



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UnICEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

MARIANA GONÇALVES ROCHA
MARIANA LOUZADA FERREIRA

**EDIÇÃO GENÔMICA EM CÉLULAS E EMBRIÕES BOVINOS USANDO O SISTEMA
CRISPR/CAS9**

BRASÍLIA
2020



MARIANA GONÇALVES ROCHA
MARIANA LOUZADA FERREIRA

**EDIÇÃO GENÔMICA EM CÉLULAS E EMBRIÕES BOVINOS USANDO O SISTEMA
CRISPR/CAS9**

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

Orientação: Andrei Antonioni Guedes Fidelis.

BRASÍLIA
2020

RESUMO

Um novo sistema de edição genômica foi desenvolvido com base na descoberta de um sistema de imunidade adaptativa presente em bactéria contra ácidos nucléicos invasores, comumente de origem viral. Esse sistema consiste em uma clivagem de DNA por nucleases, dirigido para sequências genômicas específicas, e usa o simples pareamento de bases entre um RNA guia (gRNA), associado a uma nuclease específica do sistema Cas (CRISPR associated system), e a uma sequência alvo de DNA. Tal característica permite a manipulação direta sítio-específica do genoma, recebendo o nome de edição genômica. Dessa forma, o desenvolvimento e o estudo desse sistema abrem caminho para descobertas fundamentais na biologia, com aplicações em todos os ramos da biotecnologia, bem como estratégias para a terapêutica humana, e também a inserção de fenótipos com potencial impacto positivo na pecuária nacional, usando uma técnica inédita no Brasil.

Palavras-Chave: CRISPR/Cas9. Edição genômica. Biotecnologia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVO.....	7
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
4. METODOLOGIA	11
4.1 MINIPREP	11
4.2 CULTIVO E CONTAGEM DE FIBROBLASTOS BOVINOS	11
4.3 TRANSFEÇÃO DE FIBROBLASTOS BOVINOS	12
4.4 EXTRAÇÃO DE DNA DOS FIBROBLASTOS BOVINOS.....	13
4.5 PCR	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
7. REFERÊNCIAS	17

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia é uma área de extrema relevância na pecuária brasileira, atuando diretamente na obtenção de ganhos tanto para os animais quanto para os produtores. O Brasil é o país que possui, atualmente, o maior rebanho comercial bovino do mundo, além de ser o maior exportador de carne bovina. Com o avanço dessa atividade, a tecnologia acabou se tornando ainda mais necessária, novos métodos tecnológicos surgiram, dentre eles, a produção de animais geneticamente modificados (AGM) que venham oferecer soluções para diversos empecilhos de produtividade e sanidade animal.

Uma das técnicas mais recentes e promissoras de edição de genomas é o sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) / Cas (*Crispr Associated System*), que é capaz de direcionar nucleases a um sítio específico do genoma, provocando cortes exatos no DNA (edição genômica). A grande vantagem desse sistema é que ele usa o simples pareamento de bases entre um RNA guia (gRNA), associado a uma nuclease específica do sistema Cas, e a sequência-alvo de DNA (Pennisi, 2013), diferenciando-se dos outros métodos de edição gênica existentes (RAN *et al.*, 2013).

Atualmente, a simplicidade e a especificidade desse sistema, com baixas taxas de clivagens *off-target* (cortes não específicos) e a possibilidade de permitir que o pesquisador crie centenas de nucleases customizadas a um baixo custo, o torna o sistema mais promissor como ferramenta de edição genômica. Diante do exposto, diversos autores brasileiros e estrangeiros iniciaram pesquisas sobre o novo sistema. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) constrói no Distrito Federal uma notável história em biotecnologia e reprodução animal, o pesquisador Dr. Eduardo O. Melo iniciou pesquisas nessa área a fim de obter resultados na edição genômica em células e embriões bovinos usando o sistema CRISPR/Cas9.

Com esse projeto, visamos investigar o uso do sistema CRISPR/Cas9 para estabelecimento de uma metodologia de edição genômica objetivando a inserção (*Knockin*) direta de genes de interesse biotecnológico, agropecuário, ou industrial no *locus* H11 do genoma bovino. Para esse fim, é necessária a construção de vetores que contém o gRNA direcionado ao *locus* H11, a enzima Cas9 e o gene repórter eGFP.

Transfectar linhagens de células bovinas com os vetores construídos. Isolar linhagens celulares bovina com a inserção do gene eGFP no *locus* H11 do genoma bovino e avaliar a eficiência da inserção com ou sem o uso de MMJE. E também, micro-injetar as construções que melhor funcionaram nos ensaios com células em ovócitos e zigotos bovinos e avaliar a expressão de GFP durante o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto.

2. OBJETIVO

Para esclarecer tal tema, foi sondado o estudo de pesquisas simples e iniciais para atingir o objetivo final. Foram feitas separações de DNA, cultivos celulares, transfecções e PCR's com a finalidade de observar se o sistema de defesa bacteriano CRISPR/Cas9, direcionado pelo RNA guia complementar a sequência do *locus* H11, será capaz de introduzir genes de interesse em um sítio específico e seguro do genoma bovino com uma eficiência superior a observada para a recombinação homóloga tradicional.

Geral:

Estabelecer e avaliar o uso da ferramenta de edição Genômica CRISPR/Cas9 para a inserção (*Knockin*) do gene repórter eGFP no *locus* H11 de células e embriões bovinos.

Específicos:

- 1) Construir os vetores contendo o gRNA direcionado ao *locus* H11, a enzima Cas9 e o gene repórter eGFP.
- 2) Transfectar linhagens de células bovinas com os vetores construídos.
- 3) Isolar linhagens celulares bovinas com a inserção do gene eGFP no *locus* H11 do genoma bovino e avaliar a eficiência da inserção com ou sem o uso de MMJE.
- 4) Micro-injetar as construções que melhor funcionaram nos ensaios com células em ovócitos e zigotos bovinos e avaliar a expressão de GFP durante o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O sistema CRISPR/Cas9 é atualmente o método de eleição para edição genômica em estudos animais. É uma técnica simples, conveniente e flexível de manusear, constituída por uma endonuclease proteína cuja especificidade de segmentação de DNA e a atividade de corte podem ser programadas por um curto guia de RNA (ADLI, 2018). O emprego desse modo evita a imposição de um desenho de proteína para desenvolver uma nuclease local-específica em uma sequência alvo de DNA, que solicita apenas a produção de um novo pedaço de RNA. Isso descomplica drasticamente e diminui bastante o tempo fundamental para a edição de genes dirigida e implementação (CARNEY, HARPER, LINO, TIMLIN, 2018).

Portanto, para o sistema é necessário apenas uma proteína, Cas9, com finalidade de para fazer escanear, ligar e clivar a sequência-alvo de DNA. Ao utilizar o sistema de plasmídeo CRISPR, a proteína Cas9 é manifestada em altos níveis no zigoto e, quando transmitido para as células filhas, esta atividade insistente do complexo Cas9-sgRNA resulta em mosaicismos genéticos, classificados como a existência de mais de dois alelos em um indivíduo (MEHRAVAR, NAZARI, SHIRAZI, 2019). É comumente observada após microinjeção de CRISPR em zigotos e é julgada indesejável, uma vez que reduz muito as oportunidades para geração direta de *knock-out* por *indels* gerados aleatoriamente. (LAMAS-TORANZO et al., 2019).

O cultivo celular foi desenvolvido como um processo com o objetivo de entender o comportamento das células animais *in vivo* em um ambiente controlado. Esse método continua sendo uma ferramenta prestigiada nos laboratórios de pesquisa no mundo inteiro. O cultivo de células é uma representação do meio fisiológico que, por mais perto da realidade seja, ainda causa distúrbios no crescimento celular, por não possuir particularidades de um tecido *in vivo*. As células que uma vez se proliferavam em um ambiente tridimensional, agora crescem em um meio bidimensional, por isso a eleição de um ambiente ideal é importante para a obtenção de uma cultura que manifeste uma função específica. (ALVES, GUIMARÃES, 2010)

Porém, ainda há muitos benefícios no uso do cultivo celular como amostra experimental. As principais vantagens são a possibilidade do controle ambiental, homogeneidade da amostra e o baixo custo da técnica. Os fibroblastos bovinos são

considerados células aderentes, ou seja, precisam aderir em uma superfície de contato para iniciar a replicação, que são as garrafas de cultura. Esse frasco é utilizado por apresentar uma carga negativa, que é importante pois a adesão das células sucede por meio de forças eletrostáticas e interação de cargas com glicoproteínas e cátions, que estimula uma sinalização intracitoplasmática que induzirá na elaboração e exocitose de proteínas da matriz extracelular da célula, onde ela irá aderir e assim iniciar sua multiplicação. (ALVES, GUIMARÃES, 2010)

Com base nisso, usa-se a transfecção nas células cultivadas *in vitro*. É um método de introdução do plasmídeo de interesse em células de mamíferos, uma ferramenta elementar para análise de expressão gênica. Existem vários métodos de transfecção e o uso de lipossomos tem se apresentado como possibilidade. É de fácil manipulação, eficaz e acessível, quando comparado a eletroporação e microinjeção. Porém, para uma transfecção eficaz precisa ser de alta eficiência e altos graus de expressão com baixa citotoxicidade. Dessa forma, há o índice de transfecção (TI), que correlaciona a expressão do gene e a eficiência da transfecção, que é inversamente proporcional à citotoxicidade, logo reagentes menos tóxicos têm maior índice de transfecção. (BROWN *et al.*, 2007).

Além disso, a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) permite a síntese de um segmento de DNA de eleição, produzindo uma grande quantidade de cópias, chamadas de *amplicons*, a partir de uma concentração de alíquota inicial pequena. Para que a amplificação seja efetiva, é necessário o uso de componentes Para tal fim, existem os estágios dos ciclos de PCR, que consiste em desnaturação, anelamento e extensão (livro métodos). A primeira fase é a de desnaturação, cuja temperatura é a mais alta (95°C) e tem como objetivo quebrar as pontes de hidrogênio que ligam a dupla-hélice, e facilitar a ligação de outros componentes ao tornar as sequências acessíveis. Logo após, no anelamento a temperatura é diminuída para que seja pareado dos primers ao DNA-alvo. E por fim, na fase de extensão consta a síntese de um *amplicon* catalisada pela TAQ polimerase, a partir de inserção de dNTPs específicos na nova fita. Essa variação de temperatura se dá em apenas um ciclo, com isso é realizado vários ciclos produzindo os *amplicons* de interesse de uma maneira exponencial. Dessa forma, para que a técnica seja sucedida é indispensável o uso de elementos como a enzima TAQ polimerase, responsável pela síntese de uma nova fita de DNA, ativada a temperaturas

a partir de 70°C. Outro substrato a ser utilizado são os desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) de DNA livres e específicos para a formação dos amplicons desejados. Também aplica o tampão de reação com $MgCl_2$ com o intuito de estabilizar o pH da reação, a fim de aprimorar a eficácia da reação. (BIANCO, LIPAY, 2015)

Acrescenta-se também os *primers*, também chamados de oligonucleotídeos iniciadores, por apresentarem uma curta sequência de DNA, normalmente de 20 nucleotídeos. São caracterizados de ponto de *start* da replicação dos *amplicons*, uma vez que os *primers* vão se ligar a um sítio específico do DNA da amostra e assim induzir a enzima TAQ inicie a replicação da sequência almejada. Ao se anelar a uma fita única de DNA 3'-5', o *primer* tem sua sequência complementar e por isso é essencial uma dupla desses iniciadores, denominados *forward* (FWD) iniciado em 5' e o *reverse* (REV) iniciado em 3'. (GIRARDI, 2018)

4. METODOLOGIA

4.1 MINIPREP

Uma colônia de bactérias é proveniente de uma só célula, e cada bactéria carrega múltiplas cópias do plasmídio que por sua vez carrega o gene clonado inserido em si, quando se faz um MINIPREP de um plasmídio obtém-se então suficiente número de cópias desse gene para manipulações químicas.

Para a realização do MINIPREP, foi necessário deixar crescer 1,5 mL de cultura (LB + Amp 100 µg/ml) em tubos de 15 mL, overnight a 37°C/260rpm. Após, transferiu-se 1,5 mL de cultura para tubo eppendorf e subsequente spin na microcentrífuga (13K rpm/2min), descartando o meio sobrenadante.

Os tubos foram lavados em vortex com 1 mL de PBS. Logo após, foram colocados na microcentrífuga (13K rpm/2min), descartando o sobrenadante e, re-suspendidos (vortex) em 100 µl TE + RNase (10 - 20 µg/ml).

Foram adicionados 200 µl de NaOH/SDS, misturando-o gentilmente (12x) e incubando-o por 5 minutos em RT. Adicionou-se 150 µl de KoAc gelado, misturando-o gentilmente (12x) e incubando-o por 5 minutos em RT. Em seguida, foram colocados na microcentrífuga (13K rpm/10min), salvando o sobrenadante em um novo tubo e descartando o pellet.

Adicionou-se 350 µl de iso-propanol ao sobrenadante, invertendo o tubo 12x para misturar e, depois, incubados em RT por 10 minutos. Finalizados os passos anteriores, os tubos foram colocados na microcentrífuga (13K rpm/20min) a 4°C, descartando o sobrenadante. O pellet foi lavado com 1 mL de EtOH 70% e os tubos inseridos na microcentrífuga novamente por 10 segundos.

Por fim, o sobrenadante foi removido com uma micropipeta e o pellet, depois de seco, re-suspendido em 50 µl de água ficando overnight na geladeira.

4.2 CULTIVO E CONTAGEM DE FIBROBLASTOS BOVINOS

O cultivo de fibroblasto bovino foi feito em uma garrafa de cultivo de x mL com 2 mantidos na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Para efetuar a contagem das células foi descartado o meio presente, depois lavado com 2 mL de PBS e logo em seguida

descartado novamente. Após foi aplicado 1 mL de tripsina e guardado na estufa por 10 minutos. Após o tempo recomendado foi adicionado 1 mL de **meio**.

Para a contagem de células foi utilizado a forma direta, por meio da câmara de Neubauer. Contou-se somente os quatro quadrados externos, constituído por mais 16 quadrados menores. Juntou-se 50 µl da tripsina+meio contidos na garrafa com 150 µl de PBS aquecido. Em seguida adicionou 10 µl dessa mistura na câmara de Neubauer. A partir do número obtido na contagem, o número de células por mL foi ditado por uma equação: $Q_1+Q_2+Q_3+ Q_4 / 4 \times 10^4 \times \text{fator de diluição}$.

4.3 TRANSFEÇÃO DE FIBROBLASTOS BOVINOS

A transfecção é uma técnica de introdução de genes estranhos em células para a produção de células geneticamente modificadas. Durante a realização da pesquisa, foram utilizados fibroblastos bovinos na transfecção. Antes de iniciar o processo de transfecção é feito o cultivo e a contagem dos fibroblastos, observando sempre a confluência da amostra (quantidade de células na garrafa). Para iniciar a transfecção, é necessário realizá-la em um fluxo estéril, deixando 15 minutos na luz UV antes de iniciá-la e, depois de finalizada a limpeza, separar alguns reagentes que serão utilizados, são eles: Opti-MEM, LTX, PLUS, DMEM e os DNA's de interesse.

Primeiramente, foi separado 3 tubos eppendorf e acrescentados 120 µl de Opti-MEM em um (tubo A), 60 µl em outro (tubo B) e 20 µl em 3 tubos (tubo 1, tubo 1b e tubo GFP).

Logo após, foram separados 3 tubos e acrescentados 3,6 µl de DNA em um tubo 1, 3,6 µl de um DNA diferente no tubo 1b e 3,6 µl de eGFP no eppendorf GFP. No tubo B foi adicionado 3 µl de PLUS, e no tubo A, 9 µl de LTX.

Em seguida, foram pipetados 20 µl do tubo B em cada um dos tubos de DNA (1,1b e GFP), e esperados 5 minutos. Após os 5 minutos, foram inseridos 40 µl do tubo A em cada um dos tubos de DNA e esperados mais 20 minutos.

Posteriormente, foram adicionados 420 µl de Opti-MEM em cada tubo de DNA (1, 1b e GFP), foram estimulados com movimentos leves e colocados 250 µl dessa mistura em cada poço de uma placa de petri que foi deixada 4 horas na estufa de cultura bacteriológica.

Por fim, depois das 4 horas, o meio que estava na placa de petri foi retirado da estufa e foram adicionados 500 µl de DMEM-USO nos poços da placa e colocados de volta na estufa.

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA DOS FIBROBLASTOS BOVINOS

Com a finalidade de extrair o DNA dos fibroblastos transfectados, foi feito o uso de um kit de extração de DNA (PureLink). Inicialmente, foi realizado o preparo do banho maria a 55°C, e a centrifugação das células com sua ressuspensão em 200 µl de PBS. Logo após, foram adicionados 20 µl de proteinase K com mais 20 µl de RNase A.

Com o auxílio de um Vortex, a mistura foi incubada a RT (room temperature) por 2 minutos. E depois, foram adicionados 200 µl de *purelink genomic lysis/binding buffer* e misturados novamente no vortex até homogeneizar, incubando a 55°C por 10 minutos. Adicionou-se 200 µl de etanol 96-100%, misturando no vortex por mais 5 segundos.

Depois de todos esses processos, a mistura foi passada na coluna PureLink e centrifugada por 1 minuto. Em novos tubos de coleta, foram adicionados 500 µl de Whas buffer 1 e centrifugados por 1 minuto.

Em novos tubos de coleta, adicionou-se 500 µl de Whas buffer 2 e foram centrifugados por mais 3 minutos. Os tubos de coleta foram descartados e as colunas colocadas em novos tubos.

Nos novos tubos de coleta, foram adicionados 100 µl de Evolution buffer e, por fim, foram incubados a RT por 1 minuto e centrifugados por mais 1 minuto.

4.5 PCR

PCR é uma técnica usada para fazer várias cópias de um segmento de DNA de interesse (Amplicon), gerando uma quantidade grande de cópias a partir de uma quantidade inicial pequena de alíquota.

Anteriormente a realização do PCR, foi realizada uma digestão da extração de DNA a fim de observar se há gDNA na amostra ou não. Após a conclusão da digestão, a amostra correu em gel de agarose de 2% para observar o resultado. Com o resultado positivo, o PCR foi iniciado.

Para realizar o PCR, utilizou-se água, tampão 10x (tampão está relacionado com a enzima que vai ser testada no PCR), MgCl₂, dNTP, primer FWD, primer reverso, enzima e DNA. Todas as amostras foram misturadas em um eppendorf e logo após, distribuídas nos tubos de PCR.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A construção de vetores contendo o gRNA direcionado ao *locus H11*, a enzima Cas9 e o gene repórter eGFP foi realizada antes da chegada das participantes do trabalho.

Para realizar a transfecção das células bovinas com os vetores construídos foi necessário identificar a concentração ideal de DNA a ser transfectado para os fibroblastos bovinos a partir de testes e avaliações até chegar no resultado esperado. Inicialmente a confluência da garrafa de cultura era de 90% e foram usados 4,5 µL de DNA, e, depois de 5 horas de espera, foi observado apenas 30% de células transfectadas. E de acordo Araújo et al., a quantidade de DNA influencia na eficácia da transfecção, por isso, o valor da concentração de DNA obtida e usada no trabalho foi de 3,1 µL e o resultado obtido da transfecção foi de 50-60%.

Em seguida, foi realizado o PCR para verificação da ampliação do *locus H11* que inicialmente não foi obtido. Após observação dos estudantes junto ao orientador foi detectado contaminação dos *primers* usados. Para isso, houve a construção de novos oligonucleotídeos iniciadores, porém, até o final do tempo de pesquisa, os resultados dos PCR 's não foram obtidos.

O isolamento de linhagens celulares bovinas com a inserção do gene eGFP no *locus H11* do genoma bovino e avaliação da eficiência da inserção com ou sem o uso de MMJE, além da micro-injeção das construções que melhor funcionariam nos ensaios com células em ovócitos e zigotos bovinos e a avaliação a expressão de GFP durante o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto não foi cumprido devido a paralização dos trabalhos por causa da pandemia.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas realizadas, mesmo não concluídas, mostram indícios de que o tema abordado merece uma atenção e uma futura continuação. A biotecnologia está em constante evolução e crescimento no Brasil, dessa forma, estudos do sistema CRISPR/Cas9 podem possibilitar a inserção de diversos genes em DNA's de interesse a fim de expandir a edição de animais geneticamente modificados.

O projeto inicial contava com 4 objetivos específicos porém, por conta da pandemia do coronavírus, não foi possível finalizar todos os objetivos e nem obter todos os resultados esperados. Mas a parte inicial do projeto - construir os vetores contendo o gRNA direcionado ao *locus H11*, a enzima Cas9 e o gene repórter eGFP e também, transfectar linhagens de células bovinas com os vetores construídos - foi realizada com alcance positivo.

Os outros objetivos que não foram almejados devem continuar sendo estudados, esse projeto de pesquisa tem uma forte vertente biotecnológica e com potencial de aplicação, pois se essa metodologia de edição genômica for exitosa, a produção de células e embriões com inserção de genes de interesse no *locus H11* poderá servir de base biotecnológica para produção de bovinos transgênicos no Brasil, com características de interesse econômico e/ou sanitário.

7. REFERÊNCIAS

Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature communications*, 9(1), 1-13.

Alves, E. A., & Guimarães, A. C. R. (2010). Cultivo celular. EPSJV.

de Araújo, T. D., Pereira, M. M., & de Almeida Camargo, L. S. (2014). EFEITO DO USO DE LIPOFECTAMINE™ 2000 E POLIETILENOIMINA (PEI) NA TRANSFECCÃO E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE EM FIBROBLASTOS BOVINOS CULTIVADOS IN VITRO. *CES Revista*, 28(1), 57-71.

Lamas-Toranzo, I., Galiano-Cogolludo, B., Cornudella-Ardiaca, F., Cobos-Figueroa, J., Ousinde, O., & Bermejo-Álvarez, P. (2019). Strategies to reduce genetic mosaicism following CRISPR-mediated genome edition in bovine embryos. *Scientific reports*, 9(1), 1-8.

Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug delivery*, 25(1), 1234-1257.

Mehravar, M., Shirazi, A., Nazari, M., & Banan, M. (2019). Mosaicism in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Developmental biology*, 445(2), 156-162.

Pennisi, E. (2013). The CRISPR craze.

Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), 2281-2308.

Vozza-Brown, L., Fan, J., Vasu, S., Yu, X., Wang, B., Lakshmipathy, U., ... & Frimpong, K. Lipofectamine™ LTX: a new transfection reagent for effective transfection of primary cells, hard-to-transfect cells and sensitive established cell lines. *Invit Corp. nd.*