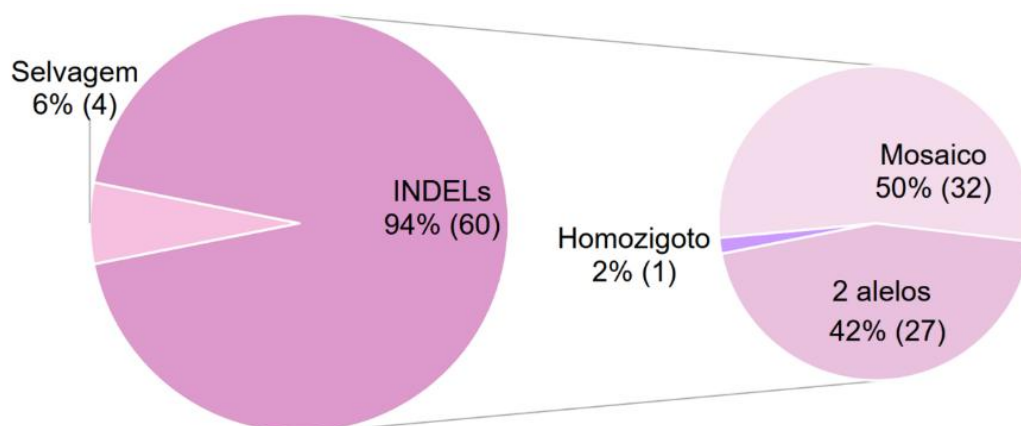


Figura 49. Análise da geração de INDELs dos 64 embriões sequenciados com sucesso.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre os embriões que apresentaram INDELs, 32 (53,3%) mostraram um padrão de mosaico, com edições distintas em mais de dois alelos. Isso é consistente com o fato de que a eletroporação foi realizada no zigoto de 1 célula, e a edição do gene pode ter ocorrido após a primeira divisão celular. Em um cenário de mosaico, diferentes células do embrião podem ter experimentado edições distintas, o que resulta em mais de dois alelos detectados no sequenciamento. Outros 27 (45%) embriões apresentaram INDELs em apenas um alelo, mas não foi possível determinar se esses embriões eram heterozigotos para todas as células do embrião ou se representavam algum grau de mosaicismo, com edição em apenas algumas células do embrião. Neste caso, é possível que uma célula tenha sido totalmente editada, enquanto outras não foram modificadas, gerando a detecção de dois alelos no sequenciamento (um alelo "normal" e outro com INDEL). Por fim, um embrião (1,66%) apresentou edição em homozigose, indicando que ambas as cópias do *locus* H11 foram editadas em todas as células do embrião de forma homogênea. A presença de edição em homozigose é um indicador de que o sistema CRISPR/Cas9 tem potencial para realizar a edição bialélica em todos os blastômeros do embrião editado.

Os resultados obtidos indicam que o guia Bi5 e a tecnologia CRISPR/Cas9 possuem um grande potencial para induzir edições no *locus* H11 de embriões bovinos. O elevado número de embriões com mosaicos e a presença de INDELs

em apenas um alelo sugerem que, embora a edição tenha ocorrido, sua distribuição não foi homogênea ou eficiente em todas as células do embrião. A identificação de edição em homozigose em um embrião é um resultado significativo, pois demonstra que o sistema CRISPR/Cas9 tem capacidade para gerar uma edição completa (bialélica) na região alvo em todas as células do embrião, embora com baixa eficiência. Esses resultados indicam a necessidade de ajustes no modelo experimental para aprimorar a eficiência e a uniformidade da edição.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, foi possível otimizar diversos aspectos críticos das técnicas de transfecção celular, essenciais para o sucesso da edição gênica em células bovinas. A escolha do tipo celular adequado, como as células MAC-T, mostrou-se fundamental para aumentar a eficiência da transfecção, principalmente em comparação com as células MDBK, que apresentaram uma eficiência consideravelmente mais baixa e uma alta taxa de mortalidade celular. A otimização do protocolo de transfecção para MAC-T, incluindo a redução da mortalidade celular por meio da adição de SFB ao meio de transfecção, contribuiu significativamente para melhorar a viabilidade das células e a expressão do gene eGFP, mesmo diante das dificuldades encontradas nos ensaios iniciais. Além disso, a seleção de gRNAs mais eficazes e ajustes no protocolo de T7E1 — como a redução da quantidade de enzima e o aumento do tempo de incubação — possibilitaram o uso mais racional dos recursos, sem comprometer a eficácia do processo.

Os resultados obtidos reforçam a importância de ajustes contínuos nas técnicas de transfecção, escolha de guias e tipos celulares para melhorar as taxas de sucesso na edição gênica de células bovinas, uma vez que esses parâmetros são cruciais para o êxito da edição gênica mediada por CRISPR. O uso do guia Bi5, por exemplo, apresentou um grande potencial para otimizar os resultados de edições futuras. Embora a inserção do gene eGFP tenha sido bem-sucedida, foi observada uma inserção inesperada de um fragmento de DNA satélite bovino, indicando a complexidade do reparo de quebras induzido pelo sistema CRISPR/Cas9. Esse evento, no entanto, não compromete a expressão do gene de interesse e oferece *insights* valiosos para futuras descobertas e otimizações do protocolo. Este trabalho estabelece uma base sólida para o desenvolvimento de estratégias de manipulação genética em células bovinas, com aplicações potenciais em estudos de transgenia e biotecnologia animal.

Os testes com os compostos SCR7, RS-1 e L755507 indicaram resultados promissores nos ensaios com células MAC-T, evidenciando o potencial desses compostos para otimizar a inserção do gene eGFP no *locus* H11. Embora o

SCR7 não tenha apresentado impacto relevante, os compostos RS-1 e L755507 demonstraram uma influência positiva significativa na inserção do gene, o que destaca seu grande potencial para otimizar o processo de *knock-in* de genes de interesse. Esses resultados são especialmente positivos, pois indicam que RS-1 e L755507 podem ser explorados como ferramentas eficazes para promover a recombinação por microhomologia e melhorar a eficiência da edição genômica. No entanto, a maior mortalidade celular associada ao L755507 sugere que ajustes nas condições experimentais, como concentrações e tempos de exposição, são necessários para maximizar a eficiência desses compostos enquanto minimizam os efeitos adversos. Esses achados ressaltam a relevância e o enorme potencial dos compostos RS-1 e L755507 no avanço das metodologias de edição genômica, destacando-os como promissores candidatos para aplicações futuras em projetos de modificação genética.

Os resultados obtidos apontam que o sistema CRISPR/Cas9, aliado ao guia Bi5 desenvolvido neste estudo, possui grande potencial para induzir edições no *locus* H11 de células e embriões bovinos. Embora tenha sido observada uma alta taxa de INDELS nos embriões editados, a edição foi predominantemente mosaica, o que é algo indesejado para se obter embriões com edição bialélica em todas as suas células. Isso indica que ajustes no protocolo experimental são necessários para melhorar a uniformidade e a eficiência da edição. A presença de edição em homozigose em um único embrião demonstra a capacidade da tecnologia de realizar edições completas, mas a otimização de parâmetros, como a modificação da construção linear e ajustes na entrega do guia e Cas9, será crucial para alcançar resultados mais consistentes e eficientes. O presente estudo evidencia a viabilidade da técnica e aponta direções importantes para futuras melhorias no desenvolvimento de estratégias de edição genética em genomas de elevada complexidade como o de mamíferos.

A baixa eficiência na introdução de grandes sequências de DNA em zigotos bovinos continua sendo um desafio significativo para a incorporação de variantes genéticas úteis em programas de melhoramento genético. Embora inserções não desejadas possam ser toleráveis em algumas aplicações de pesquisa, esse efeito colateral é inaceitável na geração de animais transgênicos,

onde a precisão na integração genética é essencial. Além disso, a ocorrência de inserções indesejadas representa obstáculos consideráveis para a aprovação regulatória envolvendo animais destinados à produção de alimentos, uma vez que a segurança e a previsibilidade do processo de edição genética são requisitos imprescindíveis para garantir a aceitação e o uso desses animais em setores agrícolas e alimentares.

Este trabalho se destaca, até onde temos conhecimento, como o primeiro no Brasil a utilizar a tecnologia CRISPR/Cas9 para edição gênica com o objetivo específico de inserir um gene exógeno (*knock-in*) em células bovinas. Essa abordagem representa um marco significativo no avanço do conhecimento científico nacional, combinando inovação tecnológica com potencial para aplicações biotecnológicas de grande relevância. Ao otimizar protocolos de transfecção e testar diferentes abordagens para melhorar a eficiência da inserção do gene eGFP, estabelecemos uma base sólida para futuras investigações sobre a aplicação de CRISPR/Cas9 em modelos bovinos. A combinação de estratégias inovadoras e a exploração de novas metodologias para o *knock-in* genético são passos importantes para o uso dessa ferramenta biotecnológica avançada, que tem o potencial de impulsionar o campo da biotecnologia animal e da engenharia genética. Apesar de desafios, como a inserção de fragmentos de DNA satélite, os dados obtidos até o momento reforçam a viabilidade e a promessa dessa tecnologia para futuras aplicações.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUCHINA, A.A., ZAYNITDINOVA, M.I., DEMCHENKO, A.G., EVTUSHENKO, N.A., LAVROV, A.V., SMIRNIKHINA, S.A. Bridging Gaps in HDR Improvement: The Role of MAD2L2, SCAI, and SCR7. *Int. J. Mol. Sci*, 24:6704, 2023.
- AUERBACH, C., ROBSON, J.M. Chemical production of mutations. *Nature* 157: 302, 1946.
- BAE S, KWEON J, KIM HS, KIM JS. Microhomology-based choice of Cas9 nuclease target sites. *Nat Methods* 11:705-6, 2014.
- BELFORT, M., ROBERTS, R.J. Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Res*, 25(17):3379-88, 1997.
- BISCHOFF, N., WIMBERGER, S., MARESCA, M., BRAKEBUSCH, C. Improving Precise CRISPR Genome Editing by Small Molecules: Is there a Magic Potion? *Cells*, 9:1318, 2020.
- BLOH, K., KANCHANA, R., BIALK, P., BANAS, K., ZHANG, Z., YOO, B. C., & KMIEC, E. B. Deconvolution of Complex DNA Repair (DECODR): Establishing a Novel Deconvolution Algorithm for Comprehensive Analysis of CRISPR-Edited Sanger Sequencing Data. *The CRISPR journal*, 4(1), 120–131, 2021.
- BRINSTER, R.L., CHEN, H.Y., TRUMBAUER, M., SENEAR, A.W., WARREN, R., PALMITER, R.D. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*, 27(1 Pt 2):223-31, 1981.
- CAMARGO, L.S.A., OWEN, J.R., VAN EENENNAAM, A.L., ROSS, P.J. Efficient One-Step Knockout by Electroporation of Ribonucleoproteins Into Zona-Intact Bovine Embryos. *Front Genet*, 11:570069, 2020.
- CAMARGO, L.S.A., SARAIVA, N.Z., OLIVEIRA, C.S., CARMICKLE, A., LEMOS, D.R., SIQUEIRA, L.G.B., DENICOL, A.C. Perspectives of gene editing for cattle farming in tropical and subtropical regions. *Anim Reprod*. 19(4):e20220108, 2023.
- CAPECCHI, M.R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet*, 6(6):507-12, 2005.
- CARROLL, D. Genome Editing: Past, Present, and Future. *Yale J Biol Med* 90: 653–659, 2017.
- CHARPENTIER, M., KHEDHER, A.H.Y., MENORET, S., BRION, A., LAMRIBET, K., DARDILLAC, E., BOIX, C., PERROUAULT, L., TESSON, L., GENY, S., DE CIAN, A., ITIER, J.M., ANEGON, I., LOPEZ, B., GIOVANNANGELI, C., CONCORDET, J.P. CtlP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. *Nat Commun*, 9(1):1133, 2018.
- CHEN, S., JIAO, Y., PAN, F., GUAN, Z., CHENG, S.H., SUN, D. Knock-In of a Large Reporter Gene via the High-Throughput Microinjection of the CRISPR/Cas9 System. *IEEE Trans Biomed Eng*, 69(8):2524-2532, 2022.
- CHU, V.T., WEBER, T., WEFERS, B., WURST, W., SANDER, S., RAJEWSKY, K., KÜHN, R. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 33(5):543-8, 2015.
- CONG, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, v. 339, p. 819-23, 2013.
- DOUDNA, J.A., CHARPENTIER, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 346(6213):1258096, 2014.

- DU, Y., LIU, Y., HU, J., PENG, X., LIU, Z. CRISPR/Cas9 systems: Delivery technologies and biomedical applications. *Asian J Pharm Sci*, 18(6):100854, 2023.
- EZAKI, R., ICHIKAWA, K., MATSUZAKI, M., & HORIUCHI, H. Targeted Knock-in of a Fluorescent Protein Gene into the Chicken Vasa Homolog Locus of Chicken Primordial Germ Cells using CRIS-PITCh Method. *The journal of poultry science*, 59(2), 182–190, 2022.
- FENG YQ, LORINCZ MC, FIERING S, GREALLY JM, BOUHASSIRA EE. Position effects are influenced by the orientation of a transgene with respect to flanking chromatin. *Mol Cell Biol*. 21:298-309, 2001.
- FICHTER, K. M., SETAYESH, T., & MALIK, P. Strategies for precise gene edits in mammalian cells. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 32, 536–552, 2023.
- FOX, R. Too Much Compromise in Today's CRISPR Pipelines. *CRISPR J*, 2(3):143-145, 2019.
- FRAITURE, M. A. et al. Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions. *BioMed research international*, v. 2015, p. 392872, 2015.
- FU, Y.W., DAI, X.Y., WANG, W.T., YANG, Z.X., ZHAO, J.J., ZHANG, J.P., WEN, W., ZHANG, F., OBERG, K.C., ZHANG, L., CHENG, T., ZHANG, X.B. Dynamics and competition of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins and AAV donor-mediated NHEJ, MMEJ and HDR editing. *Nucleic Acids Res*. 49(2):969-985, 2021.
- FUJIWARA Y, et al. Analysis of the flanking regions of the human alpha-lactalbumin gene responsible for position-effect independent expression. *Gene*. 305:71-8, 2003.
- GALLI, C., LAZZARI, G. 25th ANNIVERSARY OF CLONING BY SOMATIC-CELL NUCLEAR TRANSFER: Current applications of SCNT in advanced breeding and genome editing in livestock. *Reproduction*. 162(1):F23-F32, 2021.
- HAMMER, R.E., PURSEL, V.G., REXROAD, C.E.J. et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315:680–68, 1985.
- HASHIMOTO, M., TAKEMOTOM T. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Sci Rep*, 5:11315, 2015.
- HENNIG, S. L., OWEN, J. R., LIN, J. C., YOUNG, A. E., ROSS, P. J., VAN EENENNAAM, A. L., & MURRAY, J. D. Evaluation of mutation rates, mosaicism and off target mutations when injecting Cas9 mRNA or protein for genome editing of bovine embryos. *Scientific reports*, 10(1), 22309, 2020.
- HEYER, W.D., EHMTEN, K.T., LIU, J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 44:113-39, 2010.
- HILLARY, V. E., & CEASAR, S. A. A Review on the Mechanism and Applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 Proteins Utilized for Genome Engineering. *Molecular biotechnology*, 65(3), 311–325, 2023.
- HIPPENMEYER, S., YOUN, Y. H., MOON, H. M., MIYAMICHI, K., ZONG, H., WYNshaw-BORIS, A., & LUO, L. Genetic mosaic dissection of Lis1 and Ndel1 in neuronal migration. *Neuron*, 68(4), 695–709, 2010.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, v. 96 p. 23–28, 1990.
- IRION, S., LUCHE, H., GADUE, P., FEHLING, H. J., KENNEDY, M., & KELLER, G. Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*, 25(12), 1477–1482, 2007.
- ISHINO, Y., SHINAGAWA, H., MAKINO, K., AMEMURA, M., & NAKATA, A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme

- conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169 (12), 5429–5433, 1987.
- JASIN, M. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet*, 12(6):224-8, 1996.
- JAVAID, D., GANIE, S. Y., HAJAM, Y. A., & RESHI, M. S. CRISPR/Cas9 system: a reliable and facile genome editing tool in modern biology. *Molecular biology reports*, 49(12), 12133–12150, 2022.
- JINEK M., CHYLINSKI K., FONFARA I., HAUER M., DOUDNA J.A., CHARPENTIER E. A Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337:816–821, 2012.
- KANG, S.H., LEE, W.J., NA, J.H., LEE, J.H., KIM, Y.H., KIM, H., OH, Y., PARK, Y.H., JIN, Y.B., JUN, B.H., HUR, J.K., KIM, S.U., LEE, S.H. Prediction-based highly sensitive CRISPR off-target validation using target-specific DNA enrichment. *Nat Commun*. 11(1):3596, 2020.
- KHADEMI, Z., RAMEZANI, M., ALIBOLANDI, M., ZIRAK, M.R., SALMASI, Z., ABNOUS, K., TAGHDISI, S.M. A novel dual-targeting delivery system for specific delivery of CRISPR/Cas9 using hyaluronic acid, chitosan and AS1411. *Carbohydr Polym*, 292:119691, 2022.
- KHAN, F.A., ALI, A., WU, D., HUANG, C., ZULFIQAR, H., ALI, M., AHMED, B., YOUSAF, M.R., PUTRI, E.M., NEGARA, W., IMRAN, M., PANDUPUSPITASARI, N.S. Editing microbes to mitigate enteric methane emissions in livestock. *World J Microbiol Biotechnol*. 40(10):300, 2024.
- KIM, M., HWANG, Y., LIM, S., JANG, H.K., KIM, H.O. Advances in Nanoparticles as Non-Viral Vectors for Efficient Delivery of CRISPR/Cas9. *Pharmaceutics*, 16(9):1197, 2024.
- KIM, Y.G., CHA, J., CHANDRASEGARAN, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(3):1156-60, 1996.
- KREJCI, L., ALTMANNOVA, V., SPIREK, M., ZHAO, X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res*, 40(13):5795-818, 2012.
- KRUGLOVA, N., SHEPELEV, M. Increasing Gene Editing Efficiency via CRISPR/Cas9- or Cas12a-Mediated Knock-In in Primary Human T Cells. *Biomedicines*, 12(1):119, 2024.
- LAIBLE, G., WEI, J., WAGNER, S. Improving livestock for agriculture - technological progress from random transgenesis to precision genome editing heralds a new era. *Biotechnol J*, 10(1):109-20, 2015.
- LEAL, A.F., HERRENO-PACHÓN, A.M., BENINCORE-FLÓREZ, E., KARUNATHILAKA, A., TOMATSU, S. Current Strategies for Increasing Knock-In Efficiency in CRISPR/Cas9-Based Approaches. *Int J Mol Sci*. 25(5):2456, 2024.
- LEE, A.B.C., TAN, M.H., CHAI, C.L.L. Small-molecule enhancers of CRISPR-induced homology-directed repair in gene therapy: A medicinal chemist's perspective. *Drug Discov*, 27:2510–2525, 2022.
- LEE, K., & LEE, C. Generation of CRISPR-Cas9-mediated knockin mutant models in mice and MEFs for studies of polymorphism in clock genes. *Scientific reports*, 13(1), 8109, 2023.
- LEE, S.H., KIM, S., HUR, J.K. CRISPR and Target-Specific DNA Endonucleases for Efficient DNA Knock-in in Eukaryotic Genomes. *Mol Cells*. 41(11):943-952, 2018.
- LI, G., ZHANG, X., ZHONG, C., MO, J., QUAN, R., YANG, J., LIU, D., LI, Z., YANG, H., WU, Z. Small molecules enhance CRISPR/Cas9-mediated homology-directed genome editing in primary cells. *Sci Rep*, 7(1):8943, 2017.

- LI, P., ZHANG, L., LI, Z., XU, C., DU, X. AND WU, S. Cas12a mediates efficient and precise endogenous gene tagging via MITI: microhomology-dependent targeted integrations. *Cell. Mol. Life Sci.* 77(19), 3875–3884, 2019.
- LI, T., YANG, Y., QI, H., CUI, W., ZHANG, L., FU, X., HE, X., LIU, M., LI, P. F., & YU, T. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 36, 2023.
- LI, X., YANG, Y., BU, L., GUO, X., TANG, C., SONG, J., FAN, N., ZHAO, B., OUYANG, Z., LIU, Z., ZHAO, Y., YI, X., QUAN, L., LIU, S., YANG, Z., OUYANG, H., CHEN, Y. E., WANG, Z., & LAI, L. Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing. *Cell research*, 24(4), 501–504, 2014.
- LI, Y. S., MENG, R. R., CHEN, X., SHANG, C. L., LI, H. B., ZHANG, T. J., LONG, H. Y., LI, H. Q., WANG, Y. J., & WANG, F. C. Generation of H11-albumin-rtTA Transgenic Mice: A Tool for Inducible Gene Expression in the Liver. *G3 (Bethesda, Md.)*, 9(2), 591–599, 2019.
- LIM, S., YOCUM, R.R., SILVER, P.A., WAY, J.C. High spontaneous integration rates of end-modified linear DNAs upon mammalian cell transfection. *Sci Rep*, 13(1):6835, 2023.
- LIN, J.C., VAN EENENNAAM, A.L. Electroporation-Mediated Genome Editing of Livestock Zygotes. *Front Genet*, 12:648482, 2021.
- LINO, C.A., HARPER, J.C., CARNEY, J.P., TIMLIN, J.A. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv*, 25(1):1234-1257, 2018.
- MA Y., YU L., PAN S., GAO S., CHEN W., ET AL. CRISPR/Cas9-mediated targeting of the Rosa26 locus produces Cre reporter rat strains for monitoring Cre-loxP-mediated lineage tracing. *FEBS J.* 284: 3262–3277, 2017.
- MADEIRA, F., MADHUSOODANAN, N., LEE, J., EUSEBI, A., NIEWIELSKA, A., TIVEY, A.R.N., LOPEZ, R., BUTCHER, S. The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Research*, 2024.
- MARUYAMA, T., DOUGAN, S.K., TRUTTMANN, M.C., BILATE, A.M., INGRAM, J.R., PLOEGH, H.L. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, 33(5):538-42, 2015.
- MARRAFFINI, L. A., & SONTHEIMER, E. J. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, 463(7280), 568–571, 2010.
- MELO, E. et al. Isolation of transfected fibroblast clones for use in nuclear transfer and transgene detection in cattle embryos. *Genet Mol Res*, v. 4, p. 812-21, 2005.
- MELO, E.O., CANAVESSI, A.M.O., FRANCO, M.M., RUMPF, R. Animal transgenesis: state of the art and applications. *J Appl Genet* 48: 47–61, 2007.
- MIAO, D., GIASSETTI, M.I., CICCARELLI, M., LOPEZ-BILADEAU, B., OATLEY, J.M. Simplified pipelines for genetic engineering of mammalian embryos by CRISPR-Cas9 electroporation†. *Biol Reprod.* 101(1):177-187, 2019.
- NAKADE S, et al. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun.* 5:5560, 2014.
- NAMULA, Z., WITTAYARAT, M., HIRATA, M., HIRANO, T., NGUYEN, N.T., LE, Q.A., FAHRUDIN, M., TANIHARA, F., OTOI, T. Genome mutation after the introduction of the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system into bovine putative zygotes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 55(8):598-603, 2019.

- OLIVEIRA, R.R., CARVALHO, D.M., LISAUSKAS, S., MELLO, E., VIANNA, G.R., DODE, M.A., RUMPF, R., ARAGÃO, F.J., RECH, E.L. Effectiveness of liposomes to transfect livestock fibroblasts. *Genet Mol Res*, 4(2):185-96, 2005.
- OSORIO JS, BIONAZ M. Plasmid transfection in bovine cells: Optimization using a realtime monitoring of green fluorescent protein and effect on gene reporter assay. *Gene*. 626:200-208, 2017.
- OWEN, J.R., HENNIG, S.L., MCNABB, B.R. et al. One-step generation of a targeted knock-in calf using the CRISPR-Cas9 system in bovine zygotes. *BMC Genomics* 22, 118, 2021.
- PARK, C.S., HABIB, O., LEE, Y., HUR, J.K. Applications of CRISPR technologies to the development of gene and cell therapy. *BMB Rep*. 57(1):2-11, 2024.
- PENNISI, E. The CRISPR craze. *Science*, 341(6148):833-6, 2013.
- PEREZ-PINERA, P., OUSTEROUT D.G., GERSBACH, C.A. Advances in targeted genome editing. *Curr Opin Chem Biol*, 16(3-4):268-77, 2012.
- PETERSEN, B. Basics of genome editing technology and its application in livestock species. *Reprod Domest Anim*, 52 Suppl 3:4-13, 2017.
- PINDER, J., SALSAMAN, J., DELLAIRE, G. Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucleic Acids Res*, 43(19):9379-92, 2015.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2024. <https://www.R-project.org/>.
- ROTHSTEIN, R.J. One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* 101: 202–211, 1983.
- RUAN, J., LI, H., XU, K., WU, T., WEI, J., ZHOU, R., LIU, Z., MU, Y., YANG, S., OUYANG, H., CHEN-TSAI, R. Y., & LI, K. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated transgene knockin at the H11 locus in pigs. *Scientific reports*, 5, 14253, 2015.
- RUAN, J., XU, J., CHEN-TSAI, R.Y., LI, K. Genome editing in livestock: Are we ready for a revolution in animal breeding industry? *Transgenic Res*, 26(6):715-726, 2017.
- RYU, S.M., HUR, J.W., KIM, K. Evolution of CRISPR towards accurate and efficient mammal genome engineering. *BMB Rep*, 52(8):475-481, 2019.
- SADELAIN, M., PAPAPETROU, E.P., BUSHMAN, F.D. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nat Rev Cancer*. 12(1):51-8. doi: 10.1038/nrc3179. PMID: 22129804, 2011.
- SAKUMA T, NAKADE S, SAKANE Y, SUZUKI KT, YAMAMOTO T. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nat Protoc*. 11:118-33, 2016.
- SCHERER, S., DAVIS, R.W. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4951–4955, 1979.
- SEGAL, D.J., MECKLER, J.F. Genome engineering at the dawn of the golden age. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 14:135-58, 2013.
- SFEIR, A., SYMINGTON, L.S. Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? *Trends Biochem Sci*, 40(11):701-714, 2015.
- SHAMS, F., BAYAT, H., MOHAMMADIAN, O., MAHBOUDI, S., VAHIDNEZHAD, H., SOOSANABADI, M., RAHIMPOUR, A. Advance trends in targeting homology-directed repair for accurate gene editing: An inclusive review of small molecules and modified CRISPR-Cas9 systems. *Bioimpacts*, 12:371–391, 2022.

- SHIN, J.H., JUNG, S., RAMAKRISHNA, S., KIM, H.H. AND LEE, J. In vivo gene correction with targeted sequence substitution through microhomology-mediated end joining. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 502, 116–122, 2018.
- SILVA, G., POIROT, L., GALETTO, R., SMITH, J., MONTOYA, G., DUCHATEAU, P., PÂQUES, F. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Curr Gene Ther*, 11(1):11-27, 2011.
- SINGH, P., SCHIMENTI, J.C., BOLCUN-FILAS, E. A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics*, 199(1):1-15, 2015.
- SMITHIES, O., GREGG, R.G., BOGGS, S.S., KORALEWSKI, M.A., KUCHERLAPATI, R.S. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 317: 230–234, 1985.
- SONG, J., YANG, D., XU, J., ZHU, T., CHEN, Y.E., ZHANG, J. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nat Commun*, 7:10548, 2016.
- SUN, N., ZHAO, H. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnol Bioeng*, 110(7):1811-21, 2013.
- ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ, E., PLOHL, M. Satellite DNAs-From Localized to Highly Dispersed Genome Components. *Genes (Basel)*, 14(3):742, 2023.
- TASIC, B., HIPPENMEYER, S., WANG, C., GAMBOA, M., ZONG, H., CHEN-TSAI, Y., LUO, L. Site-specific integrase-mediated transgenesis in mice via pronuclear injection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(19):7902-7, 2011.
- TANG, Q., LIU, J., JIANG, Y., ZHANG, M., MAO, L., WANG, M. Cell-Selective Messenger RNA Delivery and CRISPR/Cas9 Genome Editing by Modulating the Interface of Phenylboronic Acid-Derived Lipid Nanoparticles and Cellular Surface Sialic Acid. *ACS Appl Mater Interfaces*, 11(50):46585-46590, 2019.
- THOMAS, K.R., FOLGER, K.R., CAPECCHI, M.R. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* 44: 419–428, 1986.
- VAN VU, T., THI HAI DOAN, D., KIM, J., ET AL. CRISPR/Cas-based precision genome editing via microhomology-mediated end joining. *Plant Biotechnol J.* 19(2):230-239, 2021.
- VON GROLL, A., LEVIN, Y., BARBOSA, M.C., RAVAZZOLO, A.P. Linear DNA low efficiency transfection by liposome can be improved by the use of cationic lipid as charge neutralizer. *Biotechnol Prog*, 22(4):1220-4, 2006.
- VOUILLLOT, L., THELIE, A., POLLET, N. Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3 (Bethesda)*, v. 5, p. 407-15, 2015.
- YAMASHITA, M.S., MELO, E.O. Animal Transgenesis and Cloning: Combined Development and Future Perspectives. *Methods Mol Biol.* 2647:121-149, 2023.
- YANG, X., TANG, Q., JIANG, Y., ZHANG, M., WANG, M., MAO, L. Nanoscale ATP-Responsive Zeolitic Imidazole Framework-90 as a General Platform for Cytosolic Protein Delivery and Genome Editing. *J Am Chem Soc*, 141(9):3782-3786, 2019.
- YANEZ, R.J., PORTER, A.C. A chromosomal position effect on gene targeting in human cells. *Nucleic Acids Res.* 30:4892-901, 2002.
- YAO, X., et al. CRISPR/Cas9 - mediated precise targeted integration in vivo using a double cut donor with short homology arms. *EBioMedicine*, 20, 19–26, 2017.
- YAO, X., LYU, P., YOO, K., YADAV, M.K., SINGH, R., ATALA, A., LU, B. Engineered extracellular vesicles as versatile ribonucleoprotein delivery vehicles for efficient and safe CRISPR genome editing. *J Extracell Vesicles*, 10(5):e12076, 2021.

- YIP, B.H. Recent Advances in CRISPR/Cas9 Delivery Strategies. *Biomolecules*, 10(6):839, 2020.
- YU, C., LIU, Y., MA, T., LIU, K., XU, S., ZHANG, Y., LIU, H., LA RUSSA, M., XIE, M., DING, S., QI, L.S. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 16(2):142-7, 2015.
- WANG, D., ZHANG, F., GAO, G. CRISPR-Based Therapeutic Genome Editing: Strategies and In Vivo Delivery by AAV Vectors. *Cell*, 181(1):136-150, 2020.
- WANG, S., QU, Z., HUANG, Q., ET AL. Application of Gene Editing Technology in Resistance Breeding of Livestock. *Life (Basel)*. 12(7):1070, 2022.
- WANG, Y., SHAHI, P.K., XIE, R., ZHANG, H., ABDEEN, A.A., YODSANIT, N., MA, Z., SAHA, K., PATTNAIK, B.R., GONG, S. A pH-responsive silica-metal-organic framework hybrid nanoparticle for the delivery of hydrophilic drugs, nucleic acids, and CRISPR-Cas9 genome-editing machineries. *J Control Release*, 324:194-203, 2020.
- WU, Y., ZHENG, J., ZENG, Q. *et al.* Light-responsive charge-reversal nanovector for high-efficiency *in vivo* CRISPR/Cas9 gene editing with controllable location and time. *Nano Res.* 13, 2399–2406, 2020.
- ZAKRZEWSKA, M., & BURMISTRZ, M. Mechanisms regulating the CRISPR-Cas systems. *Frontiers in microbiology*, 14, 1060337, 2023.
- ZHANG, X. Development of CRISPR-Mediated Nucleic Acid Detection Technologies and Their Applications in the Livestock Industry. *Genes*, 13 (11):2007, 2022.
- ZHANG, X.H., TEE, L.Y., WANG, X.G., HUANG, Q.S., YANG, S.H. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol Ther Nucleic Acids*. 4(11):e264, 2015.
- ZHENG, N., LI, L., WANG, X. Molecular mechanisms, off-target activities, and clinical potentials of genome editing systems. *Clin Transl Med*, 10(1):412-426, 2020.
- ZHU, F., GAMBOA, M., FARRUGGIO, A. P., HIPPENMEYER, S., TASIC, B., SCHÜLE, B., CHEN-TSAI, Y., & CALOS, M. P. DICE, an efficient system for iterative genomic editing in human pluripotent stem cells. *Nucleic acids research*, 42(5), e34, 2014.
- ZHUO, C., KONG, H., YI, K., CHI, C.W., ZHANG, J., CHEN, R., et al. Magnetic-Activated Nanosystem with Liver-Specific CRISPR Nonviral Vector to Achieve Spatiotemporal Liver Genome Editing as Hepatitis B Therapeutics. *Adv Funct Mater*, 33(7), 2023.

8 APÊNDICES

8.1 Tabela de primers

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5' - 3')
H11-GFP FWD	AATATTGCATCGTACGCGTACGTGTTT GGATATCGAGAAATCGGCTGAGTTAAGTTAA CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCA GAGCGC
H11-GFP REV	AATATTGCATCGTACGCGTACGTGTTT GGATATCACAAATCTCAAGCTCCTCGAGTTA ACTGAGAGACACAAAAAATTCCAACACACTA TTGC
gRNA Bi1 FWD	CACCGGTTCTTGGAAGTATAGGGCA
gRNA Bi1 REV	AAACTGCCCTATACTTCCAAGAACC
gRNA Bi1b FWD	CACCGTTCTTGGAAGTATAGGGCA
gRNA Bi1b REV	AAACTGCCCTATACTTCCAAGAAC
gRNA Bi2 FWD	AAACCATGCTCAATCCACAAAG
gRNA Bi2 REV	CACCCTTTGTGGATTGAGCATG
gRNA Bi3 FWD	CACCGGCAGCTCCAGGTTTAT
gRNA Bi3 REV	AAACATAAACCTGGAGCTGCC
gRNA Bi4 FWD	CACCGGGCAGGGTGGGCAGCTCC
gRNA Bi4 REV	AAACGGAGCTGCCCACCCTGCCC
gRNA Bi5 FWD	CACCAAATCGGCTGAGTTAAGTCG
gRNA Bi5 REV	AAACCGACTTAACTCAGCCGATTT
gRNA Bi6 FWD	CACCTCACTTGTGCCGAACCAGAA

gRNA Bi6 REV	AAACTTCTGGTTCGGCACAAGTGA
gRNA Bi7 FWD	CACCTGCCCCAGTAAACGTGACAA
gRNA Bi7 REV	AAACTTGTCACGTTTACTGGGGCA
gRNA BMC FWD	CACCTAGCCATAAGACTACCTAT
gRNA BMC REV	AAACATAGGTAGTCTTATGGCTA
pX330E seq FWD2	AACGCCAGCAACGCGGCC
Bi H11 FWD	CCCATCTCACCAGCTACTGGC
Bi H11 REV	CTTCCCTCAAGACTCTGGTGCC
Bi H11 FWD2	CACTCAGGTCCCACTGCAGG
Bi H11 REV2	GACCATTCTGGTTCGGCACAAGTG
Bi H11 FWD3	CATGTCATCATGCTCTCCTTAC
Bi H11 REV3	GCCGATTTCTCAGTTCTTATCC
Bi H11 FWD4	ATGGAATTTGATCCAGGTTTCT
Bi H11 REV4	TATGGTCCTTTGTCACGTTTAC
Bi H11 FWD5	AGGGCTTATTTCTGAAGTTGAC
Bi H11 REV5	CTGTGTTCTTACTTCTCCGTTC
Bi H11 FWD6	CTTTGCTTGGTGCCTACA
Bi H11 REV6	CTCAAGCTCCTCGACTTAAC
Bi H11 FWD7	GCTTTGCCCTTTGCTTGGTG
Bi H11 REV7	GGCCCTCAACTCTAGTTTGACTTC
Bi H11 FWD8	GCATTTAGCTTCTGCTGTG
Bi H11 REV8	GTCAACAGTTGGCTTCCT

Bi H11 FWD10	GTCGAGGAGCTTGAGATTTG
Bi H11 REV10	GCCTCTTCAGTAGGTTCTTG
GFP H11 FWD	CAACAGCCACAACGTCTAT
qPCR H11-GFP FWD1	GAGGGCCCTAAATGGATAAG
qPCR H11-GFP REV1	CCAGTACACGACATCACTTT
qPCR H11-GFP FWD2	GCCCTGGCTCACAAATAC
qPCR H11-GFP REV2	CCCAATCTGAGGTGACAAAT
qPCR H11-GFP out FWD	TTGTGCCGAACCAGAATG
qPCR H11-GFP out REV	CCAGAATAACTATGGCCTTGA
qPCR H11 C+ FWD	CCTCAACTTCCACGAGATTC
qPCR H11 C+ FWD	GAAACTAAGAGCCAGCTATGG

8.2 Meios

Meio Dulbecco's Minimum Eagle Medium (DMEM) MÃE

Preparo do meio mãe de DMEM para 1 litro:

- DMEM em pó (baixa glicose), adicione 1 litro de água MilliQ.
- Adicionar 3,7 g/L de bicarbonato de sódio.
- Ajustar pH para 6,9-7,0 e filtrar.

Meio DMEM USO

Preparo do meio DMEM USO para 200 mL:

- DMEM MÃE: 180 mL.
- Soro Fetal Bovino (SFB): 10%.
- Adicionar 290 mg/L de L-Glutamina (2 mM), 110 mg/L de piruvato de sódio, 4500 mg/mL de glicose, 100 ui/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina. Filtrar.

Meio DMEM-MACT

Preparo do meio DMEM-MACT para 200 mL:

- DMEM MÃE: 180 mL.
- SFB: 10%.
- Adicionar 290 mg/L de L-Glutamina (2 mM), 110 mg/L de piruvato de sódio, 4500 mg/mL de glicose, 100 ui/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 5 µg/mL de insulina. Filtrar.

Meio de Coleta de Oócitos (OCM)

Preparo da base do OCM (sem suplementos) para 1 litro:

- TCM-199 em pó, adicione 1 litro de água MilliQ.
- Adicione 350 mg de bicarbonato de sódio e 2380 mg de HEPES.
- Ajustar o pH para 7,4–7,5 e filtrar
- Em 1 litro de OCM sem suplementos, adicionar 600 µL de heparina (4mg/mL), 20 mL de Soro Bovino Adulto (ABS) e 20 mL de Penicilina-Estreptomicina.

Meio de Maturação de Oócitos (OMM)

Para preparar 100 mL de Meio de Maturação de Oócitos (OMM), dissolva os seguintes ingredientes em TCM 199:

- TCM 199 com sais de Earl: 88 mL
- SFB: 10 mL (10%)
- 100 µL gentamicina (50 mg/mL), 125 µL de FSH – Folltropin (20 µg/µL), 1 mL de piruvato de sódio (2,2 mg/mL), 1 mL de L-Glutamina ou Glutamax (100x) e 200 µL de estradiol (1 mg/mL). Filtrar.

HEPES-TL (solução base)

Para preparar 1 litro da solução base, dissolver os seguintes reagentes em 500 mL de água MilliQ:

- 6669 mg/L (114 mM) de cloreto de sódio (NaCl), 238,72 mg/L (3,2 mM) de cloreto de potássio (KCl), 168 mg/L (2 mM) de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), 48 mg/L (0,4 mM) de fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH₂PO₄.H₂O), 1,416 mg/L (10 mM) de lactato de sódio (727 g/L), 293,8 mg/L (2 mM) de cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂.2H₂O), 101,65 mg/L (0,5 mM) de cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl₂.6H₂O) e 2384 mg/L (10 mM) de HEPES.
- Ajustar osmolaridade para 260-270 e pH para 7,3-7,4.
- Ajustar volume para 1 L e filtrar.

HEPES-TALP

Para preparar HEPES-TALP, adicione em 500 mL de HEPES-TL:

- 1,5 g de BSA, 5 mL de piruvato de sódio (2,2 mg/mL) e 75 µL de gentamicina (50 mg/mL). Filtrar.

IVF-TL

Para preparar 1 litro da solução base de IVF-TL, dissolver os seguintes reagentes em 500 mL de água MilliQ:

- 6669 mg/L (114 mM) de cloreto de sódio (NaCl), 238,72 mg/L (3,2 mM) de cloreto de potássio (KCl), 2100 mg/L (25 mM) de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), 55,2 mg/L (0,4 mM) de fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH₂PO₄.H₂O), 1,416 mg/L (10 mM) de lactato de sódio (727 g/L), 222,2 g/L (2 mM) de cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂.2H₂O) e 101,65 mg/L (0,5 mM) de cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl.6H₂O).
- Ajustar osmolaridade para 260-270 e pH para 7,3-7,4.
- Ajustar volume para 1 L e filtrar.

IVF-TALP

Para preparar 100 mL de IVF-TALP, adicionar em 100 mL de IVF-TL:

- 0,6 g de EFAF BSA, 1 mL de piruvato de sódio (2,2 mg/mL), 20 µL de gentamicina (50 mg/mL) e 500 µL de heparina (4 mg/mL). Filtrar.

SOF-BEI

Para preparar 1L da solução base de SOF-BEI, dissolver os seguintes ingredientes em 700 mL de água MilliQ:

- 2106,15 mg/L (25,07 mM) de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), 6294 mg/L (107,7 mM) de cloreto de sódio (NaCl), 533,8 mg/L (7,16 mM) de cloreto

de potássio (KCl), 161,95 mg/L (1,19 mM) de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), 99,6 mg/L (0,49 mM) de cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 172 mg/L (1,17 mM) de cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 5,3 mM de lactato de sódio (727 g/L).

- Ajustar osmolaridade para 260-270 e pH para 7,3-7,4.
- Ajustar o volume para 1 L e filtrar.

SOF-BEII

Para preparar 100 mL da solução uso de SOF-BEII, dissolver os seguintes reagentes em 100 mL de SOF-BEI:

- 0,4 g de EFAF BSA, 500 μL de glutamax (100X), 2 mL piruvato de sódio, 1 mL de myo-inositol (100X), 1 mL de citrato de sódio (100X), 1 mL de aminoácidos não essenciais (100X), 2 mL de aminoácidos essenciais (50X) e 50 μL de gentamicina (50mg/mL).
- Filtrar.

8.3 Capítulo livro



Chapter 6

Animal Transgenesis and Cloning: Combined Development and Future Perspectives

Melissa S. Yamashita  and Eduardo O. Melo 

Abstract

The revolution in animal transgenesis began in 1981 and continues to become more efficient, cheaper, and faster to perform. New genome editing technologies, especially CRISPR-Cas9, are leading to a new era of genetically modified or edited organisms. Some researchers advocate this new era as the time of synthetic biology or re-engineering. Nonetheless, we are witnessing advances in high-throughput sequencing, artificial DNA synthesis, and design of artificial genomes at a fast pace. These advances in symbiosis with animal cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT) allow the development of improved livestock, animal models of human disease, and heterologous production of bioproducts for medical applications. In the context of genetic engineering, SCNT remains a useful technology to generate animals from genetically modified cells. This chapter addresses these fast-developing technologies driving this biotechnological revolution and their association with animal cloning technology.

Key words Genetic engineering, Animal cloning, Animal transgenesis, Synthetic biology, Genome editing

1 Livestock Genomes as the Context for Transgenesis

The detailed knowledge about the structure of our genomes [1] indicates that transgenesis may be a natural, ancient, and more common process than we would expect. To begin our discussion, we must revisit the concept of a transgene: “A transgene is a gene or genetic material that has been transferred naturally or by genetic engineering technologies, from one organism to another.” Therefore, transgenesis (TG) is a form of horizontal gene transfer between evolutionary distant species. In light of this concept, let us look at a few observations: dissociation and association analysis by DNA hybridization show a large fraction of our genome is composed of repetitive DNA [2]. Genome-wide sequencing of several species shows that more than two-thirds of their genomes contain noncoding elements [1, 3]. This noncoding DNA is mostly composed of repetitive sequences, such as transposable elements

(TE) or transposons [3, 4]. Although the origin of TE is not completely known, due to their similarity to sequences found in virus genomes, they are believed to have originated from the natural insertion of retroviral DNA into the genome of our ancestors [5]. Other ways of incorporating DNA sequences from species distant in the evolutionary tree of life (named horizontal gene transfer), which is nothing more than a natural form of TG, come from the symbiosis between eukaryotic and prokaryotic cells. Further, organelles (e.g., mitochondria and chloroplasts) have probably evolved from symbiotic interactions between eubacteria and primitive eukaryotic cells, with the transfer of bacteria genes to the eukaryotic genome [6, 7]. We now acknowledge that more than half of the genes encoding mitochondrial and chloroplast proteins are located in the nuclear genome of animals and plants. These nuclear–cytoplasmic interactions are essential for organelle viability and organism survival [7].

Another known source of horizontal gene transfer is parasitism. *Agrobacteria* are parasitic prokaryotes that reside exclusively within plant roots. Studies have proven the transfer of genes from the genome of *agrobacteria* to plant chromosomes [8]. The most surprising fact is that these viral and bacterial genetic remnants introduced in plant genomes remained active and play roles in the metabolism of host cells, some of which appear to be essential for plant development and survival [8, 9]. Therefore, TG is a natural process and essential to organism survival throughout evolution. For instance, researchers identified *Agrobacterium rhizogenes* genes naturally transferred to the sweet potato (*Ipomea potatoes*) genome [9], which are transcriptionally active in the roots of this tuber.

According to the definition of TG, the sweet potato is a natural TG product and has been consumed by humans for over thousands of years. This observation corroborates with discoveries made by Barbara McClintock, who in the 1950s observed that more than 80% of domestic maize genome is composed of TE [10], with a probable viral origin [11]. This puts corn in the class of natural TG foods that have been consumed extensively over several millennia, well before the introduction of *Bacillus thuringiensis* corn (Bt-Corn) in our TG-crop menu in the 1990s [12]. Horizontal gene transfer is not documented only in bacteria, archaea, and plants, but also in placental mammals. The placenta evolved in the ancestors of mammals about 150 million years ago. It begins to form by the segregation of trophoblast and inner cell mass cells in the blastocyst-stage embryo. Trophoblast cells proliferate extensively and form the syncytiotrophoblast through an intense process of cell fusion. This cellular phenomenon is intermediated by cell surface proteins, named syncytins, which are protein-coding genes from endogenous retroviruses. These sequences were systematically incorporated into the genome during the evolution of placental

mammals [13–15]. Therefore, the evolution of eutherian species (including humans) depended upon natural TG events.

Increasing genomic data support a scenario in which our genome behaves as an “ecosystem,” in which several transgenic sequences combine over time to form novel genomes in evolving species [11]. These facts challenge the fiercest and most compelling arguments against the human consumption of TG-derived foods because these arguments lack support of scientific data. If most of what we eat is TG (if not all), what kind of threats could man-made TG food provoke? If society had more access to the data we discussed above, would it be so averse to the consumption of TG food? We should have a more critical and realistic view of our positions, especially those with scientific knowledge, before condemning any technology.

Since the evolution of DNA recombinant technology in the 1980s, we started to use our intelligence to execute horizontal gene transfer in a designed manner [16]. Therefore, we bring to this review some background on directed horizontal gene transfer applied to livestock genomes, with the intent to produce biomolecules in the so-called bioreactors (or biofactories), to improve animal production traits, to increase disease resistance, among other applications. As described below, we are witnessing an astonishing and quick development in the biotechnological toolbox for genome engineering, which is an inescapable process for our cultural and scientific evolution.

2 The Dawn of Recombinant DNA Technology and Animal Transgenesis

Restriction endonucleases isolated from several species of eubacteria were the first genetic scissors, which are enzymes that perform double-strand cleavage at specific DNA palindromic sequences [17, 18]. The phenomena of Lambda phage growth restriction presented by distinct strains of *Escherichia coli* were characterized in the 1950s [19, 20]. The identity of the “restriction factor” became clear with the characterization of enzymes responsible for bacterial defense against DNA invasions from Lambda bacteriophages [21, 22], collectively named restriction enzymes. Therefore, it took more than 10 years from the discovery of restriction enzymes to its first biotechnological application. However, the most interesting fact is the origin and evolution of restriction enzymes, which remains attributed to several events of horizontal gene transfer (or natural TG) among distinct prokaryotes species [23, 24]. The possibility of in vitro DNA manipulation made possible the construction of engineered plasmid vectors and transformation of *E. coli* with these synthetic auto-replicative DNA elements [25]. This event bookmarked the dawn of genetic engineering field. Soon after, Genentech produced the first

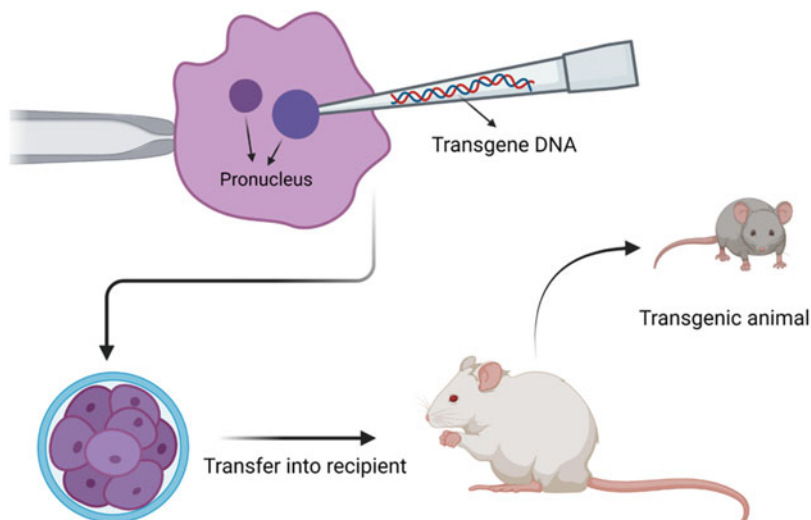


Fig. 1 Production of genetic-modified animals by pronuclear microinjection

biotechnological product in bacteria, which was the human somatostatin hormone [26]. This milestone opened the way for the company to clone and produce recombinant human insulin in *E. coli*, the first human-made TG product to reach the market [27]. The first biotechnological product targeted for the livestock market, which was developed by a joint venture between Genentech and Monsanto, was the recombinant bovine somatotrophin (BST or bovine growth hormone) also produced in *E. coli* [28, 29]. BST remains commercially available and holds intense demand to increase milk production in dairy cattle [30]. However, the first genetically modified (GM) animal was a mouse produced by transgene delivery into pronuclear stage embryos (i.e., pronuclear microinjection), which was pioneered by three independent research groups [31–33]. Since then, GM mice produced by pronuclear microinjection (Fig. 1) became a flagship of gene transfer in laboratory animals [34, 35]. Soon after, GM livestock animals (i.e., rabbits, pigs, and sheep) were described in a single work [36]. However, pronuclear microinjection is inefficient in large livestock animals such as cattle [37] and does not support gene targeting by DNA homologous recombination [34]. More than one decade later, the first cloned animal (sheep) by somatic cell nuclear transfer (SCNT) surged as an alternative to pronuclear microinjection [38, 39]. This promise was soon fulfilled by the report of transgenic sheep carrying the clotting factor IX protein gene driven by a mammary gland-specific promoter [40]. SCNT was appealing for transgenesis because primary somatic cells could be isolated, transfected with transgenes, and selected for transgene expression level and copy number before SCNT [41] (Fig. 2). Since transgene integration occurs randomly, TG cells generated by such means

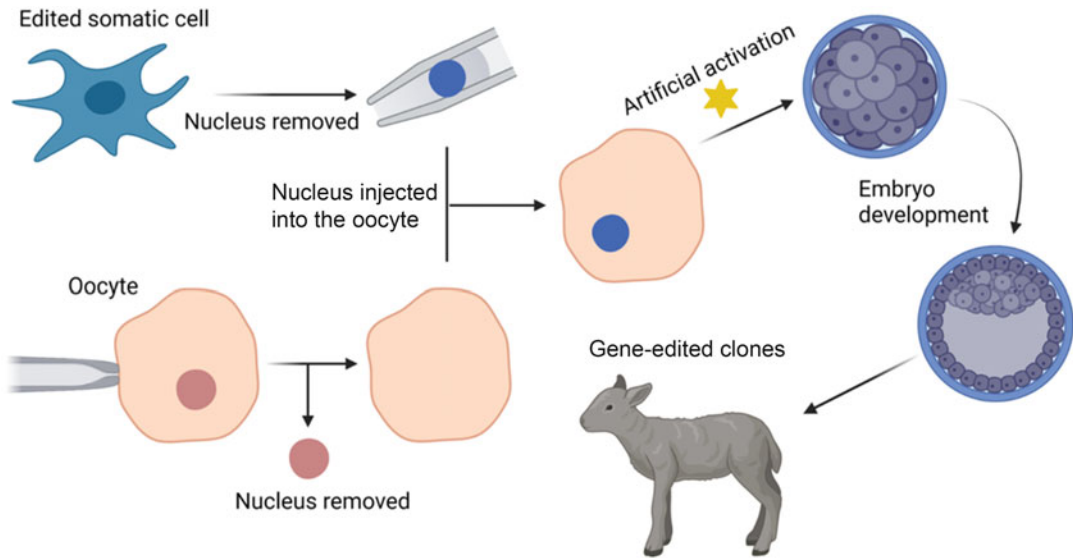


Fig. 2 Production of genetic-modified animals by nuclear transfer (SCNT)

may be screened for transgene integration sites [42], to discard cell clones carrying transgenes integrated into gene bodies or noncoding regulatory sequences, which may affect full-term developmental potential after SCNT. Gene targeting for livestock became viable a few years later, thus demonstrated by the targeted insertion into multiple loci in sheep [43, 44].

There are dozens of GM livestock documented in the scientific literature, although few reached the approval status (Table 1). The list of promising products that perished during the hard and long way from scientific labs to the final market is extensive. It is worth mentioning a few examples to illustrate some pitfalls that can hurdle the progress of GM animal products. The so-named “ecological pig” is an example of a brilliant idea and concept that was not adopted by commercial partners to put it on supermarket shelves. It was a GM pig expressing an *E. coli* phytase genes in the saliva, which would empower the animal with the capacity to digest dietary phosphorus, thus reducing phosphorus waste by 75% [45]. Therefore, the use of these transgenic pigs could result in a significant decrease in phosphorus pollution from the pig industry, with a great impact on the reduction of environmental pollution. Another case is the production of alpha 1-antitrypsin produced in the milk of TG sheep named Tracy [46]. Tracy was developed by a team of The Roslin Institute at the University of Edinburgh and the company PPL Therapeutics. However, the engineered protein caused unexpected breathing problems in human subjects during clinical trials, which ultimately lead to research and development discontinuation. Due to their high value in the market, the biomolecules for pharmaceutical applications are among the first targeted

Table 1
Genetically modified animals and their products available in the market

Product (brand name)	Company	Animal	Approval status
Fluorescent fish (GloFish)	Spectrum Brands	Fish	Taiwan and the United States in 2003
Antithrombin III (Atryn)	rEVO Biologics (LFB Group)	Goat	EU in 2006 and the United States in 2009
C1-Esterase Inhibitor (Ruconest)	Pharming	Rabbit	EU in 2010 and the United States in 2014
Sebelipase Alfa (Kanuma)	Alexion Pharmaceuticals	Chicken	EU and the United States in 2015
Salmon + GH (AquaAdvantage)	AquaBounty	Salmon	The United States in 2015 and Canada in 2016 but currently suspended
Factor VIIa (Sevenfact)	LFB Group	Rabbit	The United States in 2020

genes of interest to be produced in the mammary gland of GM livestock, [34]. Therefore, many attempts were recorded only in the patent databases, most of them linked to the Pharming group, like the human recombinant collagen produced in the milk of GM animals (USPTO Filing Date: 01/15/1994), and the recombinant human fibrinogen (rhFIB) (USPTO Filing Date: 01/15/1999). Both patents appear to have been abandoned.

Monoclonal antibodies (mAb) represent another type of biomolecules for biotechnological applications, such as for diagnosis, immunotherapy, compound purification, among others. The therapeutic use of mAb is by far its most valuable application, representing a market of hundreds of billion dollars for the pharmaceutical industry [47]. The mAb may treat several conditions, as diverse as migraine, Alzheimer, asthma, cancer, viral infection, and autoimmune diseases. However, cancer treatment is by far the hottest spot for mAb development, with more than 79 mAbs approved by the FDA in the recent years [48]. They were originally produced in hybridomas of mouse and human cells [49], and this process is still used frequently. However, limitations such as low scalability (low-throughput) and low automation of these hybridomas have propelled the development of recombinant monoclonal antibody technology by Fab/phage display [50]. Other routes to produce recombinant mAb are mammalian cell lines (e.g., CHO cell line) or in the milk of GM livestock [35].

An innovative and challenging approach to produce human polyclonal antibodies in cattle began in the late 1990s by Hematech

LCC [51], a company acquired by Kirin in 2005 and later by SAB Biotherapeutics in 2014. The first effort toward this goal was to transfer an artificial human mini-chromosome to cattle fetal fibroblasts and their subsequent use for SCNT to generate transchromosomal cattle (Tc Bovine™). These cloned Tc cattle were viable, carried the artificial mini-chromosome, and display human and cattle immunoglobulin in the blood plasma [51]. To abolish immunoglobulin production from cattle gene orthologs, researchers carried out sequential gene deletion of cattle immunoglobulin alleles in cattle fetal fibroblasts [52]. Since primary somatic cells may undergo replicative senescence after extensive culture [53], one allele was deleted at a time and used for SCNT to generate cloned fetuses and calves, thus allowing to rejuvenate cells for another round of gene deletion [52]. This re-cloning scenario allowed the deletion of several alleles in a single-cattle genome [52]. Further improvements in the construction of artificial mini-chromosomes allowed the production of Tc cattle with adequate production of human polyclonal antibodies for therapeutic applications [54–57]. This human polyclonal production platform was named DiversitAb™ and was used to produce neutralizing antibodies to the Ebola virus [58], and is currently submitted for trials to produce antibodies against the Coronavirus SARS-CoV-2. However, after 18 years of development, this promising technology has still not arrived in the marketplace.

3 GMO and Regulatory Aspects

To provide a perspective, the high rate of failure and bankruptcy observed in GMO companies (with emphasis on the ones focused on transgenic livestock or derivative products), requires understanding the intricate deregulatory process for approval of GMOs (or derivative products) for commercial purposes. The concerns about GMOs' biosafety began immediately after the report of the first GMO [25]. The initial document on the topic was entitled "Potential Biohazards of Recombinant DNA Molecules" [59]. One year later, a meeting at Asilomar (CA, USA) established the first proposal for a regulatory framework specific to GMOs and their derivatives. In 1976, the National Institutes of Health (NIH) formed the rDNA advisory committee to address the issues associated with GMOs. For decades, countries have adopted their own protocols and guidelines to assess GMO risk and establish workflows to approve GMOs. Only in 1990 the joint venture of the World Health Organization (WHO) and the Food and Agriculture Organization (FAO) produced the report "Strategies for Assessing the Safety of Foods Produced by Biotechnology" with the objective to standardize protocols for assessing the safety of GM foods and establish an international guideline. However, the intention to

unify the protocol of risk assessment and liberation of GMO was not easy, and many attempts were done until now. In 1993, the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) released the report “The safety evaluation of foods derived by modern technology—concepts and principles”. This report recommended the assessment of the potential risks of GM food on a case-by-case basis using the principle of substantial equivalence. The principle of substantial equivalence establishes that the GMO food (or derivatives) should be assessed by comparing it with a similar traditional food that has proven to be safe in normal use, with a long history of safe use, the so-called conventional equivalent. The principle of substantial equivalence was a milestone in the GM food risk assessment and is used by many countries to some extent. Another landmark for the adoption of a unified protocol and guideline for GMOs food risk assessment and international commercialization, transfer, handling, and use was the Cartagena Protocol on Biosafety, inaugurated in 2000 and becoming mandatory for the 172 signatory countries in 2003 (<https://bch.cbd.int/protocol/>). In parallel with Cartagena Protocol, the FAO and WHO published the Codex Alimentarius International Food Standards (<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>), a document to help countries coordinate and standardize the regulation of GM food and facilitate international trade. Since the Cartagena treaty and the Codex Alimentarius, the deregulation process involving GMOs became more standardized among the majority of countries. However, each country still has its autonomy to relax or toughen up its policies regarding GMOs and derivatives. For example, the EU and Brazil label products as “GM containing” if carrying >1.0% of GMO-derived content. Labeling is voluntary in other countries (e.g., The United States), although some US states are adopting the mandatory GM food labeling.

To release a GMO or its derivatives in the market, several years and substantial financial investments are spent in experiments, extensive product testing, technical reports, risk assessments, and product labeling, which are demanded by regulatory agencies. Several countries hold regulatory agencies for this purpose (Table 2). The extensive regulatory network and bureaucracy are prohibitive for small and medium biotech companies. Hence, these circumstances lead to high market concentration [60].

Twenty years after the production of human clotting factor IX protein in transgenic cloned sheep, the production of this protein remains restricted to transgenic mammalian cell lines [61]. This shows the uncertainty in producing biomolecules in GM animals and may explain the vast majority of attempts which do not lead to product approval and availability in the market [34, 35].

Unlike the expectations, the first marketable GM animal was a fluorescent fish intended for the pet market. Named GloFish, the first Green Fluorescent Protein (GFP) ubiquitously expressing

Table 2
Ten of the most relevant regulatory agencies in the world

Country or region	Deregulation agency
Africa	Common Market for Eastern and Southern Africa
Argentina	National Agricultural Biotechnology Advisory Committee (environmental impact), National Service of Health and Agrifood Quality (food safety), and National Agribusiness Direction (effect on trade)
Australia	Office of the Gene Technology Regulator (overseas all), Therapeutic Goods Administration (GM medicines), and Food Standards Australia New Zealand (GM food)
Brazil	National Biosafety Technical Commission (CTNBio) and Council of Ministers (only for socioeconomic issues if summoned by ministers or the president)
Canada	Health Canada and the Canadian Food Inspection Agency
China	Office of Agricultural Genetic Engineering Biosafety Administration (OAGEBA)
Europe Union	European Food Safety Authority (EFSA)
England	Department for Environment Food and Rural Affairs
India	Institutional Biosafety Committee (IBSC), Review Committee on Genetic Manipulation (RCGM), and Genetic Engineering Approval Committee (GEAC)
The United States	USDA (agriculture), FDA (food and drug safety), and EPA (environmental impact)

zebrafish, was developed and patented by a group from the National University of Singapore in 2000 (Patent WO/2000/049150). The rights to commercialize the GFP Zebrafish were acquired by Yorktown Technologies and more recently were transferred to Spectrum Brands Inc. in 2017. In parallel, the GFP Medaka fish was developed by the National Taiwan University and licensed by Taikong Corp under a different brand name. Since then, several fluorescent proteins were introduced in ornamental fish like Barbs, Tetras, and Rainbow sharks, besides the aforementioned Zebra and Medaka. The GloFish was approved to be sold in Taiwan and the United States by 2003, thus becoming the first GM animal to be sold directly to consumers. Several concerns and disputes have involved the commercialization of GloFish around the world due to the potential risks of contention scape and natural habitat colonization [62, 63]. However, studies have shown that GloFish are less efficient in mating and reproduce in natural environment than their non-GM counterparts [64], hold increased predator vulnerability [65], and display a low risk of habitat invasiveness [66]. Therefore, scientific evidence predicts a low risk of environmental damage for these fancy pets. Since GloFish were not intended for human or animal food chain or biomolecule

production, it is considered an atypical case of GM organism (GMO) deregulation, which could explain its unexpected relatively fast approval. GMO deregulation usually takes much longer, with much greater associated costs before product approval for commercialization. For instance, recombinant Antitrobin III (AtrynTM) produced in GM goats was the first bioproduct approved for pharmaceutical purposes. Atryn was originally developed by Genzyme Corp. and first documented in the early 1990s [67]. After three rounds of acquisitions (Genzyme Corp., GTC Biotherapeutics, and now rEVO Biologics) and 15 years of deregulation process, Atryn was approved to be commercialized in the European market, and 3 years later in the US market [35]. The long bureaucratic deregulation process, the high costs of development and clinical trials, make the business of selling recombinant bioproducts produced in GM livestock a very risky enterprise. The list of unsuccessful attempts to launch these biomolecules in the market, as well as the list of companies that disappeared or went bankrupt during the process of product development, is enormous. Another emblematic example is the AquaAdvantageTM salmon, which is a fast-growing GM Atlantic salmon carrying a copy of the growth hormone gene ortholog from Chinook salmon and a gene promoter from the ocean pout, developed by the AquaBounty Technologies since 1989 [68, 69]. After 26 years, the AquaAdvantage was approved for commercialization (Table 1), albeit with several restrictions and safety precautions. However, due to the lobbying of salmon farming industry, the US Congress asked the U.S. Food and Drug Administration (FDA) agency to block AquaAdvantage salmon commercialization, while lawmakers were agreeing on labeling guidelines about the production of engineered foods. Only in 2019 the FDA lifted the restrictions for importing and commercializing the AquaAdvantage salmon, albeit this commercial dispute “disguised” of food safety or environmental risk concerns seems to be far from ending. This new “disguise” of international trade protectionism is becoming commonplace since it is easier to place commercial barriers justified on sanitary, food safety, or environmental risk concerns, instead of an allegation of internal market protection [70, 71]. In sharp contrast, genetically edited organisms (GEO) face softer deregulation pipeline, which may overcome some of these drawbacks, as described later in this chapter.

The beginning of the twenty-first-century eye witnessed novel technologies for precise editions of the genome, collectively called genome editing tools. These discoveries and further developments are thus revolutionizing the GMO-associated industries. Genome editing allows a drastic reduction in the regulatory pipeline in many countries and lowers the costs and timeline to generate GM organisms (microorganisms, plants, and animals), also known as GEO, and to potentially deliver them to the marketplace. This revolution

is opening the “doors” of the biotechnology industry to smaller companies or even startups around the world.

4 Genome-Edited Organisms (GEO)

One major goal of the biotechnology field was to develop molecular scissors capable of specific site-directed editions in eukaryotic genomes [72]. This approach is known as genome editing, and the enzymes able to reach this goal were named site-directed nucleases (SDNs). Rare-cutting endonucleases, homing endonucleases, or meganucleases were the initial candidates for editing complex genomes [72, 73]. These nucleases, which are mostly composed of introns of mobile genetic elements, thus have a recognition site of 18–30 nucleotides (Fig. 3a), which makes them a feasible candidate for a single edition in genomes with over 10^9 base pairs in size [74]. However, it was challenging to engineer them to edit a single targeted DNA sequence in the genome. The application of engineering approaches frequently diminished the endonuclease cleavage activity [74]. However, fusion of zinc-finger DNA-binding domains with the catalytic domain of *Fok I* nuclease, also known as zinc finger nucleases (ZFNs), made it possible to target, with relative high precision (Fig. 3b), a desirable site of the genome [75]. This improvement was recognized as the beginning of the genome editing era.

Among the most recent and promising techniques for targeted editing of eukaryotic genomes, we can mention ZFNs, transcription activator-like effector nucleases (TALENs), and, more recently, the nucleases directed by RNA guides of the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-associated system protein (CRISPR-Cas) technologies [76]. The ZFNs are considered the first generation of nucleases engineered to cut a specific location of plant and animal genomes [77], as described above. However, due to the lower specificity in DNA binding, ZFNs edit the intended site (on-target) and frequently in other nonintended sites (off-target), which is the main potential undesirable side effect of genomic editing technologies [77]. The second generation of targeted nucleases were TALENs (Fig. 3c), which are DNA-binding proteins produced by plant pathogenic bacteria to regulate gene expression in the host genome [78]. Each DNA recognition domain in TALENs binds to a single nucleotide in the targeted genome, a fact that made this genomic editing technology more accurate than ZFNs [79]. However, the construction of TALENs involves the concatenation of dozens (usually about 30) DNA-binding domains, where each domain of 34 amino acids recognizes a specific single nucleotide. Nonetheless, this process involves a great time and effort in vector construction and at a high cost [78]. More recently, a new genomic editing

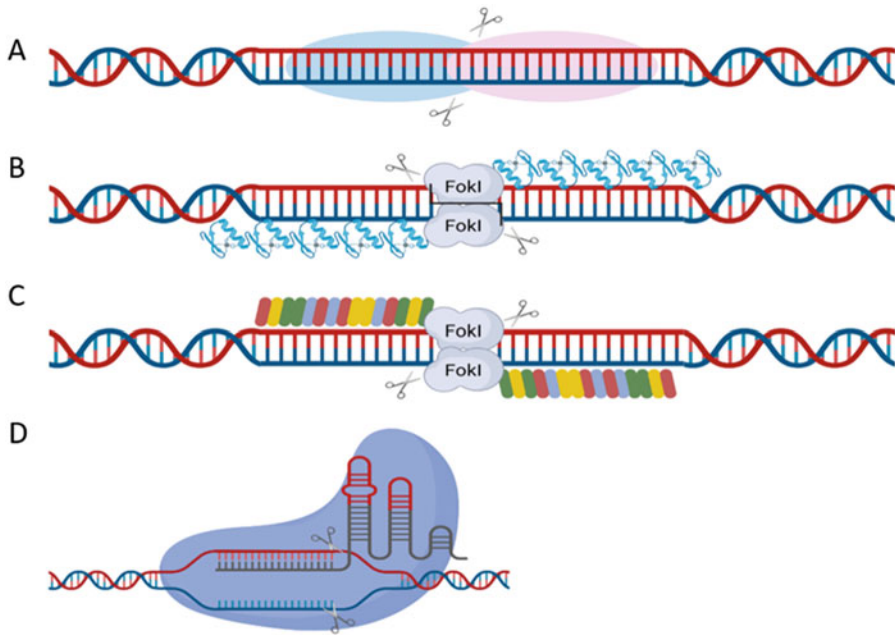


Fig. 3 Genome editing tools

technology called CRISPR-Cas (Fig. 3d) was developed based on the discovery of an adaptive immunity system present in bacteria and archaea against invading nucleic acids, commonly of viral origin [80]. The great advantage of this technology is that it relies on base pairing between a guide RNA (gRNA) and the genomic site, thus guiding the Cas9 nuclease to the target DNA sequence [81]. To reinforce the simplicity of CRISPR-Cas9 gene editing, during the construction of TALENs vectors, two domains of 30 repetitions of approximately 1800 nucleotides each (which will encode the protein domains of binding to the target DNA) are needed to give the desired specificity to the *Fok I* nuclease. In sharp contrast, CRISPR-Cas9 requires a sequence of 17–20 ribonucleotides in a context of 80 invariant ribonucleotides (scaffold sequence) to design the gRNA. These features allow researchers to rapidly create hundreds of customized (site-specific) gRNAs at a low cost [76]. These characteristics made CRISPR-Cas the prime technology for genome editing in the recent years, overtaking by far the other genome editing technologies [82].

The major concern about genome editing is the off-target effect (OTE), which is the impact within a cell of unintended editions on the recipient genome. These OTEs may vary from innocuous changes to disruptions of genes required for survival [83]. The OTE has been identified in all classes of SDN, thus including ZFNs [83, 84], TALENs [85], and CRISPR-Cas9 [86, 87]. Off-targets originate from base mismatch tolerance

found in all SDNs regarding their DNA sequence recognition [84, 85, 88]. However, astonishing approaches to reduce off-targets during genome editing mediated by CRISPR-Cas9 have been developed recently. Creative strategies using Cas9 nickases [89] or FokI-dead Cas9 fusion proteins [90] make the binding of two sgRNAs in tandem to produce the double-strand break (DSB) in the targeted site necessary. This kind of approach increases the DSB specificity and can reduce detectable off-targets by 10,000-fold [91]. Another way to improve genome editing precision is by engineering the Cas9 nuclease to increase its specificity for target site recognition. This goal was reached with several mutations on Cas9 sequence that reduce off-target frequency [92]. High-fidelity Cas9 (SpCas9-HF1) engineered by four amino acid substitutions (N497A, R661A, Q695A, and Q926A) increases Cas9 specificity and shows no detectable OTE [93]. Furthermore, the truncation of the sgRNA from 20 bp in length to 17 or 18 bp could increase the target specificity up to 5000-fold [94]. Finally, all these strategies (e.g., Cas9 dimerization, Cas9 engineering, and sgRNA truncation) can be associated to make the DSB so specific that OTE could be abolished or become negligible. Even with an extremely high fidelity and a very low incidence of off-targets, there is still a need to screen engineered genomes for off-target editions. Thanks to the advancement of whole-genome sequencing with next-generation sequencing technologies, it is now possible to screen gene-edited cells for OTE with high efficiency and relatively low costs [95, 96]. Collectively, these features made CRISPR-Cas technology feasible, widely adopted, technically simple, “and of low-cost”.

5 GEO and Regulatory Aspects

As mentioned earlier, the GMO deregulation process is expensive and long. This has a collateral effect of provoking a high concentration of GMO market in the hands of a few biotech conglomerate groups and limiting the free competition [60]. The popularization of CRISPR-Cas technology may revert this scenario and put small biotech companies or startups in the GEO market, with beneficial effects for consumers [97]. However, the breadth and depth of such impact of GEO on livestock and pharmaceutical markets will depend on the new biosafety regulatory framework adopted around the world. Therefore, if a GEO is considered equivalent to a GMO, it may have to undergo those costly and lengthy deregulation processes [98]. Since the revision of biosafety regulatory framework toward the inclusion of GEO in a distinct category of GMO is ongoing, there are different positions among governments on this topic [99]. For example, the EU adopted the most restrictive approach to GEO regulation, focusing the biosafety analysis on

the process and equating it to GMO analysis [100]. Argentina was the first country to put GEO deregulation in a different status of GMOs regarding the biosafety in 2015, focusing on the absence of external (transgenic) DNA in the final product, not the technology itself [101]. In the following years, many other countries (mainly livestock and crop exporters) adopted different rules for GEOs' biosafety analysis and deregulation, also focusing on the final product not on the process [102, 103]. Despite differences between countries, there is already a consensual workflow and terminology for GEO deregulation [99, 102]. There are three different types of SDN approaches to produce a GEO: SDN-1, where the nuclease induces a DSB, which is repaired by the targeted organism mainly through non-homologous end joining (NHEJ) accompanied by a few random base substitutions, known as small insertions or small deletions (indels); SDN-2 is similar to SDN-1, albeit with the addition of a short single-stranded oligo DNA nucleotides (ssODNs) of 50–100 bp guiding the repair; and SDN-3 which is similar to SDN-2 but with the addition of DNA template with a sequence of interest flanked by DNA sequences homolog to the targeted site, generally obtained by DNA repair using homologous recombination (HR) [102]. Several countries are adopting a case-by-case process focused on the final GEO product, where SDN-1 and 2 are considered nontransgenic (non-GMO), and SDN-3 is considered a GMO and has to undergo the conventional GMO deregulation process [104, 105]. SDN-1 and SDN-3 are usually a consensus of non-GMO and GMO regulatory policies, respectively. The discrepancy between interpretations is whether SDN-2 is a GMO or not (and the size of the ssODN template accepted). Further, most regulatory documents make reference to ssODN of a “few bases,” without a precise size for ssODN length [98, 105, 106].

The majority of new biosafety regulatory documents developed for GEOs reference SDN-2 as a non-OGM, with the exception of Australia and Canada [98, 107, 108]. Most species used to generate GMOs are commercialized internationally as commodities (livestock and crops), so a consensus on deregulatory process is highly desirable to facilitate the commercialization of OGM products or derivatives around the world. For this reason, several efforts were made to establish a standardization of the deregulation process. These efforts, described in detail in the Subheading 3, resulted in the Cartagena Protocol on Biosafety (<https://bch.cbd.int/protocol/>) and the Codex Alimentarius International Food Standards (<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>). These two protocols signed by more than 170 countries standardize the biosafety workflow of OGMs in the world. The same effort is demanded for GEOs by the scientific community and the private sector [98–102, 105]. This process is already in progress since there was an Organization for Economic Co-operation and

Development (OECD) conference on “Genome Editing: Applications in Agriculture-Implications for Health, Environment and Regulation” held on June 2018 in Paris [106]. In this conference, policymakers, scientists, innovators, and other stakeholders debated to build a consensus policy and protocol to be adopted by OECD members for GEO commercialization in the foreseeable future.

6 Genome Editing Applied to Livestock Animals

Humans have shaped the genome of livestock species for centuries by applying selective breeding, with limited or no understanding of the genetic basis of heredity [109]. In the first half of the twentieth century, independent research groups showed the increase in phenotypic (and genotypic) variation by radiation or chemical-mediated mutagenesis. Despite its utility for plant breeding, such technologies cause random mutations and could not be directed to a specific *locus* [110].

In the second half of the twentieth century, the first targeted genomic changes in yeast and mice genomes were produced using homologous recombination (HR) [111–114]. The HR technology was precise but very inefficient. To tackle this hurdle, researchers relied on mouse “embryonic stem cells (ESCs)” to perform targeted gene modifications by HR. Despite the extremely low incidence of correct gene modifications, ES cells offered two unique advantages that characterize them: infinite proliferative capacity and pluripotency, which is the potential to give rise to all cell types of the body [115]. Therefore, ESCs carrying disrupted genes (knockout) could be expanded by clonal selection (without replicative crisis) and could contribute to mouse development by their introduction into preimplantation embryos [115]. The ES-based transgenesis technology placed the mouse at the center stage for investigating gene function and modeling human diseases [115]. However, no bona fide ESC lines have been described so far for livestock species, despite many efforts over decades of research. Nowadays, genome editing technologies surpassed these problems by their association with SCNT cloning or in some cases when delivered directly into one-cell embryos (zygotes). These approaches enabled direct genetic manipulation in essentially all cell types or complex animal genomes [109].

The ability to generate a DSB in the sequence of interest is the key step of a genome editing technique using SDN [109]. The different types of SDN (e.g., ZFNs, TALENs, CRISPR-Cas) share the same potential to induce gene disruption by NEHJ or homology-driven repair by HR, which consists of DNA cleavage at specific sites followed by cellular repair of the DSB [116]. This repair can be in the absence or presence of DNA molecules

presenting homologous sequences surrounding the DSB. The NHEJ repair is activated in the absence of a DNA template, while HDR relies on homologous DNA templates [116]. These two pathways can be used for different genome editing applications, such as knockouts (NHEJ) or knockins by gene targeting (HDR). Knockout rats were initially produced using ZFNs due to the disruption of immunoglobulin M (IgM) and Rab38 genes [117]. Similar to ZFNs, the first animal generated using TALENs technology was a knockout rat for the IgM locus [118]. Soon after, the tyrosinase (Tyr) gene was disrupted by an exogenous CRISPR-Cas9 in the mouse, thus producing biallelic editions, leading to albino animals [119]. In a time span of less than 5 years, genomic editing evolved from ZFNs to CRISPR-Cas and became a widely used technology. In the following sections, we show examples of relevant livestock species that have been modified by genome editing for pharmacological research or to introduce traits that improve the economic relevance of such organisms.

6.1 Rabbits

Rabbits hold commercial interest in the context of transgenesis. Comparing rabbits with cows, rabbits have a gestation time of 1 month versus 9–10 months in the cows, and rabbit maturation (time to reach reproductive age) takes 5–6 months while cows take 15–20 months, and have a much smaller adult size [120]. Due to these features, rabbits became appealing for transgenesis and deliver results in a shorter period of time [120]. Furthermore, rabbit milk contains 2.5-fold more protein yield than sheep and 4.8-fold than goat milk, a fact that makes rabbits an attractive platform for producing heterologous proteins. Milk production in a lactating rabbit may reach 170–220 g/day and up to 10 kg/year, which may lead to up to 20 g/L of heterologous protein [121]. These factors make transgenic rabbits of lower cost compared with other livestock animals [120, 121]. Many heterologous proteins have been produced in transgenic rabbits, such as interleukin-2 [122], insulin-like growth factor-1 [123], growth hormone [124], lactoferrin [125], α 1-antitrypsin [126], anti-thrombin [127], C1 inhibitor [128], erythropoietin [129], and α -glucosidase [130].

Recent studies used CRISPR/Cas9 for producing transgenic rabbits to model human disease, test pharmaceutical drugs, enhance economical traits, and produce heterologous proteins in their milk [131]. Transgenic rabbits offer the potential to mimic human diseases by replacing rabbit alleles with disease variants found in the human gene orthologs, which subsequently leads to pathophysiological conditions mirroring the human disease condition [132]. For example, a rabbit model was developed for safety drug testing with more reliable results in predicting proarrhythmia potential [131, 132]. Rabbit physiology also offers advantages to studying certain human diseases and test new drugs (e.g.,

atherosclerosis) due to their unique lipid metabolism much similar to humans [133]. Under this scenario, CRISPR-Cas9 was used to generate double knockout rabbits by inducing deletions in the apolipoprotein E and the low-density lipoprotein (LDL) receptor genes [134]. These animals showed hyperlipidemia, aortic and coronary atherosclerosis, and physiological alterations that supported their potential as models of atherosclerosis development and for testing new therapies [134]. Duchene muscular dystrophy (DMD) is another disease in which rabbits have potential as pre-clinical animal models. Using CRISPR-Cas9, dystrophin knockout rabbits displayed muscular dystrophy features with close resemblance to the human condition, thus suggesting that it may be a better model for DMD research than other species [135]. The interleukin 2 receptor subunit gamma (IL2RG) gene is essential for signal transduction between interleukins, and mutations in this gene can cause X-linked severe combined immunodeficiency in humans. Therefore, disrupting IL2RG may lead to an animal model with immunodeficiency [136]. CRISPR-Cas9 was used to knock out the IL2RG gene and generated immunodeficient rabbits, with potential for transplantation studies as xenograft models [136]. Growth differentiation factor 8 (GDF8 also known as myostatin) is an interesting gene for engineering livestock for improved meat production since its deletion causes muscle hypertrophy and further increases carcass yield. Guo et al. [137] were able to develop GDF8 knockout rabbits using CRISPR-Cas9, which displayed higher birth weight and improved growth rates. Rabbit coat color is another trait of economic value. The melanocortin 1 receptor (MC1R) locus defines the rabbit coat color, and the disruption of this gene using CRISPR-Cas9 led to a novel pale-yellow coat color [138].

6.2 Sheep and Goats

The first report of a transgenic livestock through pronuclear micro-injection was published nearly four decades ago [36]. The successful cloning of sheep from differentiated embryonic cells and the cloning of Dolly the sheep from adult somatic cells offered a new route to generating transgenic sheep from GM-cultured cells [37, 38]. Likewise, GM fetal fibroblast cells served as donor cells to generate the first transgenic cloned sheep [40]. A few years later, knockout sheep were produced disrupting Alpha1 (I) procollagen (COL1A1) and prion protein (PrP) genes in primary cells using HR and allocating them to SCNT cloning [43, 53]. This was a milestone because gene targeting by HR requires extensive cell culture expansion that may cause replicative crisis in these primary somatic cells. However, the use of fetal fibroblasts and extensive cell clone genotyping allowed us to expand cells sufficient for SCNT and ultimately the delivery of cloned knockout lambs [44]. After these seminal reports, several other knockout models were described in livestock species, most notably in pigs.

With the advancement of genetic engineering technologies and the development of CRISPR-Cas9, the generation of gene-edited sheep and goat focused on investigating gene function and enhancing traits of economic interest, such as muscle mass, coat color, milk composition, mature weight, wool fiber length, reproduction performance, among others [139]. Moreover, other applications that have been reported regarding gene editing in small ruminants involve their use as models for human disease, generation of disease-resistant animals, and hosting the growth of human organs for xenotransplantation [139].

ZFNs have been used to target the GDF8 gene to promote double musculature phenotype in sheep [140–142]. The β -lactoglobulin (BLG) is a major allergen in cow milk and 3% of human infants are susceptible [143, 144]. Therefore, the BLG gene is also a target for genome editing to produce BLG-free milk. Moreover, ZFNs were used to knock out BLG in dairy goats [145–147]. Even though there are studies showing the potential of ZFNs to produce transgenic animals, no reports indicate the actual generation of live edited sheep or goats. TALENs have also been used to produce genetically engineered small ruminants. Biallelic GDF8 knockout sheep showed increased muscle mass [148–150]. TALENs have also been applied to target the BLG gene in goats [151–154].

CRISPR-Cas9 technology has also been used to generate edited sheep and goat. In sheep, multiplex gene editing of GDF8, the agouti-signaling protein (ASIP) and the β -carotene oxygenase 2 (BCO2), was accomplished [155]. Another interesting study included an edition of the suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) gene that resulted in the effects on milk production, body weight, and size [156]. Four important genes have been knocked out in goats: GDF8, BLG, PrP, and Nucleoporin 155 (NUP155) [139, 157]. A gene target interest to enhance wool fiber length is the Fibroblast growth factor 5 (FGF5) gene, a dominant inhibitor of fiber length and growth, and its disruption in sheep showed increase in wool length [158–160]. The disruption of the Agouti signaling protein (ASIP) gene by CRISPR-Cas9 caused variegation in coat color patterns in sheep, and this color variegation may become an important commercial trait for wool production [161]. Milk components are also an important target when discussing genetic modifications in small ruminants. The BLG gene has been disrupted by CRISPR-Cas9 in goats, generating animals with decreased expression of BLG and animals without BLG protein production in milk [157, 162]. Since melatonin has many nutritional and medicinal utilities, CRISPR-Cas9 was used to make gene-edited animals producing melatonin-enriched milk [163]. Another interesting target to genome editing is to enhance reproductive performance. Mutations in sheep BMPR-IB (FecB) gene and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene have been

performed to improve goat prolificacy since both genes increase ovulation rates in sheep [164, 165]. Improving animal health and welfare is also an important use of genome editing technologies. PrP-resistant animals can be produced by suppressing the expression of PrP, which is associated with the disease known as spongiform encephalopathy, that occur in humans and livestock species, and PrP-knockout goat fibroblasts cells were documented [157, 166, 167].

6.3 Pigs

The wide use of transgenic pigs in biomedicine and biopharming reflects their physiological similarities to humans [168]. Their applications range from research models for human disease and production of recombinant proteins to potentially providing tissue or organs for xenotransplantation [168]. Mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene causes an autosomal-recessive disorder that causes bronchopulmonary failure and pancreatic enzyme insufficiency, hallmark symptoms of the cystic fibrosis disease. As a monogenic disease, the introduction of a functional CFTR allele could restore gene function and cure the patient [169, 170]. CFTR knockout pig models have been used to test gene therapy approaches for this disease. Using CRISPR-Cas9 to deliver a human CFTR allele at a safe harbor locus (i.e., not required for cell survival) in the porcine genome, it recovered CFTR gene expression in pig cells, thus showing proof-of-concept data on the potential of CRISPR-Cas9-driven gene therapy for cystic fibrosis [169].

The main drawback associated with xenotransplant is the hyperacute organ rejection. Pig organs express the GGTA-1 enzyme that synthesizes the Gal antigen, which is the main cause of xenograft rejection, since humans produce antibodies against the antigen. GGTA-1 knockout pigs have been generated using ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9, aiming to prevent this problem [171–173]. Another antigen found in pig cells that causes rejection in humans are N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc), catalyzed by cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) and the SDa antigen produced by beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase 2 (β 4GALNT2). Estrada et al. [174] generated a triple-knockout (3KO) pig using CRISPR-Cas9 (deletions for GGTA1, CMAH/ β 4, and GalNT2 genes). Cells from these 3KO pigs presented less human-anti-pig cytotoxicity response [175, 176]. However, xenografts in a pig-to-rhesus pre-clinical model, using pig 3KO kidneys, showed only a slight increase in organ survival [177]. This shows that, albeit the potential of these animals for xenotransplantation, much more advances need to be achieved before they are considered a reality for human medicine. Another interesting application of CRISPR-Cas9 in the context of xenotransplantation involves addressing biosafety concerns of potential cross-species infections. Porcine endogenous

retroviruses (PERV) are integrated into multiple sites within the pig genome and may integrate into the human genome after xenotransplantation. In turn, pigs were generated lacking functional PERVs, which was accomplished by simultaneous deletions of all 25 functional PERVs using CRISPR-Cas9 [178]. These gene editions were performed in pig primary cells, which were destined for SCNT to generate cloned piglets lacking functional PERVs.

6.4 Cattle

Genetically engineered cattle have been produced for several applications, such as bioreactors for the production of heterologous proteins in milk, enhancement of traits with economic impact, and disease-resistant animals [179]. The use of transgenic cattle as bioreactors has the mammary gland as the main site for heterologous protein production. Exogenous protein expression in the milk facilitates its purification [180]. Transgenic dairy cows may produce from 1 to 14 g/L of heterologous proteins in the milk, while holding lactations of 305 days/year. In contrast, mammalian cell culture can yield 10 g/L during 10–12 days (production peak). This comparison demonstrates the higher efficiency of heterologous production in the milk, while dispensing additional costs with laboratory infrastructure, bioreactor apparatus, and culture requirements [181, 182].

Human lysozyme shows nonspecific immune response, anti-inflammatory properties, and both antifungal and antiviral activities [183]. This protein is studied for its potential as probiotic for food supplementation and cosmetics production, and its exogenous expression in the milk can also increase cow resistance to mastitis [183]. Since mastitis is an inflammatory process caused by *Staphylococcus aureus* that diminishes milk production in livestock species, many studies showed the exogenous expression of this protein in the mammary gland. A transgenic cow expressing human lysozyme was also generated using ZFNs by Liu et al. [184] and the animals presented resistance against *Staphylococcus aureus*. Furthermore, ZFNs were also used to insert the lysostaphin gene and express this protein in the milk of the transgenic cows [185]. Lysostaphins are naturally produced by *Staphylococcus simulans* and are efficient against *S. aureus* infections. A mutation was introduced by CRISPR-Cas9 to disrupt the BLG gene in cattle. These cows produced milk lacking BLG [186, 187]. As mentioned above, BLG is the main allergen in the cow milk, but it is also the major protein, which accounts for approximately 12% of the total milk protein content [188]. Luo et al. [189] inserted the human serum albumin (HSA) gene into the BLG locus by TALEN nickase to generate animal expressing high levels of HSA without BLG (biallelic deletions) or diminished BLG content (monoallelic editions) in the milk. The HSA protein has great utility for several medical treatments because it is the most abundant protein in human plasma [190].

Wu et al. [191] produced cattle with high resistance to mycobacterium by expressing the SP110 gene. The murine SP110 gene is a promising candidate to control *Mycobacterium tuberculosis* infections by limiting bacteria growth in macrophages and inducing apoptosis in infected bovine cells. Therefore, this gene was chosen to investigate the resistance against *Mycobacterium bovis*, which causes bovine tuberculosis. Using TALENs to knockin the murine SP110 gene into cattle genomes, it was possible to generate an animal able to abolish *M. bovis* growth and multiplication [191].

CRISPR with an Cas 9 nickase (Cas9n) has the potential to increase HR frequency by avoiding the NHEJ repair pathway [192, 193]. The Cas9n induced single-strand breaks (instead of DSB), further stimulating HR repair, and created cows with natural resistance-associated macrophage protein-1 (NRAMP1) gene allele knockins [193]. The NRAMP1 gene is associated with innate resistance to intracellular pathogens (e.g., *M. bovis*) since it is a natural mechanism driving the entry of this pathogen into macrophages [194, 195]. CRISPR-Cas9 has also been applied to correct genetic variants associated with diseases in cattle. The Japanese Black cattle produce high-quality meat due to selective breeding for more than 60 years. Unfortunately, this also resulted in the accumulation of recessive mutations that leads to genetic disorders. The isoleucyl-tRNA synthetase (IARS) syndrome is one such disease caused by a mutation in the IARS gene, which leads to a reduction of 38% in its aminoacylation activity and diminished protein synthesis [196]. Using CRISPR-Cas9 to repair the mutant genetic variant, Ikeda et al. [196] generated cloned fetuses with corrected IARS alleles.

The horned phenotype represents the majority of the world's cattle population. This phenotype also represents a risk of injury to other animals and workers that manage them. Unfortunately, dehorning is labor-intensive and causes both pain and stress to the animal [197]. For the past few years, animal welfare is becoming a crucial aspect of livestock management practices. The polled phenotype is naturally found in some cattle breed and has been associated with genetic variants of the polled locus located on chromosome 1 [198]. There are four gene variants for the polled locus: the Celtic mutation (Polled Celtic, Pc) positioned within an intergenic region of chromosome 1, the Polled Friesian (Pf) (restricted to dairy cattle populations), the Polled Mongolian, and the Polled Guarani [199]. The generation of polled dairy cattle using TALENs-mediated genome editing introduced the Pc variant into the cow genome [200, 201]. The Pc variant was also integrated into the genome of a horned Holstein-Friesian bull using CRISPR-Cas12a to generate a polled calf [202]. CRISPR-Cas12a is an RNA-guided endonuclease that has been recently harnessed as an alternative genome editing tool to the Cas9, differing in the PAM (Protospacer Adjacent Motif) site context and gRNA requirements [203].

7 Concluding Remarks

The genomes of livestock species have become accessible to complex genetic editions. Initially, SCNT was pivotal to generate cloned transgenic animals from small batches of cells carrying specific genetic modifications. More recently, genome editing gained momentum, most notably by CRISPR-Cas system, and reached an efficiency threshold that motivates genetic editions directly into livestock preimplantation embryos. Despite the current ability to perform several genomic editions at once using CRISPR-Cas9, the genome must be screened for intended and nonintended (off-target) genetic editions. Perhaps this quality checking is the main reason why SCNT cloning remains a powerful technology assisting the generation of transgenic livestock carrying complex editions in their genomes.

Acknowledgments

We thank Marcelo Tigre Moura for the helpful assistance in reviewing this chapter.

Funding Melissa S. Yamashita is sponsored by CAPES scholarship.

References

1. Dunham I, Kundaje A, Aldred SF et al (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489:57–74
2. Biscotti MA, Olmo E, Pat Heslop-Harrison JS (2015) Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosom Res* 23:415–420
3. de Koning APJ, Gu W, Castoe TA et al (2011) Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genet* 7:e1002384
4. Kapusta A, Kronenberg Z, Lynch VJ et al (2013) Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs. *PLoS Genet* 9:e1003470
5. Fischer MG, Suttle CA (2011) A virophage at the origin of large DNA transposons. *Science* 332:231–234
6. McFadden GI (2001) Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *J Phycol* 37:951–959
7. Keeling PJ, Archibald JM (2008) Organelle evolution: What's in a name? *Curr Biol* 18: R345–R347
8. Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P (2000) The transfer of DNA from *agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J* 23:11–28
9. Kyndt T, Quispe D, Zhai H et al (2015) The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: an example of a naturally transgenic food crop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 5844–5849
10. McClintock B (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 36:344–355
11. Biémont C (2010) A brief history of the status of transposable elements: from junk DNA to major players in evolution. *Genetics* 186: 1085–1093
12. Bawa AS, Anilakumar KR (2013) Genetically modified foods: safety, risks and public concerns-a review. *J Food Sci Technol* 50: 1035–1046
13. Imakawa K, Nakagawa S, Kusama K (2016) Placental development and endogenous retroviruses. *Uirusu* 66:1–10
14. Haig D (2012) Retroviruses and the placenta. *Curr Biol* 22:R609–R613

15. Denner J (2016) Expression and function of endogenous retroviruses in the placenta. *APMIS* 124:31–43
16. Melo EO (2017) Are we all transgenic? *J Genet DNA Res* 1:1–2
17. Arber W, Linn S (1969) DNA modification and restriction. *Annu Rev Biochem* 38:467–500
18. Roberts RJ (1976) Restriction endonucleases. *CRC Crit Rev Biochem* 4:123–164
19. Bertani G, Weigle JJ (1953) Host controlled variation in bacterial viruses. *J Bacteriol* 65: 113–121
20. Luria SE, Human ML (1952) A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses. *J Bacteriol* 64:557–569
21. Lederberg S, Meselson M (1964) Degradation of non-replicating bacteriophage DNA in non-accepting cells. *J Mol Biol* 8:623–628
22. Meselson M, Yuan R (1968) DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217:1110–1114
23. Jeltsch A, Pingoud A (1996) Horizontal gene transfer contributes to the wide distribution and evolution of type II restriction-modification systems. *J Mol Evol* 42:91–96
24. Naito T, Kusano K, Kobayashi I (1995) Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science* 267:897–899
25. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:3240–3244
26. Itakura K, Hirose T, Crea R et al (1977) Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 198:1056–1063
27. Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F et al (1979) Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:106–110
28. Miller WL, Martial JA, Baxter JD (1980) Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *J Biol Chem* 255:7521–7524
29. Keshet E, Rosner A, Bernstein Y et al (1981) Cloning of bovine growth hormone gene and its expression in bacteria. *Nucleic Acids Res* 9: 19–30
30. Bauman DE (1999) Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application. *Domest Anim Endocrinol* 17: 101–116
31. Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M et al (1981) Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* 27:223–231
32. Costantini F, Lacy E (1981) Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. *Nature* 294:92–94
33. Gordon JW, Ruddle FH (1981) Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214: 1244–1246
34. Melo EO, Canavessi AMO, Franco MM, Rumpf R (2007) Animal transgenesis: state of the art and applications. *J Appl Genet* 48: 47–61
35. Bertolini LR, Meade H, Lazzarotto CR et al (2016) The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. *Transgenic Res* 25:329–343
36. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CEJ et al (1985) Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315:680–683
37. Moura MT, Nascimento PS, Silva JCF, Deus PR, Oliveira MAL (2018) The evolving picture in obtaining genetically modified livestock. *Anais Da Academia Pernambucana De Ciência Agronômica* 13:145–169
38. Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380:64–66
39. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J et al (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810–813
40. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA et al (1997) Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278:2130–2133
41. Vilceu BR, Anthoula K, Lazaris AS, Bilodeau Jose HF, Daniel P, Gilles A, Carol F, Keefer Lawrence C, Smith (2003) Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from in vitro-transfected somatic cells. *Biol Reprod* 68(6):2013–2023. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010066>
42. Sharon FC, Lisauskas EL, Rech Francisco JL, Aragão (2007) Characterization of transgene integration loci in transformed Madin Darby bovine kidney cells. *Cloning Stem Cells* 9(4): 456–460
43. McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS et al (2000) Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 405:1066–1069
44. Chris DP, Sarah D, Diana B, Judy W, John FA, Clark (2001) Gene targeting in primary fetal fibroblasts from sheep and pig. *Cloning Stem Cells* 3(4):221–231. <https://doi.org/10.1089/15362300152725945>

45. Golovan SP, Meidinger RG, Ajakaiye A et al (2001) Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat Biotechnol* 19:741–745
46. Wright G, Carver A, Cottom D et al (1991) High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology (N Y)* 9:830–834
47. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ et al (2020) Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci* 27:1–30
48. Castelli MS, McGonigle P, Hornby PJ (2019) The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacol Res Perspect* 7:e00535
49. Schwaber J, Cohen EP (1973) Human × mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental types. *Nature* 244:444–447
50. Siegel DL (2002) Recombinant monoclonal antibody technology. *Transfus Clin Biol* 9: 15–22
51. Kuroiwa Y, Kasinathan P, Choi YJ et al (2002) Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. *Nat Biotechnol* 20: 889–894
52. Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H et al (2004) Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. *Nat Genet* 36:775–780
53. Denning C, Priddle H New frontiers in gene targeting and cloning: success application and challenges in domestic animals and human embryonic stem cells. *Reproduction*:1–11. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260001>
54. Kuroiwa Y, Kasinathan P, Sathiyaseelan T et al (2009) Antigen-specific human polyclonal antibodies from hyperimmunized cattle. *Nat Biotechnol* 27:173–181
55. Akiko SH, Matsushita Hua W, Jin-An JP, Kasinathan EJ, Zhongde S, Yoshimi W, Glenn KJ, Knott (2013) Physiological level production of antigen-specific human immunoglobulin in cloned transchromosomal cattle. *PLoS One* 8(10):e78119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078119>
56. Hiroaki MA, Hua S, Jin-an W, Poothappillai J, Kasinathan Eddie J, Zhongde S, Yoshimi W, Glenn KJ, Knott (2014) Triple immunoglobulin gene knockout transchromosomal cattle: Bovine Lambda cluster deletion and its effect on fully human polyclonal antibody production. *PLoS One* 9(3):e90383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090383>
57. Hiroaki MA, Sano Hua W, Zhongde W J-a, Poothappillai J, Kasinathan EJ, Yoshimi S, Kuroiwa SD, Fugmann (2015) Species-specific chromosome engineering greatly improves fully human polyclonal antibody production profile in cattle. *PLoS One* 10(6):e0130699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130699>
58. Dye JM, Wu H, Hooper JW et al (2016) Production of potent fully human polyclonal antibodies against Ebola Zaire virus in transchromosomal cattle. *Sci Rep* 6:24897
59. Berg P, Baltimore D, Boyer HW et al (1974) Potential biohazards of recombinant DNA molecules published by: American Association for the Advancement of Science. *Nature* 185:303
60. Nepomuceno AL, Fuganti-Pagliarini R, Felipe MSS et al (2020) Brazilian biosafety law and the new breeding technologies. *Front Agric Sci Eng* 7:204–210
61. Kamilla SV, Tadeu P-CD, Covas (2017) Production of recombinant coagulation factors: are humans the best host cells? *Bioengineered* 8(5):462–470 5. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1279767>
62. William M, Muir (2004) The threats and benefits of GM fish. *EMBO Rep* 5(7):654–659. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400197>
63. Bratspies R (2005) Glowing in the dark: how America's first transgenic animal escaped regulation. *Minnesota J Law Sci Technol* 6:457–504
64. Richard D, Karl H, Yiyang R, Liu WM, Muir (2015) *Evolution* 69(5):1143–1157. <https://doi.org/10.1111/evo.12662>
65. Jeffrey E., Hill Anne R., Kapuscinski Tyler, Pavlowich (2011) Fluorescent transgenic Zebra Danio more vulnerable to predators than wild-type fish. *Trans Am Fish Soc* 140(4) 1001-1005 12. <https://doi.org/10.1080/00028487.2011.603980>
66. Jeffrey E, Hill LL, Scott L, Hardin (2014) Assessment of the risks of transgenic fluorescent ornamental fishes to the United States using the fish invasiveness screening kit (FISK). *Trans Am Fish Soc* 143(3):817–829 24. <https://doi.org/10.1080/00028487.2014.880741>
67. Julie DM, Christine H, Timothy O'D, Catherine E, Shirish B, Hirani KM, Katherine E, Gordon JM, McPherson (1991) Transgenic expression of a variant of human tissue-type Plasminogen activator in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Nat Biotechnol* 9(9):839–843. <https://doi.org/10.1038/nbt0991-839>
68. Henry C (2014) AquAdvantage® Salmon - a pioneering application of biotechnology in

- aquaculture. *BMC Proc* 8(S4):O31. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-8-S4-O31>
69. Jun S, Du Zhiyuan GGL, Fletcher Margaret A, Shears Madonna J, King David R, Idler Choy L, Hew (1992) Growth enhancement in transgenic Atlantic Salmon by the use of an "All Fish" Chimeric growth hormone gene construct. *Nat Biotechnol* 10(2):176–181. <https://doi.org/10.1038/nbr0292-176>
 70. Erik MP, Zwanenberg (2003) Food and agricultural biotechnology policy: how much autonomy can developing countries exercise? *Dev Policy Rev* 21(5-6):655–667. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8659.2003.00230.x>
 71. Jacques, Peter T, Zuurbier (2008) Quality and safety standards in the food industry developments and challenges. *Int J Prod Econ* 113(1):107–122 S092552730700312X. <https://doi.org/10.1016/j.ijpe.2007.02.050>
 72. Silva G, Poirot L, Galetto R et al (2011) Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Curr Gene Ther* 11: 11–27
 73. Belfort M, Roberts RJ (1997) Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Res* 25:3379–3388
 74. Jasin M (1996) Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet* 12:224–228
 75. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1156–1160
 76. Segal DJ, Meckler JF (2013) Genome engineering at the dawn of the golden age. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 14:135–158
 77. Zheng N, Li L, Wang X (2020) Molecular mechanisms, off-target activities, and clinical potentials of genome editing systems. *Clin Transl Med* 10:412–426
 78. Perez-Pinera P, Ousterout DG, Gersbach CA (2012) Advances in targeted genome editing. *Curr Opin Chem Biol* 16:268–277
 79. Sun N, Zhao H (2013) Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnol Bioeng* 110:1811–1821
 80. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* (80-) 337:816–821
 81. Pennisi E (2013) The CRISPR craze. *Science* 341:833–836
 82. Fox R (2019) Too much compromise in today's CRISPR pipelines. *CRISPR J* 2:143–145
 83. Cornu TI, Thibodeau-Beganny S, Guhl E et al (2008) DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases. *Mol Ther* 16:352–358
 84. Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR (2011) Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nat Methods* 8:765–770
 85. Guilinger JP, Pattanayak V, Reyon D et al (2014) Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity. *Nat Methods* 11: 429–435
 86. Lin Y, Cradick TJ, Brown MT et al (2014) CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res* 42:7473–7485
 87. Fu Y, Foden JA, Khayter C et al (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 31:822–826
 88. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA et al (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31:827–832
 89. Cho SW, Kim S, Kim Y et al (2014) Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res* 24:132–141
 90. Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C et al (2014) Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 32:569–576
 91. Wyvekens N, Topkar VV, Khayter C et al (2015) Dimeric CRISPR RNA-guided FokI-dCas9 nucleases directed by truncated gRNAs for highly specific genome editing. *Hum Gene Ther* 26:425–431
 92. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ et al (2015) Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* 523:481–485
 93. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS et al (2016) High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 529:490–495
 94. Fu Y, Sander JD, Reyon D et al (2014) Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* 32:279–284
 95. Tsai SQ, Nguyen NT, Malagon-Lopez J et al (2017) CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-

- Cas9 nuclease off-targets. *Nat Methods* 14: 607–614
96. Zischewski J, Fischer R, Bortesi L (2017) Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnol Adv* 35:95–104
 97. Ledford H (2019) Gene-edited animal creators look beyond US market. *Nature* 566: 433–434
 98. Lassoued R, Smyth SJ, Phillips PWB, Hesseln H (2018) Regulatory uncertainty around new breeding techniques. *Front Plant Sci* 9:1–10
 99. Kleter GA, Kuiper HA, Kok EJ (2019) Gene-edited crops: towards a harmonized safety assessment. *Trends Biotechnol* 37:443–447
 100. Davison J, Ammann K (2017) New GMO regulations for old: determining a new future for EU crop biotechnology. *GM Crops Food* 8:13–34
 101. Whelan AI, Lema MA (2015) Regulatory framework for gene editing and other new breeding techniques (NBTs) in Argentina. *GM Crops Food* 6:253–265
 102. Friedrichs S, Takasu Y, Kearns P et al (2019) An overview of regulatory approaches to genome editing in agriculture. *Biotechnol Res Innov* 3:208–220
 103. Hamburger DJS (2018) Normative criteria and their inclusion in a regulatory framework for new plant varieties derived from genome editing. *Front Bioeng Biotechnol* 6:176
 104. Custers R, Casacuberta JM, Eriksson D et al (2019) Genetic alterations that do or do not occur naturally; Consequences for genome edited organisms in the context of regulatory oversight. *Front Bioeng Biotechnol* 6:213
 105. Friedrichs S, Takasu Y, Kearns P et al (2019) Policy considerations regarding genome editing. *Trends Biotechnol* 37:1029–1032
 106. Friedrichs S, Takasu Y, Kearns P et al (2019) Meeting report of the OECD conference on “Genome Editing: Applications in Agriculture—Implications for Health, Environment and Regulation”. Springer International Publishing
 107. Smyth SJ (2017) Canadian regulatory perspectives on genome engineered crops. *GM Crops Food* 8:35–43
 108. Mallapaty S (2019) Australian gene-editing rules adopt “middle ground”. *Nature*:4–5. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-01282-8>
 109. Carroll D (2017) Genome editing: past, present, and future. *Yale J Biol Med* 90:653–659
 110. Auerbach C, Robson JM (1946) Chemical production of mutations. *Nature* 157:302
 111. Rothstein RJ (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* 101:202–211
 112. Scherer S, Davis RW (1979) Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4951–4955
 113. Smithies O, Gregg RG, Boggs SS et al (1985) Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 317:230–234
 114. Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR (1986) High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* 44:419–428
 115. Mario R, Capecchi (2005) Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet* 6(6):507–512. <https://doi.org/10.1038/nrg1619>
 116. Fernández A, Josa S, Montoliu L (2017) A history of genome editing in mammals. *Mamm Genome* 28:237–246
 117. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y et al (2009) Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 325:433
 118. Tesson L, Usal C, Ménoret S et al (2011) Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol* 29:695–696
 119. Yen S-T, Zhang M, Deng JM et al (2014) Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR/Cas9 RNA injections in mouse zygotes. *Dev Biol* 393:3–9
 120. Wang Y, Zhao S, Bai L et al (2013) Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors. *Biomed Res Int* 2013: 580463
 121. Bosze Z, Hiripi L, Carnwath JW, Niemann H (2003) The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins. *Transgenic Res* 12:541
 122. Bühler TA, Bruyère T, Went DF et al (1990) Rabbit β -casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits. *Biotechnology (N Y)* 8(2): 140–143
 123. Zinovieva N, Lassnig C, Schams D et al (1998) Stable production of human insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in the milk of hemi- and homozygous transgenic rabbits over several generations. *Transgenic Res* 7(6):437–447

124. Lipiński D, Jura J, Kalak R et al (2003) Transgenic rabbit producing human growth hormone in milk. *J Appl Genet* 44(2):165–174
125. Han ZS, Li QW, Zhang ZY et al (2008) Adenoviral vector mediates high expression levels of human lactoferrin in the milk of rabbits. *J Microbiol Biotechnol* 18(1):153–159
126. Massoud M, Bischoff R, Dalemans W et al (1991) Expression of active recombinant human α 1-antitrypsin in transgenic rabbits. *J Biotechnol* 18(3):193–203
127. Yang H, Li Q, Han Z, Hu J (2012) High level expression of recombinant human antithrombin in the mammary gland of rabbits by adenoviral vectors infection. *Anim Biotechnol* 23(2):89–100
128. Koles K, van Berkel PHC, Pieper FR et al (2004) N- and O-glycans of recombinant human C1 inhibitor expressed in the milk of transgenic rabbits. *Glycobiology* 14:51–64
129. Mikus T, Poplstein M, Sedláková J et al (2004) Generation and phenotypic analysis of a transgenic line of rabbits secreting active recombinant human erythropoietin in the milk. *Transgenic Res* 13(5):487–498
130. Jongen SP, Gerwig GJ, Leeftang BR et al (2007) N-glycans of recombinant human acid α -glucosidase expressed in the milk of transgenic rabbits. *Glycobiology* 17(6):600–619
131. Major P, Baczkó I, Hiripi L et al (2016) A novel transgenic rabbit model with reduced repolarization reserve: long QT syndrome caused by a dominant-negative mutation of the KCNE1 gene. *Br J Pharmacol* 173(12):2046–2061
132. Hornyik T, Castiglione A, Franke G et al (2020) Transgenic LQT2, LQT5, and LQT2-5 rabbit models with decreased repolarisation reserve for prediction of drug-induced ventricular arrhythmias. *Br J Pharmacol* 177(16):3744–3759
133. Fan J, Kitajima S, Watanabe T et al (2015) Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacol Ther* 146:104–119
134. Yuan T, Zhong Y, Wang Y et al (2019) Generation of hyperlipidemic rabbit models using multiple sgRNAs targeted CRISPR/Cas9 gene editing system. *Lipids Health Dis* 18(1):69
135. Sui T, Lau YS, Liu D et al (2018) A novel rabbit model of Duchenne muscular dystrophy generated by CRISPR/Cas9. *Dis Model Mech* 11(6):dmm032201
136. Hashikawa Y, Hayashi R, Tajima M et al (2020) Generation of knockout rabbits with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using CRISPR/Cas9. *Sci Rep* 10:9957
137. Guo R, Wan Y, Xu D et al (2016) Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 6:29855
138. Xiao N, Li H, Shafique L et al (2019) A novel pale-yellow coat color of rabbits generated via MC1R mutation with CRISPR/Cas9 system. *Front Genet* 10:875
139. Kalds P, Zhou S, Cai B et al (2019) Sheep and goat genome engineering: from random transgenesis to the CRISPR era. *Front Genet* 10:1–27
140. Salabi F, Nazari M, Chen Q et al (2014) Myostatin knockout using zinc-finger nucleases promotes proliferation of ovine primary satellite cells in vitro. *J Biotechnol* 192 Pt A:268–280
141. Zhang C, Wang L, Ren G et al (2014) Targeted disruption of the sheep MSTN gene by engineered zinc-finger nucleases. *Mol Biol Rep* 41:209–215
142. Zhang X, Wang L, Wu Y et al (2016) Knock-out of myostatin by zinc-finger nuclease in sheep fibroblasts and embryos. *Asian-Australas J Anim Sci* 29:1500–1507
143. Høst A (2002) Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol* 89:33–37
144. Apps JR, Beattie RM (2009) Cow's milk allergy in children. *BMJ* 339:b2275
145. Xiong K, Li S, Zhang H et al (2013) Targeted editing of goat genome with modular-assembly zinc finger nucleases based on activity prediction by computational molecular modeling. *Mol Biol Rep* 40:4251–4256
146. Song Y, Cui C, Zhu H et al (2015) Expression, purification and characterization of zinc-finger nuclease to knockout the goat beta-lactoglobulin gene. *Protein Expr Purif* 112:1–7
147. Yuan Y, Cheng Y, Wang J, Peng Q (2016) Targeted mutagenesis of beta-lactoglobulin gene in caprine fetal fibroblasts by context-dependent assembly zinc-finger nucleases. *Open Access Libr J* 3:1–8
148. Proudfoot C, Carlson DF, Huddart R et al (2015) Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Res* 24:147–153
149. Zhao X, Ni W, Chen C et al (2016) Targeted editing of myostatin gene in sheep by transcription activator-like effector nucleases. *Asian-Australas J Anim Sci* 29:413–418
150. Li H, Wang G, Hao Z et al (2016) Generation of biallelic knock-out sheep via gene-editing

- and somatic cell nuclear transfer. *Sci Rep* 6: 33675
151. Ge H, Cui C, Liu J et al (2016) The growth and reproduction performance of TALEN-mediated β -lactoglobulin-knockout bucks. *Transgenic Res* 25:721–729
 152. Yuan Y-G, Song S-Z, Zhu M-M et al (2017) Human lactoferrin efficiently targeted into caprine beta-lactoglobulin locus with transcription activator-like effector nucleases. *Asian-Australas J Anim Sci* 30:1175–1182
 153. Zhu H, Liu J, Cui C et al (2016) Targeting human α -lactalbumin gene insertion into the goat β -lactoglobulin locus by TALEN-mediated homologous recombination. *PLoS One* 11:e0156636
 154. Cui C, Song Y, Liu J et al (2015) Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of β -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Sci Rep* 5:10482
 155. Wang X, Niu Y, Zhou J et al (2016) Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-target effects in sheep. *Sci Rep* 6:32271
 156. Rachel RP, Julien S, Charlotte S, Christian A, Laetitia T, David L, Florent P, Olivier W, Guillaume B, Mathieu T, Cécile L, Gilles C, Gwenola F, James T-K, Kijas (2015) A point mutation in suppressor of Cytokine signalling 2 (*Socs2*) increases the susceptibility to inflammation of the mammary gland while associated with higher body weight and size and higher milk production in a sheep model. *PLoS Genet* 11(12):e1005629. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005629>
 157. Ni W, Qiao J, Hu S et al (2014) Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS One* 9:e106718
 158. Hu R, Fan ZY, Wang BY et al (2017) RAPID COMMUNICATION: generation of FGF5 knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system. *J Anim Sci* 95:2019–2024
 159. Li W-R, Liu C-X, Zhang X-M et al (2017) CRISPR/Cas9-mediated loss of FGF5 function increases wool staple length in sheep. *FEBS J* 284:2764–2773
 160. Zhang R, Wu H, Lian Z (2019) Bioinformatics analysis of evolutionary characteristics and biochemical structure of FGF5 gene in sheep. *Gene* 702:123–132
 161. Zhang X, Li W, Liu C et al (2017) Alteration of sheep coat color pattern by disruption of *ASIP* gene via CRISPR Cas9. *Sci Rep* 7:8149
 162. Zhou W, Wan Y, Guo R et al (2017) Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9. *PLoS One* 12:e0186056
 163. Ma T, Tao J, Yang M et al (2017) An AANAT/ASMT transgenic animal model constructed with CRISPR/Cas9 system serving as the mammary gland bioreactor to produce melatonin-enriched milk in sheep. *J Pineal Res* 63. <https://doi.org/10.1111/jpi.12406>
 164. Fabre S, Pierre A, Mulsant P et al (2006) Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reprod Biol Endocrinol* 4:20
 165. Zhang X, Li W, Wu Y et al (2017) Disruption of the sheep BMPR-IB gene by CRISPR/Cas9 in in vitro-produced embryos. *Theriogenology* 91:163–172.e2
 166. Golding MC, Long CR, Carmell MA et al (2006) Suppression of prion protein in livestock by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5285–5290
 167. Yu G, Chen J, Yu H et al (2006) Functional disruption of the prion protein gene in cloned goats. *J Gen Virol* 87:1019–1027
 168. Hryhorowicz M, Lipiński D, Hryhorowicz S et al (2020) Application of genetically engineered pigs in biomedical research. *Genes (Basel)* 11(6):670
 169. Zhou ZP, Yang LL, Cao H et al (2019) In vitro validation of a CRISPR-mediated CFTR correction strategy for preclinical translation in pigs. *Hum Gene Ther* 30:1101–1116
 170. Ruan J, Hirai H, Yang D et al (2019) Efficient gene editing at major CFTR mutation loci. *Mol Ther Nucleic Acids* 16:73–81
 171. Kang J-T, Kwon D-K, Park A-R et al (2016) Production of α 1,3-galactosyltransferase targeted pigs using transcription activator-like effector nuclease-mediated genome editing technology. *J Vet Sci* 17:89–96
 172. Chuang C-K, Chen C-H, Huang C-L et al (2017) Generation of GGTA1 mutant pigs by direct pronuclear microinjection of CRISPR/Cas9 plasmid vectors. *Anim Biotechnol* 28: 174–181
 173. Lipiński D, Nowak-Terpiłowska A, Hryhorowicz M et al (2019) Production of ZFN-mediated GGTA1 knock-out pigs by microinjection of gene constructs into pronuclei of zygotes. *Pol J Vet Sci* 22:91–100
 174. Estrada JL, Martens G, Li P et al (2015) Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking GGTA1/CMAH/ β 4GalNT2 genes. *Xenotransplantation* 22:194–202
 175. Butler JR, Martens GR, Estrada JL et al (2016) Silencing porcine genes significantly reduces human-anti-pig cytotoxicity profiles: an alternative to direct complement regulation. *Transgenic Res* 25:751–759

176. Wang Z-Y, Martens GR, Blankenship RL et al (2017) Eliminating xenoantigen expression on swine RBC. *Transplantation* 101:517–523
177. Adams AB, Kim SC, Martens GR et al (2018) Xenoantigen deletion and chemical immunosuppression can prolong renal xenograft survival. *Ann Surg* 268:564–573
178. Niu D, Wei H-J, Lin L et al (2017) Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science* 357:1303–1307
179. Su F, Wang Y, Liu G et al (2016) Generation of transgenic cattle expressing human β -defensin 3 as an approach to reducing susceptibility to *Mycobacterium bovis* infection. *FEBS J* 283:776–790
180. Monzani PS, Adona PR, Ohashi OM et al (2016) Transgenic bovine as bioreactors: challenges and perspectives. *Bioengineered* 7:123–131
181. Demain AL, Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* 27:297–306
182. Kim JY, Kim Y-G, Lee GM (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 917–930
183. Yang B, Wang J, Tang B et al (2011) Characterization of bioactive recombinant human lysozyme expressed in milk of cloned transgenic cattle. *PLoS One* 6:e17593
184. Liu X, Wang Y, Tian Y et al (2014) Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to β -casein locus using zinc-finger nucleases. *Proc Biol Sci* 281: 20133368
185. Liu X, Wang Y, Guo W et al (2013) Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat Commun* 4:2565
186. Sun Z, Wang M, Han S et al (2018) Production of hypoallergenic milk from DNA-free beta-lactoglobulin (BLG) gene knockout cow using zinc-finger nucleases mRNA. *Sci Rep* 8:15430
187. Wei J, Wagner S, Maclean P et al (2018) Cattle with a precise, zygote-mediated deletion safely eliminate the major milk allergen beta-lactoglobulin. *Sci Rep* 8:7661
188. Kontopidis G, Holt C, Sawyer L (2004) Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *J Dairy Sci* 87:785–796
189. Luo Y, Wang Y, Liu J et al (2016) Generation of TALE nickase-mediated gene-targeted cows expressing human serum albumin in mammary glands. *Sci Rep* 6:20657
190. Fanali G, di Masi A, Trezza V et al (2012) Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Asp Med* 33:209–290
191. Wu H, Zhang Y, Wang Y et al (2015) TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E1530–E1539
192. Cong L, Ran FA, Cox D et al (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339:819–823
193. Gao Y, Wu H, Wang Y et al (2017) Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biol* 18:13
194. Vidal S, Tremblay ML, Govoni G et al (1995) The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J Exp Med* 182:655–666
195. Li HT, Zhang TT, Zhou YQ et al (2006) SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 10:3–12
196. Ikeda M, Matsuyama S, Akagi S et al (2017) Correction of a disease mutation using CRISPR/Cas9-assisted genome editing in Japanese black cattle. *Sci Rep* 7:17827
197. Grondahl-Nielsen C, Simonsen HB, Lund JD, Hesselholt M (1999) Behavioural, endocrine and cardiac responses in young calves undergoing dehorning without and with use of sedation and analgesia. *Vet J* 158:14–20
198. Brenneman RA, Davis SK, Sanders JO et al (1996) The polled locus maps to BTA1 in a *Bos indicus* x *Bos taurus* cross. *J Hered* 87: 156–161
199. Aldersey JE, Sonstegard TS, Williams JL, Bottema CDK (2020) Understanding the effects of the bovine POLLED variants. *Anim Genet* 51:166–176
200. Tan W, Carlson DF, Lancto CA et al (2013) Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:16526–16531
201. Carlson DF, Lancto CA, Zang B et al (2016) Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nat Biotechnol* 34: 479–481
202. Schuster F, Aldag P, Frenzel A et al (2020) CRISPR/Cas12a mediated knock-in of the Polled Celtic variant to produce a polled genotype in dairy cattle. *Sci Rep* 10:13570
203. Paul B, Montoya G (2020) CRISPR-Cas12a: functional overview and applications. *Biom J* 43:8–17