

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - CEUB**  
**PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**ANA CAROLINA VIEIRA DA SILVA**  
**JÉSSICA MÜLLER**

**EDIÇÃO GÊNICA EM CÉLULAS DE BOVINOS PARA INSERÇÃO DE GENES DE  
INTERESSE NO LOCUS H11 DO GENOMA BOVINO.**

**BRASÍLIA**

**2021**

**ANA CAROLINA VIEIRA DA SILVA**

**JÉSSICA MÜLLER**

**EDIÇÃO GÊNICA EM CÉLULAS DE BOVINOS PARA INSERÇÃO DE GENES DE  
INTERESSE NO LOCUS H11 DO GENOMA BOVINO.**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Prof. Dr. Andrei Antonioni Guedes Fidelis

Coorientação: Dr. Eduardo de Oliveira Melo

**BRASÍLIA**

**2021**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos, primeiramente, aos nossos pais e familiares que sempre nos apoiaram e incentivaram nos estudos.

Ao Professor e orientador Andrei Fidelis por abrir as portas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por nos apresentar o mundo da pesquisa e pelas oportunidades na vida acadêmica.

Ao pesquisador Doutor Eduardo de Oliveira Melo e à doutoranda Melissa Yamashita por tantos ensinamentos, constantes incentivos durante a pesquisa, oportunidades de participação ativa nos experimentos, pelas valiosas orientações e por contribuírem para o nosso crescimento acadêmico.

À assessoria do Programa de Iniciação Científica do UniCEUB, que sempre esteve disposta a ajudar e sanar nossas dúvidas, além de oferecer oficinas para agregar ao projeto.

## RESUMO

A pecuária bovina tem grande influência nas exportações brasileiras e conseqüentemente na economia do país. As doenças infecciosas e parasitárias se tornam grandes impedimentos para o crescimento da atividade, uma vez que afetam significativamente a produtividade dos animais. Com o desenvolvimento de novas biotecnologias, é possível a aplicação de técnicas para obtenção de animais geneticamente modificados, uma vez que a transgenia animal é uma ferramenta relevante para a obtenção de animais mais resistentes a fatores abióticos e bióticos. Dentre as técnicas mais atuais de edição e modificação de genes podemos citar a CRISPR/Cas9. A técnica de CRISPR foi descoberta através de uma análise de como o sistema imunológico da bactéria funciona contra vírus, que insere seu material genético no genoma da bactéria e serve de molde para o gRNA, que se une com a Cas9 e procura uma sequência complementar no genoma de outro vírus infectante para gerar uma quebra na fita, podendo resultar em inserções ou deleções de genes. Para a realização da técnica de CRISPR/Cas9, é necessário um fluxo de trabalho para triagem, composto por etapas fundamentais: construção e sequenciamento dos vetores, produção dos guias para Cas9 e dos primers; transformação do vetor; transfecção de células; amplificação por PCR e ensaios de digestão com enzima endonuclease T7E1 para avaliar a edição genômica realizada. No laboratório ela pode ser usada através de transfecção celular, um método que possibilita o transporte de genes exógenos para dentro das células de interesse, para isso o ensaio de digestão com a enzima T7Endonuclease1 (T7E1) é utilizada, já que reconhece e corta as regiões do DNA que não foram pareadas de forma correta na etapa anterior (PCR), possibilitando identificar as regiões que tiveram sucesso na indução de edição nos genes alvos. O objetivo da pesquisa foi investigar a aplicação do sistema CRISPR/Cas para edição genômica e estabelecer a metodologia mais eficiente para inserir o gene de interesse em um local específico e seguro do genoma denominado *locus* H11, para que futuramente seja possível produzir embriões bovinos transgênicos. Este trabalho demonstrou que os testes e análises para padronização dos procedimentos e a escolha dos melhores parâmetros são extremamente importantes. Os resultados mostram que é importante saber a origem da célula transfectada, já que *cúmulus* apresentou bandas fantasmas e impossibilitou a análise de edição. Quanto a transfecção, o melhor reagente foi o Xfect armazenado no congelador que apesar de não apresentar uma mortalidade celular ideal. Além disso, ficou comprovado também a importância de um controle positivo da enzima T7E1 e do controle negativo com DNA de células não transfectadas no ensaio de digestão. A confirmação da expressão heteróloga de genes de interesse e da edição genômica não foi possível até o momento, mas pode-se concluir que a técnica de CRISPR é uma ferramenta de fácil execução e relativamente rápida, e com os melhores parâmetros definidos, válida a abordagem para experimentos futuros.

**Palavras-chave:** CRISPR; transfecção; edição genômica; animais transgênicos; bovinos.

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma das etapas realizadas.....	21
Figura 2 - Construção do vetor pX330E.....	22
Figura 3 - Primers e guias da Cas9 no <i>locus H11</i> .....	23
Figura 4 - 1 kb DNA Plus Ladder Invitrogen.....	28
Figura 5 - Resultado de transfecção em células MDBK, campo superior enfatizando o total de células e o inferior somente com as células tranfectadas.....	33
Figura 6 - Resultado de transfecção em células MDBK, campo superior enfatizando o total de células e o inferior somente com as células tranfectadas.....	34
Figura 7 - Resultado de transfecção em células MDBK tranfectadas usando o reagente Xfect congelado e 500 ng do vetor pEF-GFP.....	34
Figura 8 - Resultado de transfecção em células MDBK tranfectadas usando o reagente Lipofectamine 2000.....	36
Figura 9 - Resultado da eletroforese em gel de agarose para comparar as células.....	37
Figura 10 - Resultado da eletroforese em gel de agarose para comparar melhor concentração de DNA.....	38
Figura 11 - Resultados da eletroforese em gel de agarose para comparar melhores primers, usando 277 ng de DNA genômico da extração de fibroblasto.....	39
Figura 12 - Resultados da eletroforese em gel de agarose para comparar melhores primers, usando 252 ng de DNA genômico da extração de células do cúmulus.....	40
Figura 13 - Resultados da eletroforese em gel de agarose para comparar o corante fluorescente.....	40
Figura 14 - Resultados da eletroforese em gel de agarose para comparar reagentes, usando Nested com os primers FWD + REV 3 (614pb) da diluição 1/100 do PCR com fragmento de 1116 pb e 124 ng de gDNA.....	41
Figura 15 - Resultados da eletroforese em gel de agarose comparando diferentes temperaturas de anelamento com duas concentrações de gDNA de fibroblasto.....	42
Figura 16 - Resultados da eletroforese em gel de agarose para análise da amplificação do gDNA com MDBK com os guias da Cas9.....	43

Figura 17 - Resultados da eletroforese em gel de agarose para avaliar digestão com T7E1 dos amplicons de cúmulus.....	44
Figura 18 - Resultados da eletroforese em gel de agarose para avaliar digestão com T7E1 dos amplicons de MDBK.....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nome dos guias, sequenciamento e tamanho em pares de base.....	22
Tabela 2 - Nome dos guias, sequenciamento, temperatura de anelamento proposta pelo fabricante para cada primer e o tamanho em pares de base.....	23
Tabela 3 - Sequência dos primers, tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb) e qual célula obteve o melhor resultado.....	29
Tabela 4 - Testes de diferentes concentrações de MgCl <sub>2</sub> , primers e taq polimerase.....	30
Tabela 5 - Resultado de transfecção em células MDBK usando 500 ng do vetor pEF-GFP para comparação de reagentes.....	35
Tabela 6 - Resultado de transfecção em células MDBK usando o reagente Lipofectamine 2000 para comparação de concentrações diferentes de DNA, usando 500 ng e 1 µg do vetor pEF-GFP.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bp - Base Pairs

CAS - Associated Protein

CO<sub>2</sub> - Dióxido de Carbono

CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DMEM - Meio Essencial Mínimo de Dulbecco

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP - Desoxinucleotídeo Trifosfato

E. coli - Escherichia coli

EDTA - Ethylenediamine Tetraacetic Acid

eGFP – Enhanced Green Fluorescent Protein

EtBr - Brometo de Etídio

FBS - Soro Fetal Bovino

FWD - Forward

gDNA - Ácido Desoxirribonucleico Genômico

GFP - Green Fluorescent Protein

gRNA - Ácido Ribonucleico Guia

gRNA H11 Bís - Guias da Cas9 no *locus H11*

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

kb - Kilo base

KCl - Cloreto de Potássio

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Fosfato de Potássio Monobásico Anidro

LB - Luria Bertani

MDBK - Madin-Darby Bovine Kidney

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de Magnésio

MUC - Mucina

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - Fosfato de Sódio Dibásico Anidro

NaCl - Cloreto de Sódio

ng - Nanograma

NHEJ – Via de junção de extremidade não homóloga

NLS - Sinal de localização nuclear

PAM - Protospacer Adjacent Motif/ Motivo Adjacente Protoespaçador

pb - Pares de Base

PBS - Phosphate-Buffered Saline

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pEF-GFP - Vetor com GFP

pH - Potencial Hidrogeniônico

PITCh - Precise Integration into Target Chromosome

PRNP – Prion protein

px330A - 1x2/px330E /px330S-PITCh - Vetores

REV - Reverse

RNA - Ácido Ribonucleico

RPM - Rotações por minuto

SpCas9 - Streptococcus pyogenes Cas9

T7E1 - T7 Endonuclease 1

TA - Temperatura de Anelamento

T<sub>m</sub> - Temperature Melting

U - Unidade

μL - Microlitro

UV - Ultravioleta

V - Volts

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	14
2.1 CRISPR/Cas 9.....	14
2.2 Transfecção em células de mamíferos .....	15
2.3 Green Fluorescent Protein (GFP).....	16
2.4 PCR.....	17
2.5 Digestão T7E1 .....	18
<b>3. MÉTODO</b> .....	20
3.1 Fluxo de trabalho para técnica CRISPR/Cas9.....	20
3.2 Construção do vetor, gRNA e primers .....	21
3.3 Transformação do vetor .....	23
3.4 Cultivo de células.....	24
3.5 Ensaio de transfecção nas células fibroblasto, cúmulus bovinos e MDBK .....	25
3.5.1 Ensaio de transfecção nas células de fibroblasto e cúmulus usando LTX.....	26
3.5.2 Ensaio de transfecção nas células MDBK para definir melhor reagente .....	26
3.5.3 Ensaio de transfecção nas células MDBK para definir melhor concentração de DNA.....	27
3.6 Extração de DNA.....	27
3.7 Amplificação por PCR .....	27
3.7.1 Análise da melhor célula para amplificação .....	28
3.7.2 Análise comparativa da melhor concentração de DNA para amplificação .....	28
3.7.3 Análise dos melhores primers para células de fibroblasto e cúmulus.....	29
3.7.4 Análise comparativa entre gel de agarose corado com SYBR Safe e com Brometo de Etídio (EtBr).....	29
3.7.5 Análise da melhor concentração de reagentes para amplificação .....	30
3.7.6 Análise da temperatura de anelamento ideal no termociclador com diferentes concentrações de gDNA.....	30
3.7.7 Amplificação de gDNA de MDBK .....	31
3.8 Purificação dos Amplicons.....	31

3.9 Digestão com T7E1 .....	32
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
4.1 Ensaio de transfecção nas células MDBK para definir melhor reagente .....	33
4.2 Ensaio de transfecção nas células MDBK para definir melhor concentração de DNA.....	35
4.3 Análise da melhor célula para amplificação.....	36
4.4 Análise comparativa da melhor concentração de DNA para amplificação.....	37
4.5 Análise dos melhores primers para células de fibroblasto e cúmulus.....	38
4.7 Análise comparativa entre gel de agarose corado com SYBR Safe e com Brometo de Etídio .....	40
4.8 Análise da melhor concentração de reagentes para a amplificação .....	41
4.9 Análise da temperatura de anelamento ideal no termociclador .....	41
4.10 Análise da amplificação com MDBK .....	42
4.11 Digestão com T7E1 .....	43
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As atividades da pecuária bovina têm grande influência nas exportações brasileiras e consequentemente na economia do país, visto que o Brasil possui um dos maiores rebanhos do mundo, com 214 milhões de cabeças de gado em 2019 (IBGE) e atualmente é o maior exportador de carne bovina.

O crescimento das exportações se deu por três principais motivos: pela ampliação do interesse da carne brasileira no mercado externo, pelo Brasil apresentar uma alta produtividade e um melhor controle sanitário (SILVA et al., 2008). No início da década de 2000, a ocorrência da encefalopatia espongiforme bovina atrapalhou o comércio dos Estados Unidos, fortalecendo as exportações do Brasil para a Europa.

Outro acontecimento que teve influência no comércio de carnes foi o surto de febre aftosa no Mato Grosso do Sul em 2005 e 2006, fazendo com que o Brasil perdesse negócios com Europa, mas em contrapartida estabelecesse acordos com países mediterrâneos, fato que explica o crescimento do destino das exportações. A partir de 2010, o Brasil retomou o crescimento do comércio internacional, impulsionado pelo crescimento populacional e desenvolvimento econômico, fazendo com que o consumo de alimentos aumentasse concomitantemente (MENEZES; BACHA, 2020).

Apesar de o Brasil apresentar um cenário favorável quanto à pecuária bovina, as doenças infecciosas e parasitárias se tornam grandes impedimentos para o crescimento da atividade, uma vez que afetam significativamente a produtividades dos animais, diminuindo o rendimento e a lucratividade. Grande parte dessas doenças podem ser evitadas por vacinas ou outras medidas profiláticas, quando causadas por vírus ou bactérias, porém no caso dos ectoparasitas, o controle sanitário é dificultado, o que aumenta o custo de produção devido a compra de antiparasitários (CANÇADO et al., 2019), e por isso é importante que haja avanço tecnológico para evitar que a atividade agropecuária diminua.

Com o desenvolvimento de novas biotecnologias, já foi possível a aplicação de técnicas para obtenção de animais geneticamente modificados. O sistema CRISPR já foi utilizado em suínos (LI et al. 2020a), caprinos (LI et al., 2019b), bovinos (BEVACQUA et al., 2016), coelhos (YUAN et al., 2019), cães (AMOASII et al., 2018) tilápias (LI et al., 2020b), ratos (LI et al., 2013), macacos (NIU et al., 2014) e camundongos (WANG et al., 2013a). Além disso, a técnica já foi utilizada para inativar o *locus* NRAMP1 no genoma bovino promovendo a resistência a

tuberculose (GAO et al., 2017) e o gene príon PRNP, relacionado a doença da vaca louca, ou encefalopatia espongiforme bovina, como estratégia de combate à doença (BEVACQUA et al. 2016). A transgenia animal é uma ferramenta significativa para o alcance de animais capazes de responder à resistência contra ectoparasitas, como a mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*), entre outros.

O ciclo biológico das moscas hematófagas se inicia quando os ovos são depositados e desenvolvidos da fase larval até a fase adulta, nas fezes do animal, depois disso a mosca-dos-chifres permanece a maior parte do tempo se alimentando sob os bovinos, causando estresse pelas picadas e diminuindo a produtividade (CANÇADO et al., 2019).

As proteínas Cry, provenientes da bactéria *Bacillus thuringiensis*, apresentam efeitos inseticidas contra insetos dípteros e do gênero *Haematobia* (GOUGH et al., 2002), podendo se tornar um importante bioinseticida de fornecimento exógeno ou endógeno, como gene a ser inserido no genoma para produção de bovinos geneticamente modificados com resistência à mosca-dos-chifres.

As mucinas são glicoproteínas produzidas por tecidos epiteliais para proteção da mucosa. A mucina 2 (MUC 2) é a principal mucina do intestino delgado e grosso e é sintetizada apenas no trato gastrointestinal, esse fato faz com que a MUC2 se torne um importante promotor para expressar genes heterólogos com expressão voltada para o trato intestinal (YAMASHITA et al., 2021).

O objetivo da pesquisa foi investigar a aplicação do sistema CRISPR/Cas para edição genômica e estabelecer a metodologia mais eficiente para inserir um gene de interesse em um local específico e seguro do genoma denominado *locus H11*, para que futuramente seja possível produzir embriões bovinos transgênicos com o gene Cry inserido genoma bovino (*Bos indicus*), sob o controle do promotor da mucina 2 (MUC2) bovina.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 CRISPR/Cas 9

A técnica de CRISPR foi descoberta através de uma adaptação de um sistema de defesa contra DNA exógenos (vírus ou plasmídeos); presente em diversas espécies de bactérias (JINEK et al., 2012). Os bacteriófagos são vírus que atacam as bactérias e quando as infectam inserem seu material genético que será incorporado no genoma do hospedeiro. Para favorecer sua multiplicação, o bacteriófago utiliza a própria maquinaria da bactéria para produzir proteínas do vírus o que causa a destruição da bactéria. Porém o sistema CRISPR/Cas é capaz de inserir pequenos fragmentos de DNA do vírus, cortado por essa maquinaria, no DNA da bactéria em um lugar denominado *locus* CRISPR, esse fragmento fica em latência até que haja um novo contato com outros bacteriófagos similares, o que cria uma memória capaz de debelar uma segunda invasão viral (MARTINEZ-OLIVA, 2020).

No momento desse contato, o novo bacteriófago irá ativar o sistema CRISPR/Cas, e os fragmentos que foram incorporados no genoma da bactéria servirão de molde para criação de uma molécula guia de RNA (gRNA) idêntica a uma porção do genoma viral, ao mesmo tempo a bactéria irá sintetizar uma enzima chamada Cas9. Esse RNA guia irá se associar a enzima, formando uma estrutura capaz de buscar no genoma do novo bacteriófago/vírus, através de uma varredura, uma sequência complementar, que irá parear com o RNA associado a endonuclease Cas9 (VIEDMA, 2018). Após encontrar a região de pareamento, a enzima será recrutada e irá cortar o material do vírus, gerando quebras na fita dupla no DNA e inativando o vírus (COSTA et al., 2021).

A sigla CRISPR é um acrônimo de Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats que significa repetições palindrômicas curtas intercaladas e agrupadas regularmente, indicando que pequenos fragmentos que se repetem e têm sequências palindrômicas, estão espaçadas entre si de maneira regular e agrupadas em uma região (RUAN et al., 2015).

Essa técnica foi utilizada em laboratórios como uma ferramenta de edição de genes e os resultados foram eficientes (JINEK et al., 2012). Ela pode ser realizada de duas formas: reproduzir o sistema CRISPR/Cas9 dentro da célula, ou seja, o DNA vetor é transfectado dentro da célula, que irá reproduzir o RNA guia para produzir a Cas9; ou produzir a Cas9 com seu

gRNA fora da célula por transcrição *in vitro* e inseri-los prontos para célula por meio de transfecção física, bioquímica ou mediada por vírus (VIEDMA, 2018).

Quando o complexo Cas9 + gRNA encontra seu alvo, faz-se a clivagem genômica, e naturalmente a célula faz a reparação quando essa parte do genoma é clivado. O reparo através da via de junção de extremidade não homóloga (NHEJ) pode resultar na criação de inserções (knock-in) ou deleções (knock-out), chamado de *Indels* (RUAN et al., 2015).

Para o sistema funcionar, é necessária uma sequência adjacente a região de clivagem, nomeado de PAM (Protospacer Adjacent Motif) que significa motivo adjacente ao protoespaçador. Uma vez que os RNAs guias conseguem transportar a Cas9 para qualquer *locus* com regiões complementares, mas se não tiver a sequência PAM não ocorre edição genômica (COSTA et al., 2021).

O CRISPR/Cas9 é uma ferramenta muito vantajosa na edição de genes por ser um sistema específico capaz de mediar o knock-in em um alvo de interesse, podendo ser utilizado em qualquer tipo de célula e região genômica. Além disso, é mais simples que os demais métodos de edição de genes descritos até o presente momento (meganucleases, nucleases, Zinc-finger e TALENs), já que essa técnica só necessita da Cas9 e o gRNA específico (LI et al., 2019a).

## 2.2 Transfecção em células de mamíferos

A transfecção é um método que possibilita o transporte de ácidos nucleicos (DNA e/ou RNA) para dentro das células de interesse. O DNA que não pertence inicialmente a um organismo não consegue atravessar a membrana celular facilmente por apresentar uma carga negativa que é repelida pela superfície negativamente carregada das células (devido a presença de muitas glicoproteínas de carga negativa). Para que essa macromolécula consiga se inserir no genoma celular, é necessário o uso de métodos que permitam essa passagem do DNA exógeno pela bicamada lipídica da membrana celular (KIM E EBERWINE, 2010).

Esses métodos podem ser biológicos, mediado por vírus, físicos como microinjeção pronuclear e eletroporação, ou químicos com uso de lipídeos ou polímeros catiônicos (HSU E ULUDAG, 2012). Os lipídeos catiônicos apresentam cargas positivas em sua superfície e a estrutura formada nesse método são lipossomas, vesículas que encapsulam substâncias ou moléculas (BATISTA et al., 2007).

Os polímeros catiônicos são carregados positivamente devido à alta densidade dos grupos amina na sua composição que interagem com a carga negativa do DNA, formando complexos polímero-DNA, denominados de poliplexos. Esse complexo protege o DNA da ação de enzimas de degradação e facilita tanto a entrada na célula por endocitose, quanto a saída dos endossomos (WANG et al., 2013b).

Durante o processo de maturação dessa vesícula, pode ocorrer o rompimento da parede liberando o DNA em direção ao núcleo, podendo então resultar na expressão do gene carregado (PARKER et al., 2003). Essa expressão pode ser estável ou transiente, ou seja, o gene de interesse pode ser inserido no genoma celular e mesmo após a replicação celular, continuar presente, ou pode ser uma expressão passageira, em que a expressão é perdida na medida em que as células se multiplicam e vão perdendo o DNA exógeno (KIM E EBERWINE, 2010).

### 2.3 Green Fluorescent Protein (GFP)

O GFP (*Green Fluorescent Protein*) é uma proteína fluorescente encontrada em uma espécie de água-viva. Osamu Shimomura, Marty Chalfie e Roger Tsien descobriram uma boa utilização dessa proteína para experimentos em laboratórios e receberam o Prêmio Nobel de Química de 2008 por conta disso (ZIMMER, 2015).

O gene GFP pode ser incorporado aos genes de alguns organismos, se ligando às proteínas através da engenharia genética. Sendo assim, passou a ser uma ferramenta muito importante no estudo de alguns processos nas células. Na década de 1960, Osamu Shimomura isolou a proteína GFP da água-viva e descobriu que ela brilhava verde quando iluminada com a luz ultravioleta. Em 1988, Martin Chalfie cria um propósito para o GFP e começa a inserir o gene em micoses para colorir algumas células e conseguir rastreá-las. Na década de 1990, Roger Tsien mostrou como o GFP produz a luz e conseguiu fazer uma variação de cores para que fosse possível rastrear diferentes proteínas em diferentes processos biológicos (The Nobel Prize in Chemistry, 2008).

O gene eGFP é uma ótima sinalização para acompanhar a eficiência da transfecção nas células, pois pode ser inserido em DNA plasmidial de interesse que quando entrar nas células levará o GFP acoplado, e quando o processo é concluído, é possível perceber que quanto mais células estiverem fluorescentes, maior foi o sucesso de inserção genômica (LAKSHMIPATHY et al., 2008).

## 2.4 PCR

A PCR (reação em cadeia da polimerase) é um processo de amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA desejados. Para que esse fenômeno ocorra, é necessário que haja uma quantidade mínima de DNA alvo, dois oligonucleotídeos (primers) específicos, dNTPs, DNA polimerase, tampão e sais ( $MgCl_2$ ) (LIMA, 2008).

Os primers são criados de acordo com o DNA para que possa complementar as sequências que flanqueiam a região de interesse a ser amplificada (alvo). Os dNTPs (desoxinucleotídeo trifosfato) são peças fundamentais para a amplificação, pois fornecem energia e nucleotídeos para a confecção dos novos fragmentos de DNA. A enzima DNA polimerase (TaqDNA) tem a função de formar a reação, catalisando a extensão dos primers. O tampão e os sais estão presentes na reação para permitir o funcionamento da enzima Taq Polimerase (CURY et al., 2005).

Para que a reação seja efetiva, há algumas etapas necessárias. A primeira etapa é a desnaturação do DNA que ocorre por meio de altas temperaturas, rompendo as ligações de hidrogênio que unem as fitas de DNA em uma dupla-hélice (LIMA, 2008). A temperatura necessária para realizar a desnaturação é de  $95^{\circ}C$  durante 20 a 30 segundos, em média (CURY et al., 2005).

A segunda etapa do processo é o anelamento dos primers, que ocorre em suas regiões específicas (LIMA, 2008). A temperatura varia de acordo com a especificidade de cada primer, variando de  $55$  a  $65^{\circ}C$  durante 30 a 60 segundos e deve ser sempre seguida, pois, uma alta temperatura impede que haja o anelamento e uma baixa temperatura pode fazer com que eles anelem em regiões inespecíficas do DNA (CURY et al., 2005).

A terceira etapa é a extensão, onde ocorre a ação da enzima polimerase, geralmente a temperatura ideal é de  $72^{\circ}C$  durante 20 a 40 segundos. Essas 3 etapas são repetidas entre 30 a 45 vezes em um termociclador programável e ao final desta etapa, os tubos são mantidos a  $72^{\circ}C$  de 5 a 10 minutos para que haja a extensão completa (CURY et al., 2005).

Em cada ciclo que ocorre durante a reação, as fitas complementares são copiadas da região onde os primers se anelam, em direções opostas, essa nova fita é usada como modelo para o ciclo de amplificação seguinte e assim sucessivamente, criando uma amplificação exponencial de determinado fragmento (LIMA, 2008).

## 2.5 Digestão T7E1

O ensaio de digestão com a enzima T7Endonuclease1 (T7E1) é utilizada para reconhecer e cortar as regiões do DNA que não foram pareadas de forma correta na etapa anterior (PCR), possibilitando identificar as regiões que tiveram sucesso na indução de mutações do tipo INDEL nos alvos do gRNA+Cas0 (JÚNIOR; CALVÃO, 2019).

Se a edição dos genes for efetiva, na maioria das vezes, há formação de um *Indel*, pois, a correção e junção das fitas de DNA não será perfeita, portanto, a T7E1 identifica esses erros e faz um corte no fragmento de DNA (VOUILLOT et al., 2015).

As mutações devem ser verificadas, pois há a possibilidade de diferentes resultados, sendo mutações homozigóticas, quando os dois alelos possuem a mesma mutação, bialélica com diferentes mutações nos alelos, ou heterozigóticas com apenas um alelo modificado. A enzima é capaz de clivar apenas as moléculas heteroduplex (mutações diferentes nos dois alelos ou mutação em apenas um alelo) em dois fragmentos menores. As fitas que não sofreram alteração e as que resultaram em mutações em homozigose (mutações iguais nos dois alelos) formam homoduplexes que não são reconhecidos e clivados pela T7E1. Portanto, se a endonuclease está atuando e é possível perceber, no gel de agarose, a separação de duas bandas mais fracas além da principal, afirmando que há mutação genômica (VOUILLOT et al., 2015).

Há alguns vieses que podem dificultar a interpretação dos resultados, como uma atuação não fidedigna da polimerase durante a PCR, podendo inserir mutação no DNA molde, fazendo com que apareçam mutações não causadas pelo sistema CRISPR/Cas9. Um outro problema é que as deleções das fitas podem alterar a temperatura de fusão da PCR, fazendo com que a tendência seja criar fragmentos de DNA menores que o molde. Além disso, outra complicação que interfere com a análise da digestão com T7E1, é a presença de polimorfismos na região amplificada pela PCR, dificultando a avaliação dos fragmentos na hora da digestão, pois não é possível afirmar se a visualização é do produto da edição gênica ou do próprio polimorfismo (VOUILLOT et al., 2015).

Duas etapas devem ser seguidas para a realização da digestão com a enzima. Na primeira é feita a mistura do produto de PCR (em média 250ng de DNA) com o tampão da enzima e um ciclo de desnaturação e reanelamento (para formar os heteroduplex), realizado em um termociclador. A segunda etapa consiste na atuação em si da T7E1, que pode variar a quantidade de enzima utilizada (geralmente utiliza-se 5U) e o tempo de incubação, que não

deve passar de 30 minutos, sendo que 20 minutos é o ideal. Entretanto, esses parâmetros podem variar de acordo com a enzima utilizada e as concentrações de DNA (VOUILLOT et al., 2015).

### 3. MÉTODO

O projeto tem como natureza uma pesquisa aplicada, visto que objetiva a execução para solucionar um problema específico, a edição genômica para inserção de um gene inseticida no genoma bovino. O método de pesquisa proposto é fundamentado na técnica de CRISPR/Cas9 e o objeto estudado foi a eficiência da edição genômica utilizando essa técnica nas condições realizadas. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por meio de experimentos, e será aplicada em bovinos.

#### 3.1 Fluxo de trabalho para técnica CRISPR/Cas9

Para a realização da técnica de CRISPR/Cas9, é necessário um fluxo de trabalho para triagem, composto por etapas fundamentais. A primeira consiste na construção e sequenciamento dos vetores, na produção dos guias para Cas9 e dos primers, a segunda é a transformação do vetor por choque térmico e replicação em *E. coli*, seguido da purificação.

A terceira etapa é o cultivo celular, transfecção de células bovinas e extração do DNA genômico, a quarta constitui-se no ensaio de PCR com os primers para flanquear o sítio de clivagem no *locus* H11, e na purificação dos produtos amplificados. A quinta se dá pelo processo de digestão com enzima endonuclease T7E1, um método de validação de edição genômica. Todas essas etapas foram realizadas em células de fibroblasto e cúmulus, que passaram por processos de otimização do protocolo de amplificação por PCR, a fim de estabelecer parâmetros mais adequados para o experimento.

Ao chegar na etapa de digestão com T7E1, as células do cúmulus apresentaram bandas em controles negativos, fato que influenciou negativamente na avaliação da edição no gel de agarose, por isso, uma alternativa encontrada foi repetir as etapas de transfecção, PCR e digestão com outro tipo de célula chamada de MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney), como mostra na Figura 1, mas antes foram feitos testes com a célula não editada, para garantir que o erro encontrado na etapa da digestão não aconteceria com o DNA genômico dessa célula.

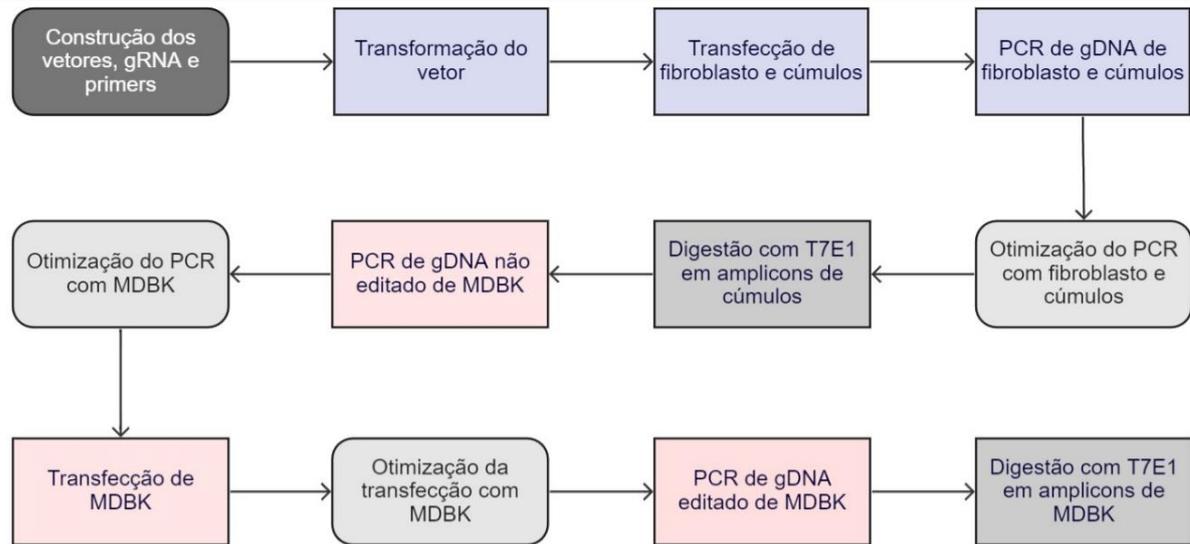


Figura 1 – Fluxograma das etapas realizadas.

### 3.2 Construção do vetor, gRNA e primers

Os vetores utilizados já haviam sido previamente construídos no laboratório com base no sistema CRISPR. Como mostra a Figura 2, os vetores utilizados para construção inicial foram o pX330A-1x2 e pX330S-2-PITCh, que continha um gRNA sintético (PITCh gRNA) responsável por guiar e flanquear, por microhomologia, a construção com o gene de interesse. Ao final dessa construção, obteve-se o vetor nomeado pX330E, com o gRNA sintético, uma sequência codificadora da endonuclease Cas9 da bactéria *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), a qual foi modificada para conter um sinal de localização nuclear (NLS) em sua extremidade, fazendo com que a SpCas9 vá para o núcleo da célula-alvo, e um promotor da beta-actina de galinha (Chicken  $\beta$ - actin promoter), provenientes do vetor pX330A-1x2.

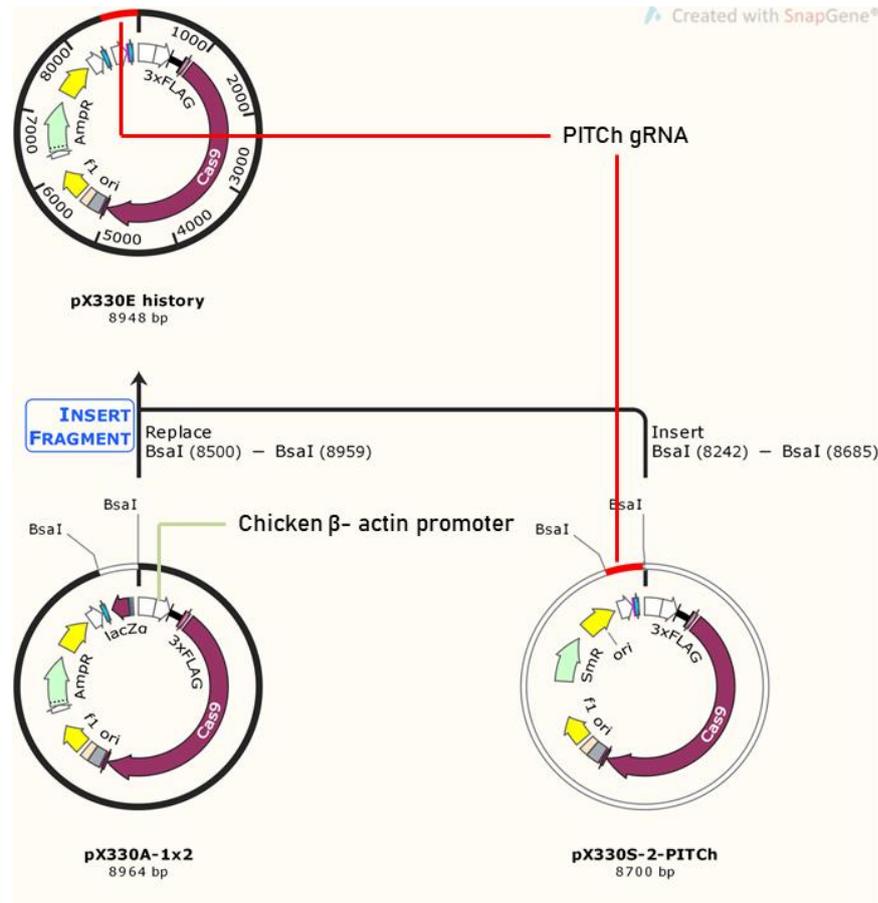


Figura 2 - Construção do vetor pX330E

Os módulos de gRNA que direcionam a endonuclease Cas9 para a *locus H11* do genoma bovino, foram desenhados em processos anteriores ao início do projeto em 2020. Como demonstrado na Tabela 1, os guias têm uma sequência de 20 a 23 nucleotídeos sintetizados para reconhecer um alvo específico do *locus*, precedendo a sequência PAM a qual é necessária para a atividade da Cas9. O vetor resultante dessa clonagem foi nomeado de pX330E-H11 e contém unidades de transcrição para dois os dois gRNA (PITCh gRNA e H11 gRNA).

Tabela 1 - Nome dos guias, sequenciamento e tamanho em pares de base.

Nome do guia	Sequência	Tamanho
gRNA H11Bi1/1b	GTTCTTGGAAGTATAGGGCA	20 pb
gRNA H11Bi 2	CATGCTCAATCCACAAAG	18 pb
gRNA H11 Bi 3	GGCAGCTCCAGGTTTAT	17 pb
gRNA H11 Bi 4	GGCAGGGTGGGCAGCTCC	19 pb
gRNA PITCh	GCATCGTACGCGTACGTGTT	20 pb

Pb: Pares de bases

Para o processo de amplificação de DNA por PCR, foram utilizados primers, também previamente desenhados, com uma sequência de 20 a 22 nucleotídeos interna ao *locus H11* (Tabela 2), formando dois braços de micro-homologia ao lado do sítio de clivagem da Cas9, guiada pelos gRNA H11 Bi (Figura 3).

Tabela 2 - Nome dos guias, sequenciamento, temperatura de anelamento proposta pelo fabricante para cada primer e o tamanho em pares de base.

Nome do primer	Sequência	Tm 50ηM NaCl	Tamanho
FWD	CCCATCTCACCAGCTACTGGC	61°C	21pb
FWD 2	CACTCAGGTCCCCTACTGCAGG	62°C	20pb
FWD 3	CATGTCATCATGCTCTCCTTAC	56°C	22pb
FWD 4	ATGGAATTTGATCCAGGTTTCT	52°C	22pb
FWD 5	AGGGCTTATTTCTGAAGTTGAC	54°C	22pb
REV	CCGTGGTCTCAGAACTCCCTTC	61°C	22pb
REV 2	GTGAACACGGCTTGGTCTTACCAG	61°C	24pb
REV 3	CCTATTCTTGACTCTTTAGCCG	56°C	22pb
REV 4	CATTTGCACTGTTTCTGGTAT	54°C	22pb
REV 5	CTTGCCTCTTCATTCTTGTGTC	56°C	22pb

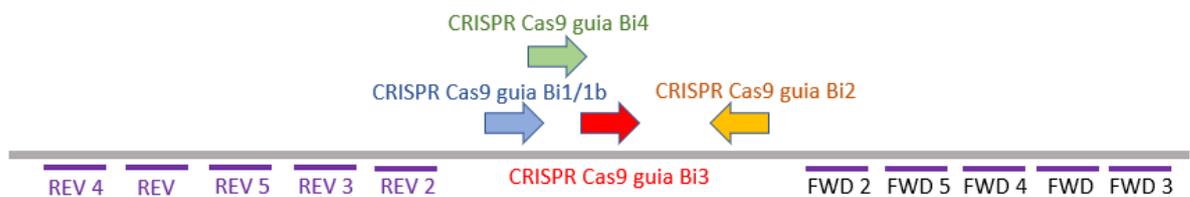


Figura 3 – Primers e guias da Cas9 no *locus H11*.

### 3.3 Transformação do vetor

Esse processo ocorre com a finalidade de transportar uma molécula de DNA plasmidial para dentro da bactéria *Escherichia coli* que fará várias cópias do DNA, por meio de diversos ciclos de divisão celular.

O método utilizado para a transformação foi o choque térmico de acordo com o protocolo estabelecido por Inoue 1990. O primeiro passo foi colocar o DNA junto a bactéria competente em um tubo eppendorf, deixá-los no gelo por 30 minutos, realizar o choque térmico a 42°C por 30 segundos, seguido de incubação no gelo por 2 minutos. Foi adicionado 80 mL de meio de cultivo Luria Bertania *broth* – meio LB (composto por 10g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura e 10g/L de NaCl) na alíquota da bactéria + DNA, que foi semeado na placa de petri feita de meio LB + ágar + ampicilina (mesma composição do meio LB, porém com 15g/L de ágar e 100 mg/mL de ampicilina) e incubado OverNight na estufa a 37°C. As bactérias que não foram transformadas com o vetor não têm o gene Beta-lactamase que confere a resistência ao antibiótico ampicilina, o qual foi adicionado na placa, logo, essas bactérias não se desenvolveram.

O segundo passo foi transferir uma colônia de bactéria selecionada para um tubo contendo 2mL de meio LB + 100 mg/mL de ampicilina e foi incubado em um Shaker a 37°C OverNight na velocidade de 260 RPM. Em seguida, foi realizada a extração e purificação com o QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), seguindo o protocolo do fabricante.

### 3.4 Cultivo de células

Foram utilizados três tipos de células, fibroblastos epiteliais bovinos cultivados in vitro, oriundos de *Bos indicus*, células do cúmulus bovinos, removidas de ovócitos de fêmeas bovinas de abatedouros e células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney Epithelial Cells), compradas do Banco de Células do Rio de Janeiro.

Para uso no procedimento de transfecção, as células passaram por descongelamento, também seguindo o protocolo do laboratório, que consiste em deixar no banho maria a 37°C por 20 segundos, transferir para um tubo eppendorf de 1,5mL com 1mL de DMEM USO a 37°C, homogeneizar, centrifugar, desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet com DMEM-USO, e por fim, colocar 3mL de meio DMEM-USO e as células em uma garrafa de cultivo 37°C.

Foram mantidas em uma estufa umidificada a 37°C, com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e monitoradas pelo microscópio. Quando atingiam a confluência de 80-100% fazia-se a repicagem de células para evitar que elas morressem, esse procedimento consiste em desprezar o meio DMEM-USO da garrafa, lavar com PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline em pH 7,4 contendo 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl e 2,7 mM KCl), adicionar 1 mL

de solução de tripsina - EDTA a 0,05% na concentração de 1X (GIBCO) para soltar as células das garrafas e incubar na estufa a 37°C por 10 minutos.

Após isso, adiciona-se 1mL de meio DMEM-USO que contém albumina sérica bovino presente no Soro Fetal Bovino, proteína que inibe a ação da tripsina, retira-se todo o conteúdo líquido da garrafa e coloca-se novamente o meio DMEM-USO para crescimento das células na estufa de cultivo.

### 3.5 Ensaios de transfecção nas células fibroblasto, cúmulus bovinos e MDBK

As células cultivadas *in vitro* foram transfectadas com os vetores pEF-GFP (250 ng/ $\mu$ L) como controle positivo para o funcionamento dos reagentes, com os vetores contendo diferentes gRNA H11Bi's, de acordo com o protocolo estabelecido no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (MELO et al., 2005) e as recomendações dos fabricantes dos reagentes utilizados.

No dia anterior às transfecções, é realizada a etapa de preparação que consiste em desprezar o meio de cultivo da garrafa, lavá-la com PBS 1X e tripsina e incubar por 10 minutos na estufa a 37°C. A tripsina é uma enzima capaz de clivar as ligações entre as células, fazendo com que elas percam a capacidade de aderência e fiquem suspensas, as células em suspensão são transferidas para um tubo de 2mL e centrifugados a 30 RPM por 5 minutos, o sobrenadante é desprezado e o sedimento ressuspendido com 1mL de meio DMEM.

A solução composta por 150  $\mu$ L de PBS e 50  $\mu$ L da alíquota com as células (fator de diluição 4). Para a contagem de células foi utilizada a Câmara de Neubauer, para os números de células retiradas da garrafa, com esse valor foi determinado qual volume foi utilizado para ter a quantidade de interesse de células por poço, posteriormente, foi realizada a diluição das células, em uma placa de 24 poços. Em cada poço foi colocado 0,5 mL de meio DMEM MÃE, composto por DMEM Low Glucose (Invitrogen), suplementado com 3,7g/L de bicarbonato de sódio em pH 7,0. Incubou-se na estufa umidificada a 37°C e 5% de dióxido de carbono para que as células grudassem ao fundo do poço e atingissem a confluência desejada 60-80% até o dia seguinte.

A otimização do protocolo de transfecção se deu por ensaios para definir qual o melhor reagente e a melhor concentração de DNA. Após determinar quais os parâmetros mais adequados para a eficiência da transfecção, e atingir a confluência desejada, a transfecção foi realizada apresentando um volume final de 250 $\mu$ L de complexos DNA/Lipossomo.

O tempo de transfecção utilizado foi de 6 horas, após isso, as células foram lavadas com DMEM + 10% de Soro Fetal Bovino e cultivadas por mais 48 horas a 37°C na estufa umidificada. Posterior a essa incubação, as células foram avaliadas quanto à mortalidade e efetividade da transfecção com GFP, pelo microscópio invertido com epifluorescência e luz UV (Axiovert 135 M) e submetidas a extração de DNA genômico.

### 3.5.1 Ensaio de transfecção nas células de fibroblasto e cúmulus usando LTX

Para transfecção nas células de fibroblasto e cúmulus foi utilizado o reagente Lipofectamine LTX reagente + PLUS reagente (TermoFisher/Invitrogen). A transfecção com cúmulus foi nas condições de 400ng do vetor, com 0,5µL de Plus Reagent e 125µL de meio de cultivo MÃE, incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 1,0µL de Lipofectamine LTX e 125µL de meio MÃE, incubados novamente por 30 minutos, seguido de plaqueamento de 250µL dessa mistura no poço. Já para fibroblasto a única condição alterada foi de 300ng do vetor, seguindo os mesmos valores utilizados para cúmulus.

### 3.5.2 Ensaio de transfecção nas células MDBK para definir melhor reagente

Antes de realizar a transfecção definitiva com células MDBK, foi testado qual seria o melhor reagente para essa célula. Nesse teste foram utilizados Lipofectamine LTX reagent + PLUS reagente (TermoFisher/Invitrogen), Lipofectamine 2000 reagent (TermoFisher/Invitrogen) e Xfect transfection reagent (Takara). O ensaio consistiu em analisar qual reagente iria transfectar uma maior quantidade de células, possuindo menor toxicidade para células e maior intensidade de expressão do gene repórter GFP.

Para essa análise foi utilizado 500ng de pEF-GFP, com aproximadamente 50 mil células por poço e tempo de transfecção de 6 horas, o volume final da solução foi de 250µL. As quantidades de cada reagente foram baseadas no protocolo do fabricante. O mix realizado com Lipofectamine LTX reagent + PLUS reagent (TermoFisher/Invitrogen) foi composto de 1,5µL de Plus Reagent + pEF-GFP 125µL de meio MÃE incubados por 5 minutos temperatura ambiente, seguido de acréscimo de 1,5µL de lipofectamine LTX e 125µL de meio MÃE com incubação em temperatura ambiente por 30 minutos.

No mix para Lipofectamine 2000 reagent (TermoFisher/Invitrogen), após a incubação de 5 minutos do pEF-GFP + o 125µL de meio MÃE, foi adicionado 2,0µL de Lipo2000 e 125µL de meio MÃE e incubado a RT por 30 minutos. Já para a avaliação do Xfect transfection reagent

(Takara), foram realizados dois testes, o primeiro usando o Buffer Maxfect (Takara) refrigerado e o segundo o congelado. Para o mix desses dois testes o vetor pEF-GFP foi incubado por 5 minutos com 25µL do Buffer Maxfect, posterior a essa incubação foi adicionado 0,3µL de Xfect (polímeros) e incubado por 30 minutos, e no momento de passar o mix para placa, adicionou-se 225 µL de meio MÃE.

### 3.5.3 Ensaio de transfecção nas células MDBK para definir melhor concentração de DNA

Para definir qual concentração de DNA transfectava melhor, foi testado 500ng e 1µg do vetor pEF-GFP, utilizando Lipofectamine 2000. Foram 6 horas de tempo de transfecção, com volume final de 250µL, após esse tempo, a solução foi desprezada e foi adicionado 500µL de meio DMEM em cada poço. A avaliação desse ensaio foi feita após 48 horas pelo microscópio invertido com epifluorescência (Axiovert 135 M).

### 3.6 Extração de DNA

Foram utilizados dois métodos para extração de DNA pós-transfecção, o PureLink Genomic DNA Minikit (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante, e o protocolo de extração Salting Out desenvolvido e adaptado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos. No método Salting Out é utilizado lise nuclear, incubação a 38° na estufa por 20 minutos e a 55° no banho maria por 2 horas.

Nesse protocolo, usa-se 200 µL de NaCl 5M e 600 µL de Isopropanol (100%), depois de aguardar 10 minutos em temperatura ambiente, é necessário centrifugar a 6°C por 30 minutos na velocidade máxima, descartar o sobrenadante e adicionar 1mL de Etanol 70%, centrifugar novamente por 20 minutos a 6°C, desprezar o sobrenadante, esperar o sedimento secar e o ressuspender com tampão de eluição (25mM Tris e 10mM EDTA), por fim deixar em temperatura ambiente por 2 horas para solubilizar.

### 3.7 Amplificação por PCR

O DNA genômico extraído e purificado da transfecção foi submetido a ensaios de PCR realizados em alíquotas com volume final de 20µL e utilizando o marcador 1kb DNA Plus Ladder Invitrogen (Figura 4). Nessa etapa foram analisados vários parâmetros para aperfeiçoar a amplificação.

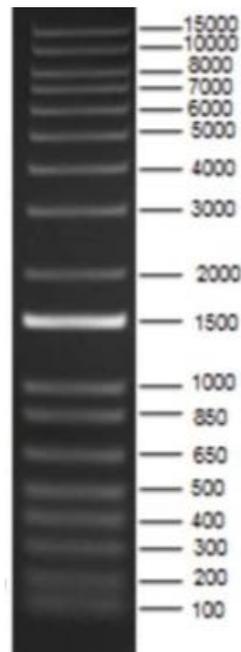


Figura 4 - 1 kb DNA Plus Ladder Invitrogen.

### 3.7.1 Análise da melhor célula para amplificação

Antes de submeter às células à amplificação no termociclador, os fibroblastos bovinos, células do cúmulus bovino e células do ovário foram avaliados por eletroforese a 100 volts por 1 hora, a partir da banda de DNA genômico em gel agarose na concentração de 0,8%, para análise da eficiência transfecção e extração. Foram aplicados em cada poço aproximadamente 240 ng das amostras das células do cúmulus (quantificação 120 ng/ $\mu$ L), 70 ng das amostras de células de ovário (quantificação 17 ng/ $\mu$ L) e 260 ng das amostras de fibroblastos (quantificação 130 ng/ $\mu$ L).

### 3.7.2 Análise comparativa da melhor concentração de DNA para amplificação

As concentrações analisadas foram 138,5 ng, 277 ng e 554 ng do DNA extraído das células de fibroblasto (quantificação 138,5 ng/ $\mu$ L), utilizando os primers FWD3 + REV4 (1116 pb), com as seguintes concentrações de reagentes: 1x de Tampão 10x (Invitrogen), 2,0mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,4 mM de dNTP, 0,15  $\mu$ M de cada primer, 2U de Taq polimerase (Platinum) e água Mili-Q para completar o volume final desejado.

As reações no termociclador (BIO-RAD T100 Thermal Cycler) foram realizadas nas condições de desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto e 30 segundos, 40 ciclos (desnaturação 94°C por 20 segundos, anelamento 55°C por 30 segundos e extensão 72°C por 40 segundos) e

extensão final a 72°C por 3 minutos. A comparação de concentração de DNA foi analisada em gel agarose na concentração de 1%, corados com SYBR Safe DNA Gel stain (Invitrogen), utilizando o marcador 1kb DNA Plus Ladder Invitrogen. Os fragmentos aplicados no gel foram submetidos a carga de 100 volts por 1 hora na eletroforese para que houvesse migração e pudessem ser visualizados por um transiluminador de luz Ultravioleta.

### 3.7.3 Análise dos melhores primers para células de fibroblasto e cúmulus

Os primers utilizados para análise estão descritos na Tabela 3, e para a comparação foi utilizado 277 ng de DNA genômico da extração de fibroblasto e 252 ng de DNA genômico da extração de cúmulus, as mesmas concentrações de reagentes e condições do termociclador do tópico anterior.

Tabela 3 - Sequência dos primers, tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb) e qual célula obteve o melhor resultado.

Primers	Tamanho	Célula
FWD 3+ REV	985 bp	Fibroblasto
FWD 3 + REV 4	1116 bp	Fibroblasto
FWD 3 + REV 5	949 bp	Fibroblasto
FWD + REV 4	952 bp	Fibroblasto
FWD + REV 3	614 bp	Fibroblasto e Cúmulus
FWD 3 + REV 2	708 bp	Fibroblasto
FWD + REV 2	540 bp	Fibroblasto e Cúmulus
FWD 4 + REV 2	365 bp	Cúmulus
FWD 4 + REV 3	439 bp	Cúmulus

FWD: Primer Forward; REV: Primer Reverse

### 3.7.4 Análise comparativa entre gel de agarose corado com SYBR Safe e com Brometo de Etídio (EtBr)

Para análise de qual é o melhor corante para eletroforese foi utilizado diferentes quantidades de um produto de PCR amplificado sob as condições e concentrações de reagentes do tópico 3.7.2, com 277 ng de gDNA de Fibroblasto, com os primers FWD+ REV3 (614pb). Foi aplicado tanto no gel corado com SYBR Safe DNA gel stain (INVITROGEN), quanto

no gel corado com 1,5  $\mu$ L EtBr (solução stock a 10mg/mL), 2 $\mu$ L, 1 $\mu$ L, 0,5 $\mu$ L e 0,25 $\mu$ L do produto de PCR, no gel a 2,5% de agarose, submetido a eletroforese a 100v por 1 hora.

### 3.7.5 Análise da melhor concentração de reagentes para amplificação

Para realizar os testes de concentração de MgCl<sub>2</sub>, primer e Taq polimerase descritos na Tabela 4, foi utilizado Nested na diluição de 1/100 de um produto de PCR de tamanho de 1116 pb, usando os primers FWD + REV3 (614pb). A concentração dos demais reagentes foram 1x de tampão 10x, 0,4mM de dNTP e 124 ng de gDNA das células do cúmulus. As condições do termociclador foram as mesmas do tópico 3.7.2 e a análise foi por meio da eletroforese a 110 volts por 50 minutos no gel na concentração de 0,8% de agarose corado com Brometo de Etídio.

Tabela 4 – Testes de diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub>, primers e taq polimerase.

Teste	Concentração de MgCl <sub>2</sub>	Concentração de cada primer	Concentração de Taq
1	2 mM	0,15 $\mu$ M	2U
2	1,5 mM	0,15 $\mu$ M	2U
3	1,0 mM	0,15 $\mu$ M	2U
4	2 mM	0,10 $\mu$ M	2U
5	2 mM	0,15 $\mu$ M	1,5U
6	2 mM	0,15 $\mu$ M	1U

### 3.7.6 Análise da temperatura de anelamento ideal no termociclador com diferentes concentrações de gDNA

As temperaturas de anelamento analisadas foram 55°C, 56,9°C, 58,1°C e 60°C, nas concentrações de 132 ng e 330 ng de DNA genômico extraído de fibroblasto, utilizando os primers FWD + REV3 (614 pb), com as seguintes concentrações de reagentes: 1x de Tampão 10x (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,4 mM de dNTP, 0,10  $\mu$ M de cada primer, 1U de Taq polimerase (Platinum) e água Mili-Q para completar o volume final desejado.

As condições da amplificação no termociclador (BIO-RAD T100 Thermal Cycler) foram: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto e 30 segundos, 40 ciclos (desnaturação 94°C por 20 segundos, gradiente de temperatura de anelamento 55-60°C por 30 segundos e extensão 72°C

por 40 segundos) e extensão final a 72°C por 3 minutos. A comparação foi feita por meio da eletroforese a 100 volts por 1 hora no gel de agarose na concentração de 1%, corados com brometo de etídio, utilizando o marcador 1kb DNA Plus Ladder (Invitrogen) e visualizados por um transiluminador.

### 3.7.7 Amplificação de gDNA de MDBK

A primeira amplificação feita com MDBK teve objetivo de testar a eficiência da T7E1, para essa avaliação as concentrações dos reagentes utilizados foram: 1x de Tampão 10x (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,4 mM de dNTP, 0,15µM de cada primer, 1U de Taq polimerase (Platinum), 200ng do gDNA não editado de MDBK, e água Mili-Q para completar o volume final desejado.

As reações no termociclador (BIO-RAD T100 Thermal Cycler) foram realizadas nas condições de desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto e 30 segundos, 40 ciclos (desnaturação 94°C por 30 segundos, anelamento 60°C por 30 segundos e extensão 72°C por 40 segundos) e extensão final a 72°C por 3 minutos. Para analisar se a amplificação obteve bons resultados, o produto de PCR foi submetido a eletroforese a 100 volts por 1 hora em um gel de agarose em concentração 1,0%.

A segunda amplificação com MDBK já foi utilizando gDNA com os guias RNA H11 Bi1, Bi1b, Bi2, Bi3, Bi4 e com os controles negativos sem guias. Usando as mesmas concentrações de reagentes da primeira amplificação e os mesmos parâmetros do termociclador (BIO-RAD T100 Thermal Cycler).

### 3.8 Purificação dos Amplicons

Os produtos amplificados com os mesmos primers e DNA, foram agrupados em um mesmo tubo com volume final de aproximadamente 100 µL, esses amplicons foram submetidos a dois tipos de purificação, ambos utilizando o PureLink Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit (Invitrogen), seguindo as indicações e protocolo do fabricante.

O primeiro método de purificação era diretamente pelo produto do PCR, o qual foi misturado com Binding Buffer B2 (Invitrogen), colocado na coluna e centrifugado por 1 minuto, seguido de Wash Buffer W1 (Invitrogen) e centrifugação duas vezes, já no tubo definitivo, colocou-se Elution Buffer E1 (Invitrogen) e centrifugou-se novamente para obter o produto final.

O outro método possibilitava isolar a banda principal dos produtos de PCR, e para isso era necessário colocar os produtos em um gel agarose 2% e deixá-los na eletroforese por 2 horas, o fabricante Invitrogen recomendava cortar a banda do produto no gel pesar o gel + tubo de 2mL (Eppendorf) e adicionar o volume de 3:1 do gel de Buffer L3 (Invitrogen), dissolver o gel a 50°C no banho maria, colocar na coluna e posteriormente, na centrífuga por 1 minuto, adicionar Wash Buffer W1 (Invitrogen), transferir a coluna para o tubo definitivo, acrescentar Elution Buffer E1 (Invitrogen), centrifugar por mais 2 minutos. Os fragmentos purificados foram quantificados utilizando o espectrofotômetro NanoDrop e confirmados em gel agarose por eletroforese.

### 3.9 Digestão com T7E1

O protocolo da reação com a endonuclease foi adaptado no laboratório, mas para que a digestão ocorra corretamente a amplificação deve ser eficiente e resultar em uma banda única e específica. Além disso, os primers devem ser desenhados para que a região on-target da enzima fique próxima de alguma extremidade, para possibilitar a visualização das bandas no gel agarose.

O método de validação de edição pela T7E1 (BioLabs) passa por uma reação no termociclador anterior à adição da enzima. A reação consiste em misturar em um tubo eppendorf de 0,2 mL, 300 ng de DNA purificado, 2uL NEBuffer 2 (BioLabs) e completar com água para volume final de 19,5 µL. As condições de hibridização no termociclador são: 95°C por 10 minutos na etapa de desnaturação, uma rampa de 95°C a 85°C com diminuição de 0,4°C por segundo, e 85°C a 25°C com diminuição de 0,1°C por segundo na etapa de anelamento, e manter a 12°C. Adicionar 5U de enzima e incubar a 37°C por 30 minutos, ao final, adicionar imediatamente 2 µL de EDTA (0,2mM) para parar a reação, colocar no gel agarose com concentração de 2% a 60 volts na eletroforese por 3 horas e analisar por luz Ultravioleta se houve corte no DNA e edição, por meio de bandas de tamanho menor que a principal.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ensaio de transfecção nas células MDBK para definir melhor reagente

Os resultados do ensaio para definição de melhor reagente podem ser visualizados na Figura 5, 6 e 7, após 48 horas, e estão descritos da Tabela 5. O melhor reagente quanto a quantidade de células transfectadas e intensidade da transfecção foi o Xfect armazenado no congelador. O Xfect refrigerado foi o que menos causou toxicidade às células, porém há hipótese de que ocorreu devido ao modo de armazenamento causando uma inviabilidade como reagente de transfecção.

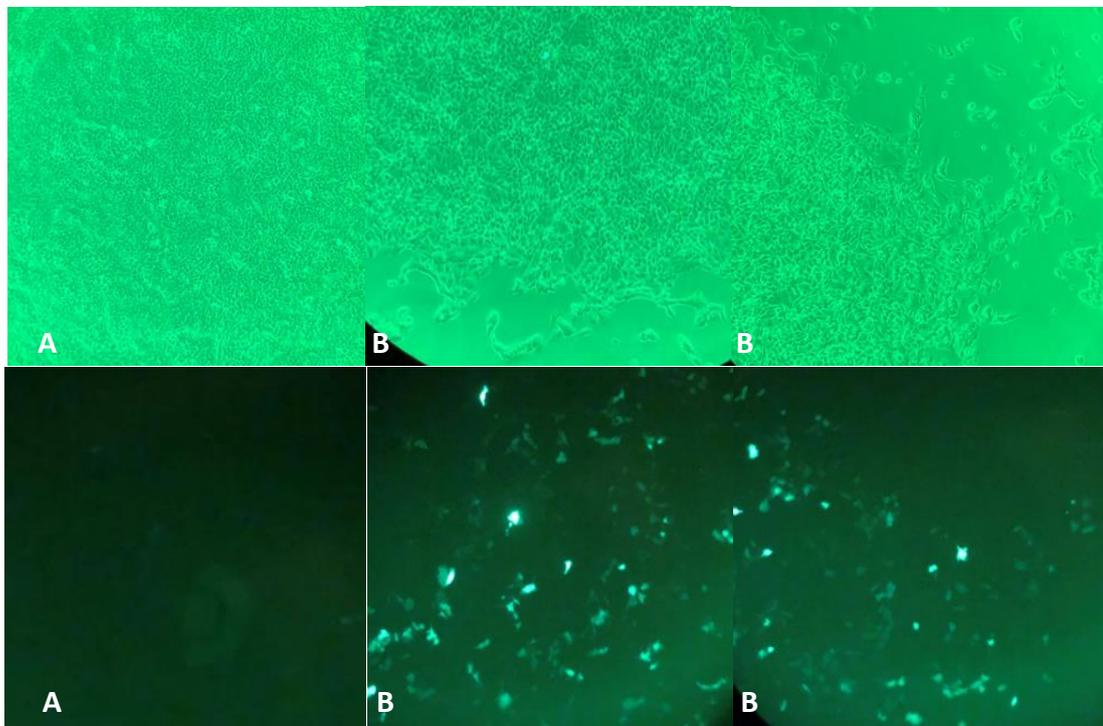


Figura 5 - Resultado de transfecção em células MDBK, campo superior enfatizando o total de células e o inferior somente com as células transfectadas. **A.** Controle negativo apenas com meio de cultivo. **B.** Células MDBK transfectadas usando o reagente Lipofectamine 2000 e 500 ng do vetor pEF-GFP.

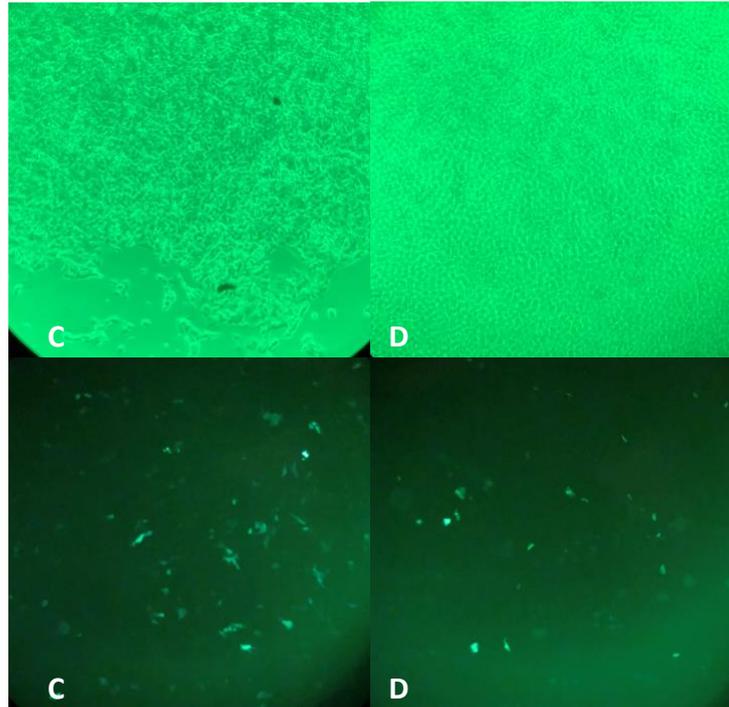


Figura 6 - Resultado de transfecção em células MDBK, campo superior enfatizando o total de células e o inferior somente com as células transfectadas. C. Células MDBK transfectadas usando o reagente Lipofectamine LTX e 500 ng do vetor pEF-GFP. D. Células MDBK transfectadas usando o reagente Xfect refrigerado e 500 ng do vetor pEF-GFP.

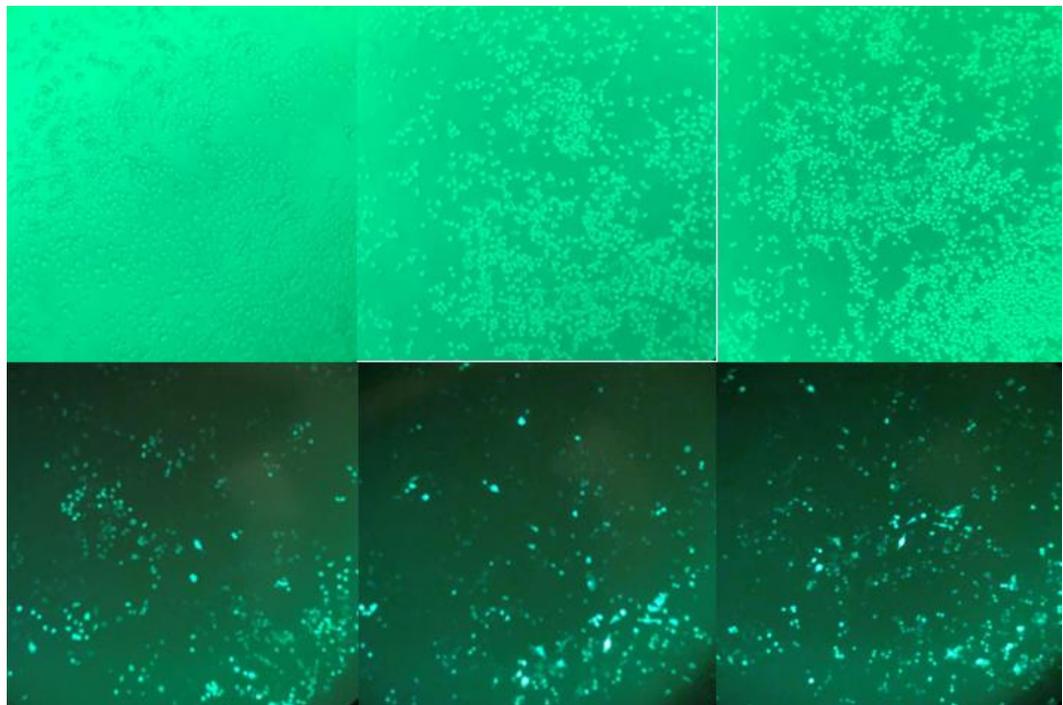


Figura 7 - Resultado de transfecção em células MDBK transfectadas usando o reagente Xfect congelado e 500 ng do vetor pEF-GFP, campo superior enfatizando o total de células e o inferior somente com as células transfectadas.

Tabela 5 - Resultado de transfecção em células MDBK usando 500 ng do vetor pEF-GFP para comparação de reagentes.

Reagentes	Mortalidade	% de células transfectadas	Intensidade da transfecção
Controle negativo	0	-	-
Lipofectamine 2000	30%	30%	Mediana
Lipofectamine LTX	30%	15%	Fraca
Xfect refrigerado	5%	10%	Fraca
Xfect congelado	50%	45%	Forte

Esses resultados condizem com a literatura, uma vez que é descrito a alta toxicidade celular de agentes de transfecção formados de políplexos (polímero-DNA) como o Xfect, proveniente do peso molecular e da densidade de cargas positivas (LIU et al., 2010). Além disso, outro fato que confirma os resultados obtidos quanto a intensidade e porcentagem da transfecção, é que os polímeros têm a capacidade de transportar uma quantidade alta de material genético para dentro da célula (DINCER et al., 2005).

#### 4.2 Ensaio de transfecção nas células MDBK para definir melhor concentração de DNA

Os resultados do ensaio para estabelecer a melhor concentração de DNA para transfecção estão apresentados na Figura 8 e na Tabela 6.

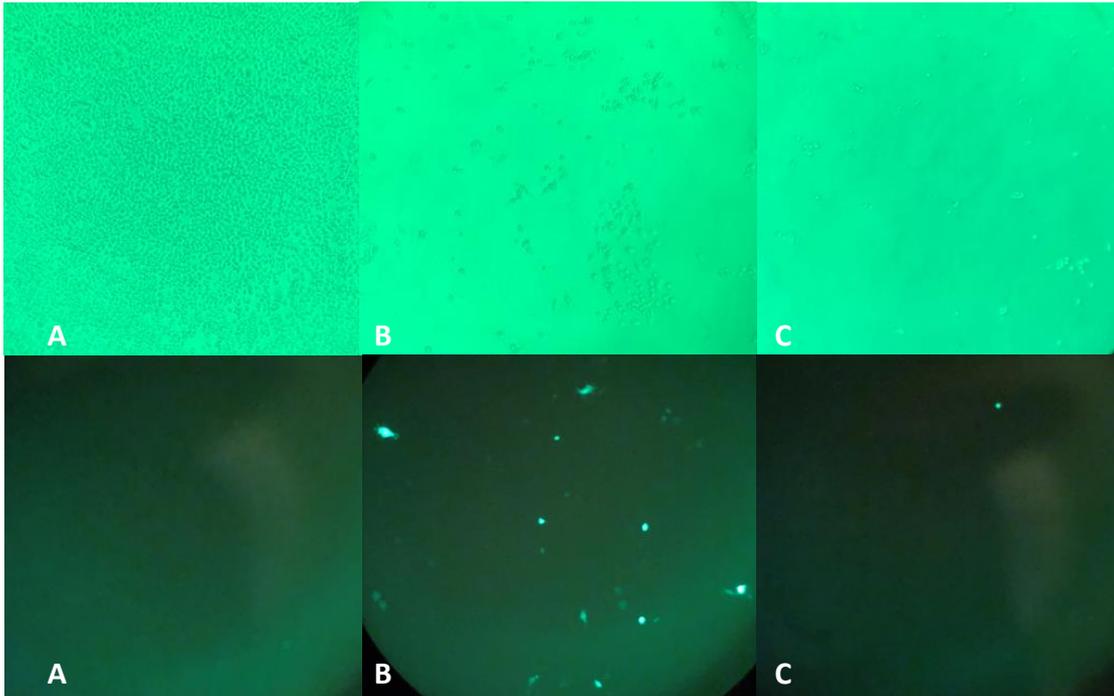


Figura 8 - Resultado de transfecção em células MDBK transfectadas usando o reagente Lipofectamine 2000, campo superior enfatizando o total de células e o inferior somente com as células transfectadas. **A.** Controle negativo apenas com o meio de cultivo. **B.** Células MDBK transfectadas usando 500 ng de pEF-GFP. **C.** Células MDBK transfectadas usando 1 µg de pEF-GFP.

Tabela 6 - Resultado de transfecção em células MDBK usando o reagente Lipofectamine 2000 para comparação de concentrações diferentes de DNA, usando 500 ng e 1 µg do vetor pEF-GFP.

Concentração de DNA	Mortalidade	% de células transfectadas	Intensidade da transfecção
Controle negativo	0	-	-
500 ng	85%	25%	Forte
1 µg	95%	1%	Fraca

Os resultados obtidos confirmam o estudo que afirmou que a quantidade de DNA interfere no efeito citotóxico da transfecção por lipossomas, como o Lipofectamine 2000. A explicação desse efeito se dá pela tentativa de manter as razões de cargas, uma vez que na preparação dos lipoplexos, se aumenta a quantidade de um, conseqüentemente aumenta a quantidade do outro, e a concentração obtida de lipídeos catiônicos são tóxicos para as células (OLIVEIRA, 2006).

#### 4.3 Análise da melhor célula para amplificação

O resultado da seleção da melhor célula para amplificação, pode ser observado na Figura 9, que mostra que as bandas do DNA genômico extraído das células de ovário ficaram

fracas, portanto, não seria vantajoso amplificar o DNA. Por outro lado, o gDNA de fibroblasto teve um bom resultado na extração, porém, na avaliação da transfecção no microscópio, pôde-se observar que não foi eficiente, sendo assim, as células de cúmulus são as mais vantajosas para amplificação, levando em conta sua apresentação no gel e a avaliação da transfecção.

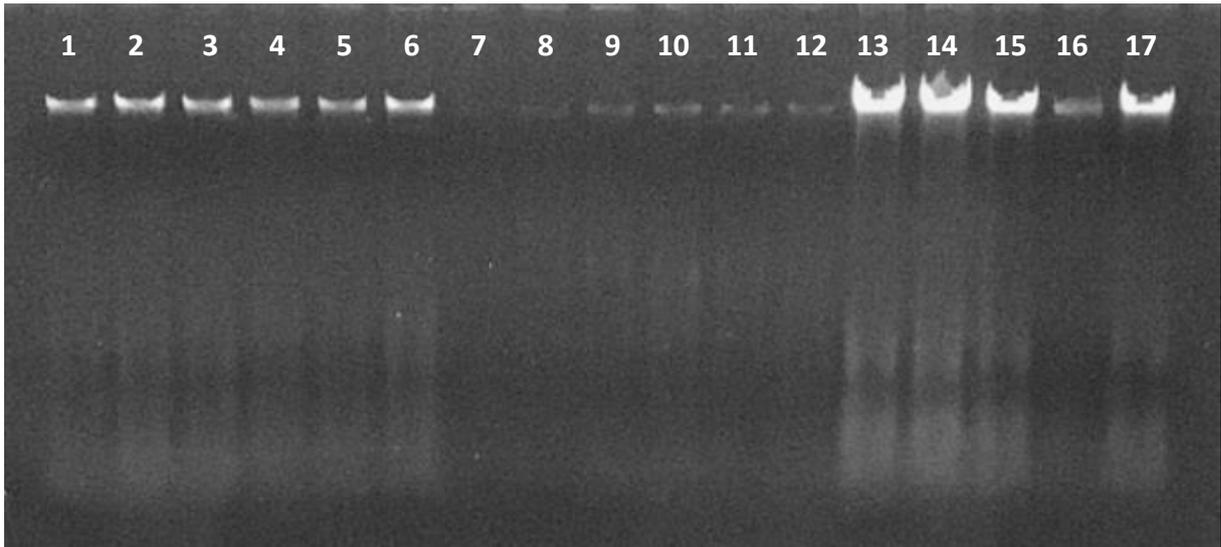


Figura 9 - Resultado da eletroforese em gel de agarose. Poços 1 a 6: 240 ng do DNA genômico extraído das células do cúmulus (120 ng/ $\mu$ L). Poços 7 a 12: 70 ng do DNA genômico extraído das células de ovário (17 ng/ $\mu$ L). Poços 13 a 17: 260 ng do DNA genômico extraído de fibroblasto (130 ng/ $\mu$ L).

Foi relatado que os agentes de transfecção apresentam comportamentos diferentes dependendo da origem celular, refletindo na eficiência da transfecção (DUZGUNES, 2001). Esse relato pode ser confirmado com os resultados obtidos na eletroforese dos DNAs genômicos das células do cúmulus, células de ovário e fibroblastos.

#### 4.4 Análise comparativa da melhor concentração de DNA para amplificação

A Figura 10 mostra que as diferentes concentrações utilizadas, 138,5 ng, 277 ng e 554 ng de DNA, não obtiveram diferenças significativas. Portanto, foi estabelecido um padrão de 200 a 300 ng para que a amplificação seja mais efetiva, visto que a maior concentração amplificou similarmente às demais, e não seria necessário usar em grandes quantidades.

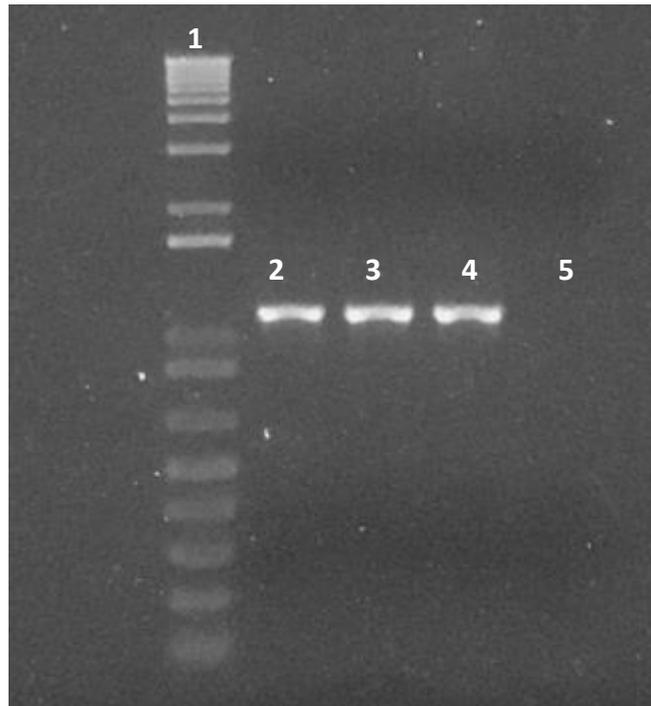


Figura 10 - Resultado da eletroforese em gel de agarose para comparar melhor concentração de DNA contendo amostras de PCR amplificados em fragmentos de 1116 pb. Poço 1: marcador 1kb DNA Plus Ladder Invitrogen. Poço 2: 138,5 ng de gDNA de fibroblasto. Poço 3: 277 ng de gDNA de fibroblasto. Poço 4: 554 ng de gDNA de fibroblasto. Poço 5: Branco (sem gDNA).

#### 4.5 Análise dos melhores primers para células de fibroblasto e cúmulus

A melhor combinação de primers varia de acordo com as células utilizadas, sendo assim, vários testes foram feitos até ser estabelecido um padrão de cada célula. Para fibroblasto (Figura 11), as bandas que apareceram mais fortes no gel de agarose são com as combinações de primers FWD3+REV5 (949pb) e FWD3+REV4 (1116pb), porém, padrão estabelecido foi da primeira combinação, pelo fato da segunda combinação formar fragmentos muito grandes, dificultando subsequentes processos de análise do ensaio de T7E1.

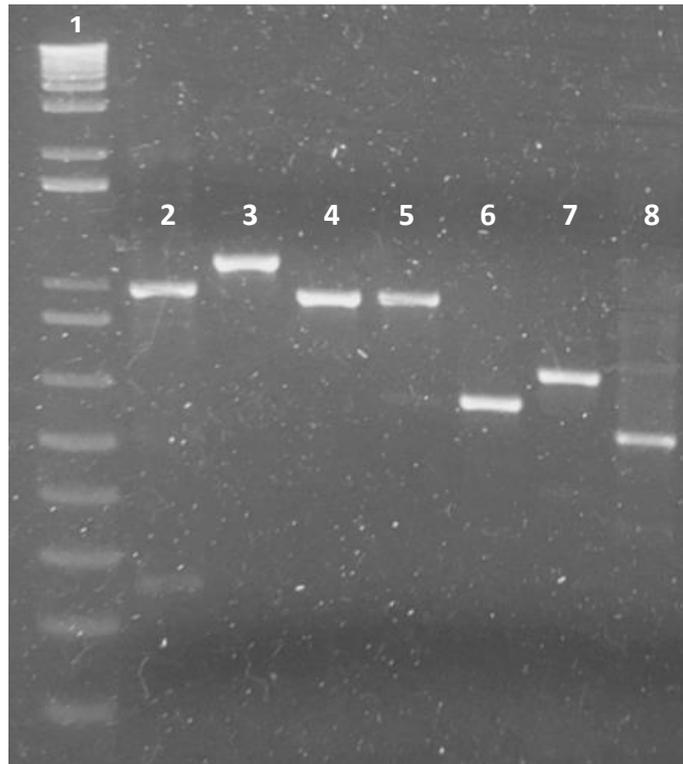


Figura 11 - Resultados da eletroforese em gel de agarose para comparar melhores primers, usando 277 ng de DNA genômico da extração de fibroblasto. Poço 1: marcador 1kb DNA Plus Ladder Invitrogen. Poço 2: FWD 3+ REV (985pb). Poço 3: FWD 3 + REV 4 (1116pb). Poço 4: FWD 3 + REV 5 (949 pb). Poço 5: FWD + REV 4 (952pb). Poço 6: FWD + REV 3 (614pb). Poço 7: FWD 3+ REV 2 (708 pb). Poço 8: FWD + REV 2 (540pb).

Para as células do cúmulus, os melhores resultados na interpretação do gel de agarose (Figura 12) foram as bandas com as combinações FWD + REV3 (614pb) e FWD + REV2 (540pb) não tendo uma diferença tão significativa entre as duas. Entretanto, o padrão escolhido foi do fragmento de 614 pares de base, pois o outro fragmento seria muito menor, dificultando a interpretação das etapas seguintes, como a digestão com T7.

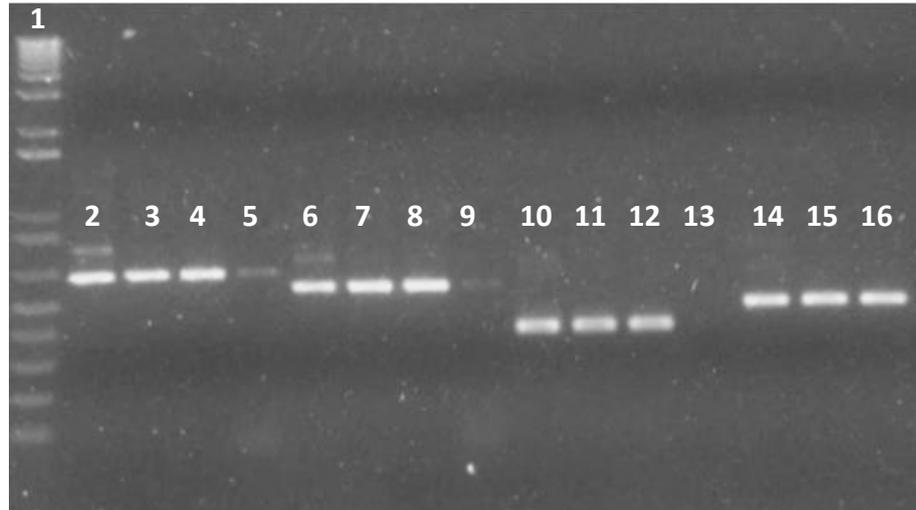


Figura 12 - Resultados da eletroforese em gel de agarose para comparar melhores primers, usando 252 ng de DNA genômico da extração de células do cúmulus. Poço 1: marcador 1kb DNA Plus Ladder Invitrogen. Poços 2 a 5: FWD + REV 3 (614pb). Poços 6 a 9: FWD + REV 2 (540pb). Poços 10 a 13: FWD 4 + REV 2 (365pb). Poços 14 a 16: FWD 4 + REV 3 (439pb).

#### 4.7 Análise comparativa entre gel de agarose corado com SYBR Safe e com Brometo de Etídio

O resultado da comparação dos corantes pode ser observado na Figura 13. Apesar do corante SYBR se apresentar mais forte no gel, o Brometo de Etídio foi mais sensível para bandas mais fracas, logo, bandas com menores concentrações, como a quarta diluição (0,25µL do produto do PCR), só poderiam ser observadas no gel com Brometo de Etídio.

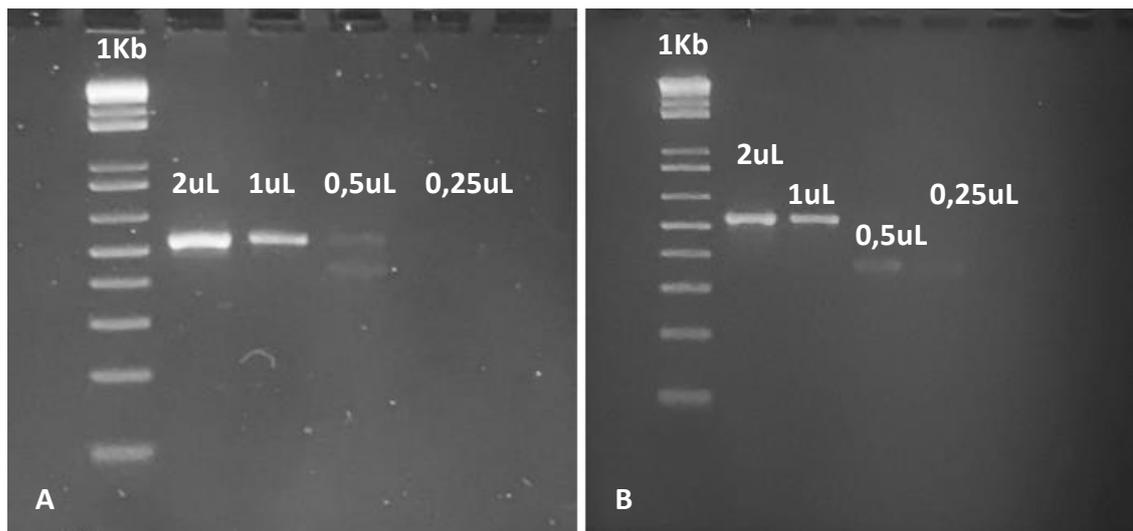


Figura 13 - Resultados da eletroforese em gel de agarose para comparar o corante fluorescente, usando 277 ng de DNA genômico da extração de fibroblasto amplificado em fragmentos de 614 pb. Os poços de cada imagem apresentam diferentes quantidades do produto do PCR. **A.** Gel corado com SYBR Safe. **B.** Gel corado com Brometo de Etídio.

#### 4.8 Análise da melhor concentração de reagentes para a amplificação

Com os resultados apresentados na Figura 14, os melhores parâmetros para amplificação são a utilização de 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,10μM de primer e 1U de Taq polimerase. Esse padrão foi estabelecido de acordo com a análise individual de cada reagente. Os testes estão descritos na Tabela X do tópico 3.7.5.

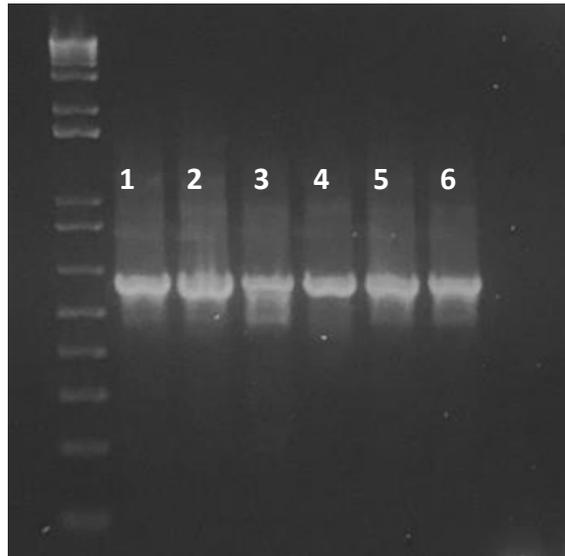


Figura 14 - Resultados da eletroforese em gel de agarose para comparar reagentes, usando Nested com os primers FWD + REV 3 (614pb) da diluição 1/100 do PCR com fragmento de 1116 pb e 124 ng de gDNA. Poço 1: teste 1. Poço 2: teste 2. Poço 3: teste 3. Poço 4: teste 4. Poço 5: teste 5. Poço 6: teste 6.

A quantidade e concentração de reagentes possui uma referência, mas pode variar de acordo com os experimentos e com os testes. A concentração ideal de MgCl<sub>2</sub> varia de 0,5 a 5mM, para os primers, a concentração ideal varia de 0,1 a 0,5 μM, e na Taq polimerase o ideal é de 0,5 a 2,5U (CURY et al., 2005). O padrão estabelecido durante a pesquisa foi por meio de testes empíricos, sempre obedecendo os valores de referência.

#### 4.9 Análise da temperatura de anelamento ideal no termociclador

Na Figura 15 mostra que não houve diferença significativa quanto às temperaturas de anelamento, porém, a concentração de DNA interviu no resultado, pois, uma grande quantidade de DNA genômico pode interferir na ação dos reagentes durante a amplificação

dependendo da temperatura de anelamento. Logo, foi estabelecido o padrão de TA de 60°C levando em consideração a média de temperatura ideal dos primers utilizados.

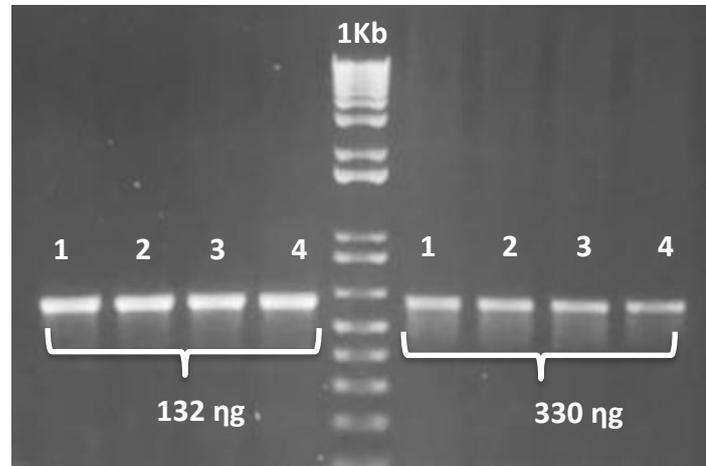


Figura 15 - Resultados da eletroforese em gel de agarose comparando diferentes temperaturas de anelamento com duas concentrações de gDNA de fibroblasto. Poços 1: 55°C. Poços 2: 56,9°C. Poços 3: 58,1°C. Poços 4: 60°C.

A temperatura de anelamento varia de acordo com os primers utilizados e seus desenhos, que podem ser obtidos através da literatura ou podem ser gerados pelo pesquisador por meio de programas específicos, possuindo sua  $T_m$  entre 55 e 90°C e a temperatura de anelamento ideal é sempre de 1 a 5°C abaixo da  $T_m$  (CURY et al., 2005). Durante a pesquisa alguns testes foram feitos, levando em consideração a  $T_m$  de cada primer, variando desde 62°C à 52°C, obteve-se como padrão final 60°C, a média de temperaturas ideais de todos os pares de primers.

#### 4.10 Análise da amplificação com MDBK

A amplificação do DNA extraído da transfecção com MDBK foi eficiente e pode ser observada na Figura 16. Os fragmentos estão do tamanho certo e as bandas mais claras que se encontram na altura de fragmentos de 100ng, de acordo com o peso molecular 1kb (Invitrogen) são apenas restos de primers. Após essa confirmação, foi realizado mais 5 ensaios de PCR para chegar ao volume final de 100µL de produtos para purificação dos amplicons para o ensaio de digestão com enzima T7E1.

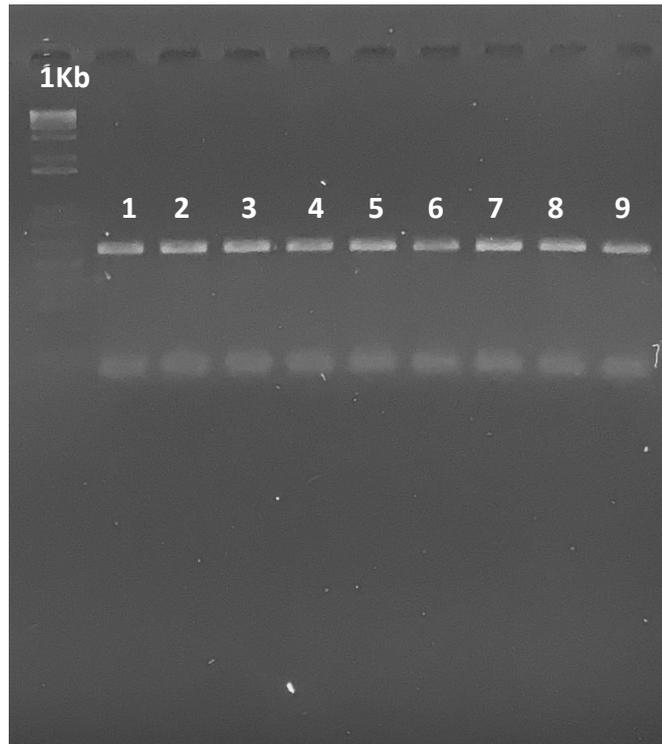


Figura 16 - Resultados da eletroforese em gel de agarose para análise da amplificação do gDNA com MDBK com os guias da Cas9. Poço 1: gRNA Bi1; Poço 2: gRNA Bi1b; Poço 3: gRNA Bi2; Poço 4: gRNA Bi3; Poço 5: gRNA Bi4. Poços 6 a 9: controles negativos (sem o guia da Cas9).

#### 4.11 Digestão com T7E1

As primeiras análises com a digestão de T7E1 foram feitas nas células do cúmulus, conforme apresentado na Figura 17. As bandas inferiores deveriam aparecer de acordo com as clivagens realizadas pela enzima no local do DNA onde há presença do guia, entretanto, as bandas apareceram até mesmo nos DNAs sem a presença de guia (amplicons selvagens - pEF-GFP e pX330E), utilizados como controle negativo. A presença dessas bandas fez com que a verificação da eficiência das mutações fosse dificultada, podendo concluir que nessa região do DNA há um polimorfismo nas células do cúmulus. O polimorfismo apresenta uma banda inferior à banda principal, impedindo que as bandas reais da digestão sejam observadas, portanto, optou-se por fazer todos os processos em uma outra célula sem polimorfismo, a MDBK, permitindo assim, que a ação e avaliação da T7E1 sejam efetivas.

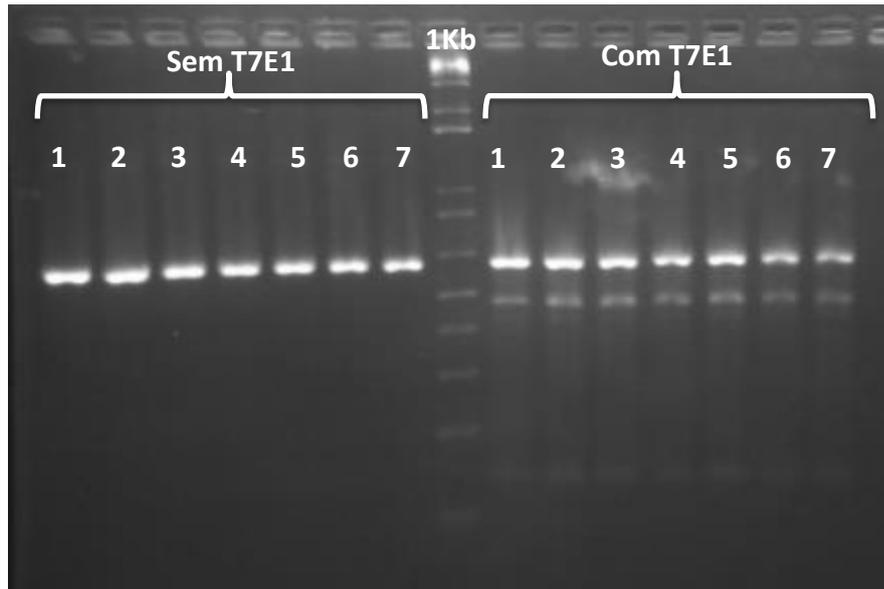


Figura 17 - Resultados da eletroforese em gel de agarose para avaliar digestão com T7E1 dos amplicons de cúmulus. Poços sem T7E1 para controle negativo de bandas. Poços de 1 a 5: Amplicons com os guias Bi's. Poços 6 e 7: Amplicons com os selvagens pEF-GFP e pX330E.

A ação da T7 permite detectar os alelos mutantes no DNA, entretanto, há alguns problemas que podem ser enfrentados durante esse processo, dificultando as análises, por conta de situações criadas durante a amplificação da PCR ou até mesmo por conta de um polimorfismo das células utilizadas (VOUILLOT et al., 2015). Apesar de não ser muito comum, durante a pesquisa foi encontrado uma “banda fantasma” que não deveria existir, e como hipótese foi sugerido um polimorfismo nas células do cúmulus, fazendo com que toda a conduta fosse alterada, com a intenção de alcançar a atividade ideal da enzima. A utilização de outra célula foi uma alternativa viável e rápida para que a pesquisa continuasse, porém, ainda há a possibilidade de não funcionar como deveria, fazendo com que seja necessário fazer alguns testes com outras enzimas.

O ensaio da T7E1 com os amplicons MDBK foi realizado por partes e o experimento ainda está em andamento, mas os resultados iniciais podem ser observados na Figura 18 e não foram satisfatórios, visto que nenhum amplicon com o guia da Cas9 apresentou banda de edição. Os outros guias também serão testados, e caso nenhum mostre efetividade, os vetores com a Cas serão sequenciados para verificar se estão corretos.

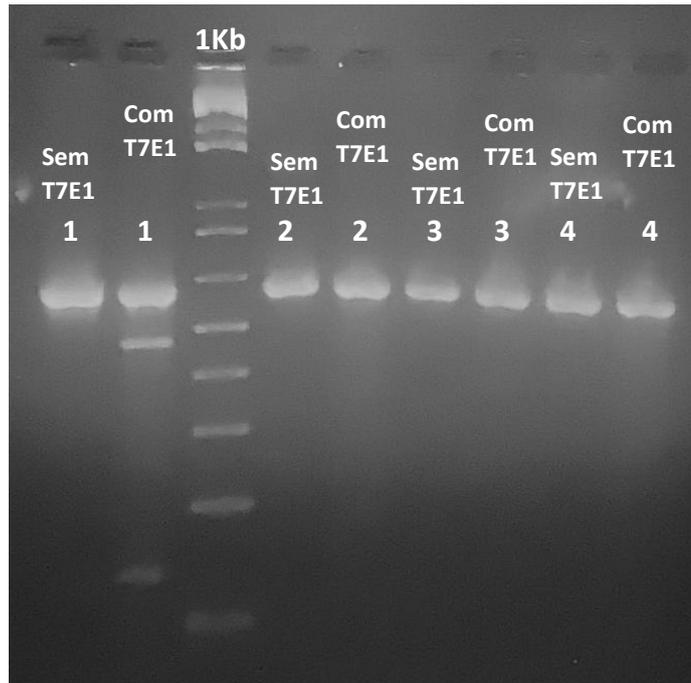


Figura 18 - Resultados da eletroforese em gel de agarose para avaliar digestão com T7E1 dos amplicons de MDBK. Poços sem T7E1 para controle negativo de bandas. Poços de 1: controle positivo da T7E1. Poços 2: Amplicons com os selvagens pX330E. Poços 3: Amplicons com Bi1. Poços 4: Amplicons com Bi3.

Os seguintes processos serão desenvolvidos como continuação da pesquisa, mas ainda não foram realizados. Após a confirmação da edição e a escolha do melhor guia para Cas9, o ensaio de transfecção será feito com gene repórter GFP flanqueado pela sequência PITcH e braços de microhomologia, com o intuito de se obter inserções estáveis do cassete GFP no *locus* H11. Posteriormente, as células editadas serão isoladas para criação de linhas de células monoclonais e submetidas à triagem para sequenciamento (amplificação por PCR e clonagem molecular).

Após sequenciar o gene editado e estimar a eficiência de integração do gene no genoma bovino, iniciará a produção de embriões editados in vitro, que serão avaliados no decorrer do desenvolvimento embrionário, por meio de extração de gDNA, PCR e sequenciamento.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho demonstrou que os testes e análises para padronização dos procedimentos e a escolha dos melhores parâmetros são extremamente importantes, uma vez que os métodos realizados com fibroblastos e cúmulus tiveram que ser repetidos com uma nova célula MDBK, para que fosse possível a avaliação da edição pelo ensaio de T7E1. Como as melhores condições já haviam sido estabelecidas, o processo com MDBK foi muito mais rápido e possibilitando novas análises.

Pode-se concluir também que a origem da célula transfectada é muito importante, já que cúmulus apresentou bandas indesejadas com a digestão por T7E1 e impossibilitou a análise de edição. Como as células do cúmulus eram advindas de diferentes animais (pool de células), não havia o controle do genoma celular, por isso uma melhor escolha seria os fibroblastos que eram de um animal apenas ou as células MDBK que é uma linhagem monoclonal de células de rim bovino.

Quanto a transfecção, o melhor reagente foi o Xfect armazenado no congelador que apesar de não apresentar uma mortalidade celular ideal, foi o reagente que mais transfectou. Ademais, as melhores células foram cúmulus e MDBK, porém ambas não se mostraram eficientes no ensaio com T7E1 nos testes realizados. Fibroblasto obteve uma transfecção fraca e por isso não foi a escolhida para os procedimentos seguintes.

Além disso, ficou comprovado também a importância de um controle positivo com DNA de células não transfectadas, a fim de evitar interpretações de falsos positivos, como ocorreu com as células do cúmulus. Outro fator muito importante é o controle positivo da enzima T7E1, pois a ausência de fragmentos digeridos pode ser uma ausência de INDELS, assim como mal funcionamento da T7E1 durante a digestão. Uma outra alternativa para confirmação de edição seria sequenciamento SANGER, porém não é tão rápida e com um custo muito superior quando comparado com os ensaios de T7E1.

A confirmação da expressão heteróloga de genes de interesse e da edição genômica não foi possível até o momento, mas pode-se concluir que a técnica de CRISPR é uma ferramenta de fácil execução e relativamente rápida, e com os melhores parâmetros definidos, válida a abordagem para experimentos futuros, e até mesmo para finalização desse projeto com um tempo menor de execução.

## REFERÊNCIAS

AMOASII, L.; HILDYARD, J.C.W.; LI, H.; SANCHEZ-ORTIZ, E.; MIREAULT, A.; CABALLERO, D.; HARRON, R.; STATHOPOULOU, T.R.; MASSEY, C.; SHELTON, J.M.; BASSEL-DUBY, R.; PIERCY, R.J.; OLSON, E.N. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. **Science**, v. 362, p. 86- 91, 2018.

BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, abr./jun., 2007.

BEVACQUA, R.J.; MARTÍN, R.F.; SAVY, V.; CANEL, N.G.; GISMONDI, M.I.; KUES, W.A.; CARLSON, D.F.; FAHRENKRUG, S.C.; NIEMANN, H.; TABOGA, O.A.; FERRARIS, S.; SALAMONE, D.F. Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. **Theriogenology**, v. 86, p. 1886- 1896, 2016.

CANÇADO, P.H.D.; CATTO, J.B.; SOARES, C.O.; MIRANDA, P.; VALENTIM, T.; PIRANDA, E. M. Controle parasitário de bovinos de corte em sistemas de integração. **Embrapa Gado de Corte- Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2019.

COSTA, C.P.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; GOISSIS, M.D. Sistema CRISPR/Cas9 e perspectivas de aplicações na cadeia produtiva animal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 45, n. 1, p. 18-32, 2021.

CURY P. R., FURUSE C., ARAÚJO N. S. Técnica e aplicação da reação da polimerase em cadeia na área odontológica. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 26, n. 2, p. 34-39, 2005.

DINCER, S.; TÜRK, M.; PIŞKIN, E. Intelligent polymers as nonviral vectors. **Gene Ther**, v. 12, p. 139-145, 2005.

DUZGUNES, N.; SIMÕES, S. et al. Gene Delivery by Cationic LiposomeDNA Complexes. **Polymeric Biomaterials**, p. 943-957, 2001.

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

GOUGH, J. M. et al. New isolates of *Bacillus thuringiensis* for control of livestock ectoparasites. **Biol Control**, v. 23, p. 179-189, 2002.

HSU, C. Y. M.; ULUDAĞ, H. A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine. **Nature protocols**, v. 7, n. 5, p. 935–45, abr. 2012.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agropecuária: rebanho de bovinos**, 2019. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 1, p. 23-28, 1990.

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**, v. 337, p. 816-821, 2012.

JÚNIOR, J.M.B.O.; CALVÃO, L.B. As ciências biológicas e a construção de novos paradigmas de conhecimento. Ponta Grossa, PR: **Atena Editora**, 2019.

KIM, T.K.; EBERWINE, J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future. **Anal. Bioanal. Chem**, v. 397, p. 3173-3178, 2010.

LAKSHMIPATHY, A.; PELACHO, B.; SUDO, K.; LINEHAN, J. L.; COUCOUVANIS, E.; KAUFMAN, D. S.; VERFAILLIE, C. M. Efficient Transfection of Embryonic and Adult Stem Cells. **Stem Cells Journals**, v. 22, n. 4, p. 531-543, 2008.

LI, G.; ZHANG, X.; WANG, H.; MO, J.; ZHONG, C.; SHI, J.; ZHOU, R.; LI, Z.; YANG, H.; WU, Z.; LIU, D. CRISPR/Cas9 mediated integration of large transgene into pig potential safe harbor. **G3 (Bethesda)**, v. 10, p. 467–473, 2020a.

LI, H.; LI, Z.; XIAO, N.; SU, X.; ZHAO, S.; ZHANG, Y.; CUI, K.; LIU, Q.; SHI, D. Site-specific integration of rotavirus VP6 gene in rabbit  $\beta$ -casein locus by CRISPR/Cas9 system. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**. v. 55, n. 8, p. 586-597. 2019a.

LI, M.; Dai, S.; Liu, X. et al. A detailed procedure for CRISPR/Cas9-mediated gene editing in tilapia. **Hydrobiologia**, 2020b.

LI, W.; TENG, F.; LI, T.; ZHOU, Q. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. **Nature Biotechnology** v. 31, p. 684–686, 2013.

LI, X.; HAO, F.; HU, X.; WANG, H.; DAI, B.; WANG, X.; LIANG, H.; CANG, M.; LIU, D. Generation of T $\beta$ 4 knock-in Cashmere goat using CRISPR/Cas9. **International J Biol Sci**, v. 15, p. 1743-1754, 2019b.

LIMA, L.M. Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular. **Embrapa - Campina Grande**, 2008.

LIU, Z.; ZHANG, Z.; ZHOU, C.; JIAO, Y. Hydrophobic modifications of cationic polymers for gene delivery. **Prog Polym Sci**, v. 35, n. 9, p. 1144-1162, 2010.

MARTINEZ-OLIVA, B.G. Crispr, una herramienta para editar genomas. **Gaceta Médica Boliviana**. v 43. n 2. 2020.

MENEZES, T.; BACHA, C. Mudanças nos destinos das exportações brasileiras de carne bovina. **Revista de Política Agrícola**, v. 29, n. 2, 2020.

NIU, Y. et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. **Cell**, v. 156, p. 836–843, 2014.

OLIVEIRA, A. C. **Desenvolvimento de complexos catiónicos lipossomaDNA para terapia génica em osteoblastos**. Dissertação do grau de mestre em Engenharia Biomédica. Porto, 2006.

PARKER, A.; NEWMAN, C.; BRIGGS, S.; SEYMOUR, L.; SHERIDAN, P. Nonviral Gene Delivery: Techniques and Implications for Molecular Medicine. **Expert reviews in molecular medicine**. 2003.

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, U. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated transgene knockin at the H11 locus in pigs. **Scientific Reports**, 2015.

SILVA, L.G. da; MARION FILHO, P.J.; CAMPOS, I. A dinâmica das exportações brasileiras de carne bovina (1994-2005). **Revista de Estudos Sociais**, v. 10, p. 23-49, 2008.

The Nobel Prize in Chemistry, 2008. Disponível em: [<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/summary/>](https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/summary/).

VIEDMA, I. Present and future of CRISPR/Cas system in Biotechnology. **Biotecnología Aplicada**. v 35. n 2. 2018.

VOUILLOT, L.; THÉLIE, A.; POLLET, N. Comparison of T7E1 and Surveyor Mismatch Cleavage Assays to Detect Mutations Triggered by Engineered Nucleases. **G3 Genes|Genomes|Genetics**, v. 5, n. 3, p. 407-415, 2015. Disponível em: [.<https://academic.oup.com/g3journal/article/5/3/407/6058723>](https://academic.oup.com/g3journal/article/5/3/407/6058723).

WANG, H. et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. **Cell**, v. 153, p. 910–918, 2013a.

WANG, W.; LI, W.; MA, N.; STEINHOFF, G. Non-viral gene delivery methods. **Curr Pharm Biotechnol**. v. 14, n. 1, p. 46-60. 2013b.

YAMASHITA, M.;VARGAS, L.; MELO, E. Characterization of the regulatory 5'-flanking region of bovine mucin 2 (MUC2) gene. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 2021.

YUAN T, ZHONG Y, WANG Y, ZHANG T, LU R, ZHOU M, LU Y, YAN K, CHEN Y, HU Z, LIANG J, FAN J, CHENG Y. Generation of hyperlipidemic rabbit models using multiple sgRNAs targeted CRISPR/Cas9 gene editing system. **Lipids Health Dis**, v. 18, p. 69, 2019.

ZIMMER M. **GFP: Green Fluorescent Protein**, 2015. Disponível em: [.<https://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>](https://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm).