



Sistema CRISPR/Cas9 e perspectivas de aplicações na cadeia produtiva animal *CRISPR/Cas9 system and perspectives for applications in the animal production chain*

Caroline Pereira da Costa, Mayra Elena Ortiz d'Ávila Assumpção, Marcelo Demarchi Goissis

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Departamento de Reprodução Animal (VRA), São Paulo – SP

Resumo

O melhoramento genético tem papel fundamental no aumento da eficiência da produção pecuária. Entretanto, programas tradicionais de melhoramento podem levar vários anos para atingir um determinado objetivo. Novas abordagens genômicas permitem acelerar esse processo e recentemente a edição gênica surgiu como nova alternativa, além de ter potencial para induzir outras modificações genéticas de interesse comercial e biomédico. A possibilidade de editar o genoma de diferentes espécies, de maneira simples e eficaz, tornou-se possível com a tecnologia do sistema CRISPR/Cas9. Esse sistema biológico foi identificado em bactérias e funciona como um mecanismo natural de defesa desses organismos. Baseando-se nos princípios biológicos, cientistas adaptaram esse sistema para atuar em células de mamíferos, incluindo humanas. Trabalhos científicos demonstraram a aplicabilidade da técnica, que permite novas abordagens na condução de estudos da função gênica, além de permitir diferentes experimentos de alteração específica da sequência do DNA. Do ponto de vista da produção animal, a utilização do sistema CRISPR traz novos conceitos e possibilidades para o melhoramento genético. O objetivo desta revisão é discutir os princípios da metodologia, associando resultados previamente conhecidos à possíveis aplicações com enfoque na cadeia produtiva animal.

Palavras-chave: edição gênica, genoma, melhoramento genético, produção animal.

Abstract

Genetic improvement has a prominent role in increasing the efficiency of livestock production systems. However, traditional breeding programs may take several years to achieve a specific goal. New genomic approaches could accelerate this process and recently gene editing appeared as an alternative and still holds the potential to induce genetic alterations of commercial and biomedical interest. The possibility of editing the genome of different species, in a simple and effective way, became possible with the technology of the CRISPR / Cas9 system. This biological system was identified in bacteria and works as a natural defense mechanism for these organisms. Based on biological principles, scientists adapted this system to act on mammalian cells, including humans. Scientific studies demonstrated the applicability of the technique, which allows new approaches in conducting studies of gene function, in addition to different experiments of targeted modification of the DNA sequence. From the point of view of animal production, the use of the CRISPR brings new concepts and possibilities for genetic improvement. The purpose of this review is to discuss the principles of the methodology, associating previously known results to possible applications focusing on the animal production chain.

Keywords: genomic editing, genome, genetic improvement, animal production,

Introdução

A produção de alimentos deve aumentar em aproximadamente 50% nos próximos 30 anos para atender às demandas do crescimento populacional com maior ingestão de proteína de origem animal e, não obstante, com a diminuição dos impactos ambientais (FAO, 2017). O melhoramento genético animal tem grande relevância no sucesso e na eficiência de sistemas de produção animal. Cruzamentos de indivíduos com melhor performance são realizados desde antes dos conhecimentos científicos sobre evolução, genética e herdabilidade (Hill, 2014). Com o advento de novas tecnologias genéticas, os programas de melhoramento incorporaram a seleção genômica para acelerar o ganho de performance

¹Correspondência: mdgoissis@usp.br

Recebido: 04 de novembro de 2020

Aceito: 14 de março de 2021



(Georges et al., 2019), havendo a possibilidade de inclusão de engenharia genética na modificação do genoma.

Cada célula de um organismo contém uma cópia de todo o genoma. Em humanos são mais de 20.000 genes, três bilhões de pares de bases de DNA, sendo esse número variável de espécie para espécie. O DNA consiste em duas fitas, torcidas em uma dupla hélice, mantidas juntas por uma regra de emparelhamento simples, na qual as bases púricas adenina e guanina ligam-se às bases pirimidinas timina e citosina, respectivamente. Os genes determinam as espécies, o organismo, o indivíduo e também fatores relacionados a saúde do indivíduo. Devido aos avanços no sequenciamento de DNA, foi possível identificar genes que predisõem ao risco de surgimento de doenças até genes que interferem diretamente nas qualidades desejáveis para espécies comerciais. Alterar genes nas células vivas de modo específico e de baixo custo na maioria das espécies era um grande desafio, até que, recentemente, um novo método foi descoberto, permitindo a ampliação da capacidade de editar o DNA de múltiplas espécies, incluindo humanos.

A capacidade de deleção, inserção ou incorporação de um gene em um *locus* específico é uma metodologia extremamente útil para a ciência, seja para estudos de função biológica, detecção de mecanismos infecciosos, diagnóstico de doenças ou ainda, otimização de processos biotecnológicos (Gonçalves e Paiva, 2017). Até recentemente, a manipulação genética na maioria das espécies tendia a ser inespecífica, ineficiente e de alto custo. Por exemplo, a microinjeção pronuclear em camundongos causa inserções aleatórias (Brinster et al., 1985; Chan et al., 1999) e é de difícil execução em espécies domésticas, devido ao alto conteúdo lipídico dos zigotos, fato que dificulta a visualização dos pronúcleos (McEvoy et al., 2000). Ainda, a produção de animais geneticamente alterados com células-tronco embrionárias tem alto custo e há a dificuldade de obtenção de linhagens dessas células em espécies domésticas (Talbot et al., 1995; Cibelli et al., 1998; Vackova et al., 2007; Cao et al., 2009; Tan et al., 2011; Bogliotti et al., 2018). Atualmente, a tecnologia CRISPR/Cas9 permite alterações direcionadas no genoma, popularizando os experimentos de deleção (*knock-out*) ou inserção (*knock-in*) de genes dentro da biologia molecular moderna (Vora et al., 2016).

CRISPR é um acrônimo de “*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*”, ou seja, repetições palindrômicas curtas, agrupadas e regularmente interespaçadas. Essas repetições tem a mesma leitura quando lidas em ambos os sentidos e estão presentes no DNA de aproximadamente 40% dos genomas bacterianos e em até 90% das *arqueobacterias* (Grissa et al., 2007). Essas sequências vem acompanhadas por uma sequência de DNA chamado de *protoespaçador*, que consiste em uma região não codificante, inserida no DNA bacteriano após exposição prévia desses microorganismos à genomas invasores, como fagos ou plasmídeos (Barrangou et al., 2007). O sistema CRISPR funciona basicamente como um sistema imunológico de procariotos, visto que é associado à expressão de uma enzima de restrição denominada Cas9, cuja ação confere resistência a elementos genéticos exógenos (Brouns et al., 2008). Enquanto o CRISPR armazena as sequências de DNA do agente invasor em sua “memória imunológica”, a Cas9 é direcionada para clivar essa determinada região do DNA invasor, com alta especificidade, não havendo aleatoriedade (Wiedenheft et al., 2012).

Ao inserir uma sequência de pares de base de interesse no sistema CRISPR e modificá-lo de modo a replicar essa informação, tornou-se possível aplicar essa maquinaria em genomas de diferentes espécies e realizar a edição gênica de maneira mais simples e mais acessível que outras técnicas como as *zinc finger nucleases* (Urnov et al., 2010; Havlicek et al., 2017) ou TALEN (Zu et al., 2013). A técnica de *zinc finger nuclease* necessita da produção de duas cadeias peptídicas fusionadas à nuclease FokI para que haja a quebra do DNA alvo. Essas cadeias peptídicas contêm diversas proteínas *zinc finger*, as quais reconhecem 3 nucleotídeos da sequência de DNA alvo cada, sendo recomendado o uso de 6 proteínas *zinc finger* por cadeia peptídica (Urnov et al., 2010). A técnica denominada TALEN também necessita de produção de duas cadeias peptídicas para a quebra do DNA alvo, cada uma fusionada à nuclease FokI. Entretanto, estas cadeias consistem apenas em 17 pares de aminoácidos, os quais reconhecem um nucleotídeo cada, facilitando o desenho dessas cadeias peptídicas quando comparado a *zinc finger nuclease* (Joung e Sander, 2013). Em contrapartida, como relatado a seguir, a técnica de CRISPR/Cas9 usa outra nuclease, a Cas9, mas destaca-se pelo fato de não necessitar de cadeias peptídicas e sim sequência de RNA complementar para reconhecer uma sequência de nucleotídeos alvo no DNA.

Devido a facilidade, versatilidade e especificidade, em pouco tempo, diferentes estudos foram publicados com a utilização do sistema CRISPR/Cas9 em diversas espécies de plantas e animais, com diversos objetivos, incluindo estudos básicos e aplicados. Um exemplo são os estudos de função de genes e outros elementos genéticos em cultivos celulares (Canver et al., 2014), além de estudos *in vitro* em larga escala para verificar a resposta a diferentes drogas (Kasap et al., 2014; Shalem et al., 2014; Wang et



al., 2014). Camundongos (Gao et al., 2018), coelhos (Yuan et al., 2019), cães (Amoasii et al., 2018), porcos (Li et al., 2019), vacas (Bevacqua et al., 2016), peixes (Yeh et al., 2017) e primatas não humanos (Kang et al., 2019) já foram editados geneticamente com êxito, via sistema CRISPR/Cas9. Stadtmauer et al. (2020) demonstraram a viabilidade da edição gênica via sistema CRISPR/Cas9 para imunoterapia contra o câncer, na qual realizaram transferência de células T editadas para genes tumorais específicos, demonstrando que a tecnologia é segura em humanos.

O objetivo dessa revisão de literatura foi compreender a origem e as diversas aplicações do sistema CRISPR, visando elencar com exemplos os possíveis benefícios e perspectivas futuras para a edição gênica na cadeia produtiva animal.

Origem do Sistema CRISPR/Cas9

As sequências de DNA que culminaram na tecnologia do sistema CRISPR/Cas9 foram originalmente identificadas no genoma da *Escherichia coli* em 1987, quando foram descritas como um “elemento de sequência incomum consistindo uma série de repetições de 29 nucleotídeos separadas por sequências únicas de espaçadores de 32 nucleotídeos” (Ishino et al., 1987). Mais tarde, essas sequências foram identificadas em diferentes tipos de bactérias e consequentemente, descrita em diversos estudos, surgindo então a necessidade de nomeá-las: repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas ou apenas “CRISPR” (Jansen et al., 2002). Além de dar nome às sequências, Jansen et al. (2002) relataram que as sequências CRISPR sempre estavam acompanhadas por uma coleção de genes que foram denominados *CRISPR associated genes* ou simplesmente Cas. Esses genes codificam endonucleases, ou seja, enzimas que podem cortar o DNA. Entretanto, até então não havia sido descoberto um motivo ou uma função pelo qual esses genes sempre estavam associados às sequências CRISPR.

Bolotin et al. (2005), realizando análise *in silico*, revelaram três genes associados às estruturas CRISPR em muitas espécies bacterianas. Relataram também a existência de um certo número de espaçadores que possuem homologia principalmente com genes de fagos (vírus que infectam bactérias). Além disso, constataram uma sensibilidade dos fagos relacionada com o número de espaçadores no *locus* CRISPR da cepa bacteriana, sugerindo que os elementos espaçadores eram traços de invasões passadas por elementos extra cromossômicos. Esses achados levantaram a hipótese de que os elementos espaçadores forneciam imunidade celular, nessas bactérias, contra a infecção por fagos. A presença de grupos de genes Cas próximo às estruturas do CRISPR sugeria que a formação do sistema CRISPR/Cas envolveria uma etapa de degradação do DNA. Baseando-se na estrutura bioquímica das enzimas Cas, análises computacionais predisseram que a ação dessas enzimas se daria após pareamento de RNA com fita de DNA homóloga, levando à quebra do DNA (Makarova et al., 2006).

Grande parte dos estudos iniciais foram realizados em *Streptococcus thermophilus*, cujo genoma possui diversos genes Cas (Barrangou et al., 2007), porém o gene Cas9 foi demonstrado ser o único gene necessário para atividade do sistema CRISPR/cas9 (Sapranauskas et al., 2011). As propriedades de defesa do sistema CRISPR foram comprovadas biologicamente após verificação da incorporação de sequências virais no genoma bacteriano e consequente aquisição de resistência ao fago, seguida ainda de perda de resistência quando as sequências espaçadoras eram removidas (Gasiunas et al., 2012). Então, alguns laboratórios de biologia molecular, como os de Jennifer Doudna nos Estados Unidos e o de Emmanuelle Charpentier, na época, na Suécia, realizaram estudos voltados especificamente para a ação da CRISPR e da Cas, demonstrando o funcionamento das moléculas de RNA e Cas9 como um sistema, que quando isolado por engenharia genética permitia o corte de sequências específicas de DNA (Jinek et al., 2012). Em suma, essas investigações trouxeram informações que possibilitaram o entendimento e o subsequente uso do sistema CRISPR/Cas9 para a edição gênica.

Remodelamento do Sistema CRISPR/Cas9

O CRISPR-Cas9 é uma tecnologia de edição de genoma com grande impacto nas ciências biológicas, pois pode ser projetado e adaptado para cortar, não apenas o DNA viral, mas qualquer sequência de DNA, alterando o RNA guia para corresponder ao alvo do DNA (Jinek et al., 2012). Isso pode ser feito não apenas *in vitro*, mas também dentro do núcleo de uma célula viva. O atual sistema CRISPR para aplicações em células eucariotas consiste basicamente em dois componentes: um RNA guia com a sequência gênica de interesse e a proteína Cas9, responsável pelo corte do DNA (Jinek et al., 2012, Cong et al., 2013). O RNA guia (referido em geral como gRNA) é um RNA sintético curto, desenhado

com a sequência alvo e seguido por uma sequência essencial, conhecida como *tracrRNA*, necessária para a interação com a Cas9.

Nesse sistema, o RNA guia contendo a sequência alvo liga-se à sequência complementar do DNA genômico a ser editado. Esta interação recruta a endonuclease Cas9, que então gera quebras na fita dupla no DNA. Para que esse sistema funcione, há necessidade de ter uma sequência específica adjacente à região alvo a ser clivada pela Cas9. Essa sequência é denominada, do inglês, de *protospacer adjacent motif*, ou seja motivo adjacente ao protoespaçador ou apenas PAM sendo este essencial para a clivagem do local de interesse gênico (Palermo et al., 2017). Os RNAs guias podem transportar a Cas9 para qualquer *locus* do genoma para edição de genes, mas nenhuma edição ocorre, em sequências complementares, sem a presença adjacente do PAM (Anders et al., 2014).

O PAM é uma sequência de DNA de 2 a 6 pares de bases, imediatamente após essa sequência de DNA reconhecida pelo RNA guia (Shah et al., 2013), sendo que para a Cas9, essa sequência caracteriza-se por 5'-NGG-3', onde "N" é qualquer base de DNA seguida por duas bases de guanina ("G"). O PAM atua como um componente de direcionamento essencial que distingue o DNA bacteriano do DNA não próprio, impedindo assim, que o *locus* endógeno que codifica as sequências de RNA guia seja destruído pelas enzimas Cas (Mali et al., 2013). A Cas9 não se ligará com êxito ou quebrará a sequência de DNA alvo se não for seguida pelo PAM (Jinek et al., 2012). Com a utilização de simulações de dinâmica molecular, Palermo et al. (2017) encontraram evidências de que o PAM atua como um efetor alostérico de modo a alterar a conformação da Cas9, permitindo que os domínios catalíticos operem para que ocorra a clivagem específica das duas cadeias de DNA

Portanto, a nuclease Cas9 guiada por RNA do sistema imunológico adaptativo do CRISPR, pode ser usada para facilitar a engenharia eficiente do genoma em células eucarióticas, especificando simplesmente uma sequência de direcionamento de 20 nucleotídeos dentro do RNA guia (Ran et al., 2013). A Cas9 descompactará o DNA e o corresponderá ao RNA alvo e se a sequência de interesse for encontrada, a enzima usará uma espécie de “tesoura” molecular para cortar a região do DNA identificada (Fig. 1).

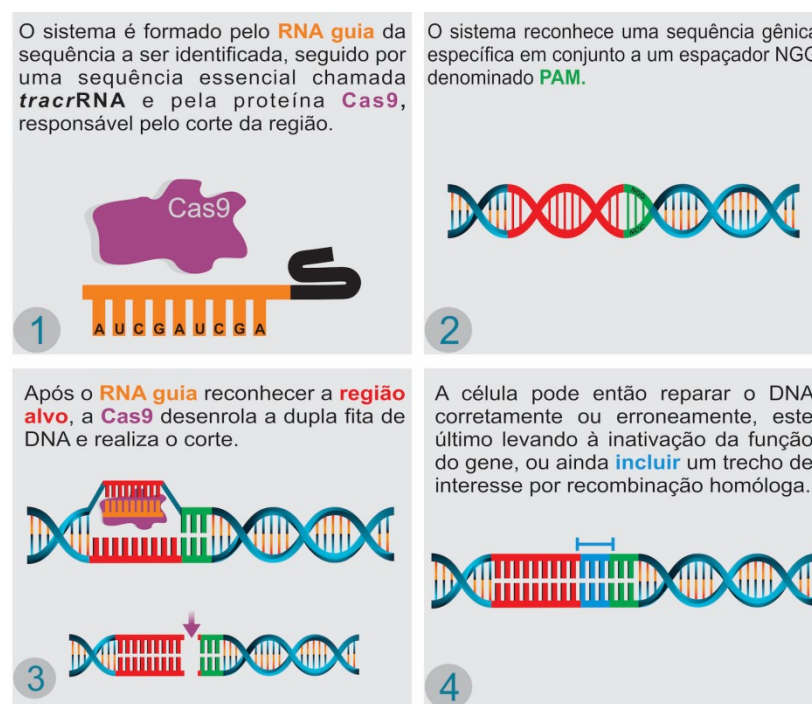


Figura 1. Esquema ilustrado do funcionamento do sistema CRISPR/Cas9. 1. Componentes do sistema CRISPR: RNA guia e enzima Cas9. 2. Reconhecimento da sequência alvo seguida do PAM pelo RNA guia. 3. Quebra da dupla fita de DNA pela Cas9. 4. Reparo do DNA pela célula com possibilidade de manutenção, alteração, inclusão ou deleção de sequência.

No momento de corte da região genômica, a célula tenta reparar o local, mas o processo de



reparo é propenso a erros, levando a mutações que podem desativar o gene, permitindo então a compreensão da sua função (Swiech et al., 2015). Essas mutações podem ocorrer de maneira aleatória, mas existe ainda a possibilidade de serem guiadas, por exemplo, substituindo um gene mutante que causa doença por uma cópia não patogênica, e isso pode ser feito adicionando uma sequência de DNA doadora que atuará como molde, carregando a sequência desejada (Harmsen et al., 2018). Depois do corte de DNA pela Cas9, o DNA doador pode emparelhar com as pontas cortadas, recombinando e substituindo a sequência original. Esse processo pode ser realizado em cultivo celular, incluindo células tronco, que podem dar origem à diferentes tipos de células e também em zigotos, permitindo a criação de animais editados e geneticamente modificados com mutações direcionadas. Diferente dos outros métodos que também objetivavam a edição gênica, o CRISPR pode ser usado para atingir muitos genes de uma só vez (Cong et al., 2013).

Além disso, é possível alterar sítios catalíticos da enzima Cas9, de modo que passe a se comportar de diferentes formas, como por exemplo, sendo uma *nickase* (Friedland et al., 2015), na qual corta apenas uma das duas fitas de DNA. Isto permitiu a criação de técnicas como a *base editing* (edição de base), que permite instaurar diretamente mutações pontuais no DNA celular sem fazer quebras de DNA de fita dupla (Komor et al., 2016) e foi adaptada para gerar modelos de deleção gênica de forma mais controlada por introdução de sequências *stop codon* que interrompem a tradução proteica (Billon et al., 2017). Anzalone et al. (2019) demonstraram um método versátil e preciso de edição de genoma que grava diretamente novas informações genéticas em um local de DNA específico, usando uma endonuclease Cas9 *nickase*, fundida a uma transcriptase reversa, programada com um RNA guia de edição principal que especifica o local de destino e codifica a edição desejada, permitindo maior gama de alterações com maior precisão no genoma alvo, sendo então denominado *prime editing*.

O sistema CRISPR/Cas pode ser usado para facilitar a edição de genoma de alta eficiência em mais de um *locus* em células de mamíferos: usando dois RNAs guias. O pesquisador Feng Zhang e colaboradores demonstraram a edição simultânea de *loci* humanos, com eficiência de 65 a 68% para cada *locus* (Cong et al., 2013), e também expressaram o sistema CRISPR de *Streptococcus pyogenes* em células de mamíferos, possibilitando a edição eficaz do genoma (Cong et al., 2013, Ran et al., 2013), comprovando o uso do sistema CRISPR/Cas9 como uma eficiente ferramenta para mediar a alteração de diferentes genomas com alta precisão.

Atualmente, existem diversos protocolos para a seleção de sítios de destino, avaliação da eficiência da clivagem e análise de *off-targets*, ou atividade fora do alvo. Essa seleção pode ser facilitada com a utilização de *softwares* (Brazelton et al., 2015), que buscam as regiões que tenham a sequência 5'-NGG-3' do PAM próximo ao local de destino, o que é essencial para que o corte ocorra (Palermo et al., 2017). Existem diversos *softwares* gratuitos disponíveis na *internet* para seleção de sequências alvo (lista disponível em *Guide Design Resources*, <https://zlab.bio/guide-design-resources>). Iniciando os experimentos com CRISPR, a partir do design da região alvo, as modificações genéticas podem ser obtidas entre uma a duas semanas e as linhas celulares clonais modificadas podem ser derivadas em duas a três semanas (Ran et al., 2013, Cong et al., 2013), demonstrando a facilidade do uso dessa ferramenta em comparação às outras disponíveis. Vale ressaltar que atividades fora do alvo podem ocorrer em regiões com similaridade à sequência alvo seguidas do PAM, causando quebras não intencionais em outras regiões do genoma. Portanto, deve-se realizar uma seleção cuidadosa da sequência alvo a ser utilizada. Existem relatos de alterações em grandes porções de DNA com uso do CRISPR (Alanis-Lobato et al., 2020), logo estudos visando compreender os efeitos *off-targets* devem ser realizados para aumentar a especificidade da técnica.

Vale ressaltar que outras enzimas Cas foram identificadas e isoladas, podendo ser adaptadas para edição gênica de acordo com a necessidade ou objetivo do projeto. Essas enzimas Cas podem ser Cas9 de espécies diferentes de bactérias, possuindo diferentes PAM, ou ainda outras versões de Cas, como Cas12, que tem como PAM sequências ricas em timina e consegue também efetuar cortes em sequências de DNA em fita simples, ou ainda, Cas13, que efetua cortes em sequências de RNA (Yan et al., 2019).

Geração de animais geneticamente modificados pela técnica de CRISPR/Cas9

A possibilidade de se utilizar uma sequência de RNA para guiar o corte de uma região gênica específica, tornou a utilização do sistema uma das mais eficazes ferramentas de edição e engenharia genômica. Devido aos diferentes estudos e adaptações da técnica, foi possível ampliar a aplicabilidade e determinar a importância para a pesquisa, haja vista que o Nobel de Química no ano de 2020 foi atribuído às pesquisadoras Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna.



Uma grande aplicação da técnica de CRISPR/Cas9 é a geração de animais geneticamente editados que podem ser usados como modelos para pesquisa básica em biologia como: *Caenorhabditis elegans* (Waijers et al., 2013), *Drosophila sp.* (Gratz et al., 2013), *Xenopus tropicalis* (Nakayama et al., 2013) e camundongos (Wang et al., 2013). Obviamente, a pesquisa em camundongos pode ter um viés mais aplicado, assim como a geração de outros modelos animais para pesquisas biomédicas como primatas (Kang et al., 2019), suínos (Niu et al., 2017) e cães (Amoasii et al., 2018). Ainda, há o interesse em gerar animais editados que tragam algum benefício à produção animal, como será discutido adiante.

Para gerar animais de interesse zootécnico editados por CRISPR/Cas9 podem ser empregadas diferentes estratégias. Em peixes, a edição gênica pode ser obtida por microinjeção do RNA guia e do RNA que codifica a Cas9 diretamente no ovo recém fertilizado (Ansai e Kinoshita, 2014). Em aves, há a estratégia similar de injeção no ovo (Zuo et al., 2016) ou ainda, realiza-se a edição gênica em células germinativas primordiais, as quais são então injetadas nos embriões *in ovo*, gerando animais cujas gametas são geneticamente modificados e podem ser usados para estabelecer uma linhagem a partir de cruzamentos (Oishi et al., 2016).

Em mamíferos, de forma análoga a peixes e aves, pode ser realizada a microinjeção em embriões no estágio de zigoto (Wang et al., 2013; Hai et al., 2014). Visando facilitar a execução, pode-se ainda executar a eletroporação de zigotos com as moléculas de RNA guia e de RNA que codifica Cas9 (Qin et al., 2015) ou de RNA guia e da proteína Cas9, que tem maior eficiência do que a eletroporação somente com RNA (Chen et al., 2016; Miao et al., 2019; Camargo et al., 2020). Uma desvantagem das modificações realizadas diretamente no embrião é a possibilidade de mosaicismos, ou seja, alterações que levem à presença de dois genótipos no animal (Mehrvan et al., 2019). Ainda, nos mamíferos é possível utilizar a técnica de clonagem por transferência nuclear, após modificação das células que serão usadas como doadoras de núcleo (Zhou et al., 2015). Desta forma pode-se selecionar as células por genotipagem de acordo com as modificações ocorridas após a introdução do sistema CRISPR (Whitworth et al., 2014). Ainda, com o uso de células é possível realizar a seleção positivas das células que incorporaram os plasmídeos usados para entrega do sistema CRISPR/Cas9 com seleção por oubaina, valendo-se da deleção do gene *ATP1A1* com CRISPR/Cas9, facilitando ainda mais o processo de seleção (Agudelo et al., 2017). Entretanto, a técnica de transferência nuclear tem a conhecida desvantagem da baixa eficiência no nascimento de animais após a transferência de embriões.

Aplicabilidade da técnica na produção animal

No cenário atual da produção animal, a utilização da tecnologia de edição gênica permite o estudo de diversos mecanismos que estão relacionados aos índices zootécnicos e ao melhoramento genético de rebanhos, uma busca constante do setor. Neste cenário, a competitividade no mercado agropecuário tornou-se elemento fundamental, tendo em vista a necessidade para o mercado de produtos que sejam de qualidade e apresentem preço acessível ao consumidor final (Filho et al., 2002). Além disso, à utilização de animais como modelos de estudo para humanos vem sendo discutida amplamente, de modo a ser necessário pensar antes de mais nada, no bem-estar dos animais, o que pode ser possibilitado pela técnica (Tu et al., 2015).

Alguns estudos já comprovaram a eficácia da técnica CRISPR/Cas9 em diversas espécies de produção como peixes, ovinos e bovinos, que serão salientados adiante. Além da busca pela aumento de produtividade animal com incremento de biotecnologias, vale ressaltar que uma exigência cada vez mais presente na sociedade é a sustentabilidade, levando em consideração a preservação ambiental e maior qualidade de vida aos animais. A tendência é que tal exigência se amplie e envolva todas a cadeia da produção animal e as diferentes espécies envolvidas (Filho et al., 2002, Menchaca et al., 2020).

CRISPR e os índices zootécnicos

Pesquisas recentes demonstram que a produtividade animal pode ser alterada de maneira a melhorar os índices zootécnicos com a tecnologia CRISPR/Cas9. Li et al. (2019), com o intuito de melhorar o rendimento do cashmere de alto valor, inseriram em cabras-de-caxemira, o gene *Tβ4* (timosina beta 4) usando a tecnologia CRISPR/Cas9. Este gene está envolvido na migração de células-tronco e promove o crescimento do pelame. As cabras exibiram um aumento no rendimento do cashmere em 74,5%, sem alterações na espessura e qualidade do fio. O sistema CRISPR/Cas9 também foi utilizado para editar o gene *Mstn que codifica a miostatina* em ovelhas, gerando animais *knock-out* com o objetivo de promover maior desenvolvimento cárneo em animais selecionados originalmente para produção de lã,



gerando animais com dupla aptidão (Crispo et al., 2015). As análises do estudo confirmaram a ausência de miostatina, mostrando maior peso corporal em cordeiros oriundos de zigotos microinjetados com CRISPR/Cas9 (Crispo et al., 2015).

O comprometimento socioambiental do sistema de produção também vem sendo levado em consideração por produtores e consumidores. O gasto hídrico em áreas de cultivo expõe as atividades de produção animal a questionamentos em relação a sua parcela de responsabilidade ambiental. Na produção de peixes, por exemplo, o gasto hídrico é alto, ainda mais em espécies com período de cultivo longo. Kishimoto et al. (2018) utilizaram a tecnologia CRISPR para deletar o gene da miostatina (*Mstn*) em peixes da espécie *Pagrus major*, e, obtiveram animais atingindo precocemente o peso ao abate, com maior aproveitamento de filé e com o desenvolvimento de uma estrutura óssea maior, quando comparada aos peixes convencionais da espécie. Com a produção de *Pagrus major* editado, o tempo de cultivo até o abate reduz, e consequentemente, o gasto hídrico da atividade também. Existem outras espécies como truta arco-íris, carpa comum, dourada, bagre-americano e ostra do pacífico, cujo gene editado foi o mesmo, visando o ganho mais rápido de massa muscular (Gratacap et al., 2019). Um grande interesse na piscicultura é que esses animais editados sejam estéreis, podendo atingir esse objetivo também utilizando o CRISPR, evitando que haja introgressão de animais geneticamente editados no ambiente (Gratacap et al., 2019).

Pesquisadores também cogitam o uso do CRISPR para disseminação de material genético com alto mérito zootécnico sem a necessidade de congelamento e transporte de gametas. Foram gerados bodes e cachacos nos quais a deleção de um gene os tornou estéreis e que puderam realizar espermatogênese após transplante de células germinativas (Cicarelli et al., 2020). Desta forma, animais com qualquer fundo genético poderiam produzir gametas com a genética de interesse.

Edição gênica, saúde e bem-estar animal

Em relação ao bem-estar de animais de produção, as tecnologias de edição gênica também já foram empregadas, objetivando a otimização da qualidade de vida desses animais, minimizando procedimentos dolorosos. Práticas de interrupção do crescimento dos botões de chifre, conhecido como amochamento ou de remoção de chifres, conhecido como descorna, em gado, têm recebido atenção em relação a questões de bem-estar animal (Bond et al., 2012). Além disso, animais sob condições de dor, estresse e desconforto não agregam valor zootécnico a produção, visto que não conseguem adquirir peso ou se reproduzirem e podendo ainda, influenciar nos sistemas produtivos pecuários e no produto final, seja a carne bovina ou o leite (Oliveira et al., 2008).

A remoção do chifre é feita para melhorar a segurança dos manipuladores humanos, diminuir o risco de ferimentos entre um animal e outro devido a comportamentos agressivos e reduzir a incidência de desperdício de carcaça devido a contusões (Bond et al., 2012). Carlson et al. (2016) demonstraram a utilização da técnica de edição gênica TALEN, em bovinos, para editar o gene de crescimento de chifres em gado leiteiro. A técnica de CRISPR/Cas12, foi utilizada para a obtenção de animais com a mesma modificação (Schuster et al., 2020). O uso de edição gênica permitiria que a maioria do rebanho apresentasse o alelo "mocho" mais rapidamente e com menor endogamia do que com programas convencionais de melhoramento genético (Mueller et al., 2019). Outro exemplo visando minimizar o desconforto e a dor causada em procedimentos rotineiros em sistemas de produção, seria usar a técnica de CRISPR/Cas9 para evitar a castração cirúrgica em machos suínos (Yunes et al., 2019). Ainda, visando diminuir o estresse térmico de raças não adaptadas ao calor, há a possibilidade usar CRISPR/Cas9 para introduzir de forma mais acelerada uma mutação denominada *slick*, oriunda de gado da raça senepol, em raças europeias (Hansen et al., 2020).

Pensando em uma outra abordagem, reduzir a incidência de doenças pode aumentar a produtividade, o bem estar animal e a saúde humana. Em suínos, foram gerados animais resistentes ao vírus da síndrome reprodutiva e respiratória (Whitworth et al., 2016) e gastroenterite viral (Whitworth et al., 2019), após deleção dos respectivos receptores de entrada dos vírus nas células. Bevacqua et al. (2016) utilizaram o sistema CRISPR/Cas9 com o objetivo de induzir alelos *knockout* e *knock-in* do gene *PRNP* bovino, responsável pela encefalopatia espongiforme bovina, conhecida popularmente como "doença da vaca louca". Os resultados relatam que o sistema CRISPR/Cas9 é eficiente para induzir *indels*, que são pequenas inserções ou deleções no genoma, do gene *PRNP* em células bovinas cultivadas e embriões. Recentemente, foram gerados bovinos editados portando versões do *PRNP* com menos chances de causar transmissões em humanos (Park et al., 2020).

Tal abordagem poderia ter um grande impacto no desenvolvimento de animais resistentes a essa



e outras importantes doenças zoonóticas, visando a resolução de problemas de saúde pública no mundo todo. Por exemplo, a indução de mutações em genes específicos de galinhas poderia inibir a replicação de vírus influenza nessas aves, minimizando chances de transmissão para humanos (Long et al., 2019). Ainda na avicultura, os problemas com a sanidade são responsáveis por grandes perdas econômicas na atividade. Os retrovírus são um dos patógenos mais difíceis de serem controlados por estratégias convencionais, como as vacinas (Hellmich et al., 2020). O subgrupo “J” do vírus da leucose aviária (ALV-J) é um retrovírus oncogênico e imunossupressor que causa leucose mielóide e outros tumores em galinhas. Hellmich et al. (2020) obtiveram resistência ao ALV-J em uma linha comercial de frangos por exclusão precisa de um *locus* receptor do vírus, utilizando o sistema CRISPR/Cas9. A modificação genética protegeu completamente as células da infecção e não teve efeito negativo no desenvolvimento e nas condições gerais de saúde das galinhas editadas. No geral, a geração de aves resistentes ao ALV-J por edição precisa de genes demonstra o imenso potencial dessa abordagem como uma estratégia alternativa de controle de doenças em aves.

Em relação a saúde animal, sabe-se que a seleção fenotípica durante a domesticação, resultou na incorporação indesejada de mutações deletérias. Em cavalos, a condição autossômica recessiva conhecida como enzima ramificadora de glicogênio deficiente é o resultado de uma destas mutações. Pinzon-Arteaga et al. (2020) utilizaram a recombinação homóloga via CRISPR/Cas9 para corrigir a mutação em uma linha celular primária de fibroblastos, derivada de um garanhão heterozigótico de alto mérito genético. A distância entre a ruptura de fita dupla mediada por Cas9 e o local da mutação foram os principais determinantes para a edição bem-sucedida. Isso demonstra a gama de aplicações do sistema CRISPR/Cas9 para corrigir outras doenças genéticas em populações animais.

Uma outra estratégia tem como visão diminuir o descarte de animais jovens devido ao sexo dentro de um sistema de produção. Um exemplo visa evitar o descarte de pintos de um dia na cadeia produtiva de ovos: usando CRISPR empresas desenvolveram técnicas que permitem determinar o sexo do embrião logo após a postura, permitindo que o ovo contendo um embrião macho seja utilizado para consumo (Vogel, 2019). Outro exemplo seria direcionar o nascimento de fêmeas na produção leiteira ou de machos na produção de carne. Apesar de haver resultados incipientes, foi demonstrada a inserção do gene SRY, que causa especificação sexual masculina, em embriões bovinos fecundados *in vitro*, sendo que um animal nasceu saudável (Owen et al., 2021).

CRISPR e o xenotransplante

A cadeia produtiva animal possui grande representatividade no setor alimentício e de subprodutos, e muitas vezes, apenas a produção de carne e leite são lembradas. Contudo, a semelhança fisiológica e morfológica de órgãos, caracteriza algumas espécies como importantes no estudo de doenças em humanos ou ainda, de xenotransplantes, visto que a criação *in vitro* de órgãos ou tecidos de tamanho humano adequados para transplante de pacientes se mostra, até então de difícil execução (Ezashi et al., 2015). Um dos principais desafios do xenotransplante é a rejeição de órgãos pela resposta imune. Fischer et al. (2016) demonstraram a utilização do sistema CRISPR/Cas9 para superar os mecanismos de rejeição hiperaguda e rejeição vascular aguda no xenotransplante entre suíno e humano, enquanto Niu et al. (2017) utilizaram o sistema para solucionar as incompatibilidades imunológicas e o risco de transmissão de espécies cruzadas de retrovírus endógenos porcos. Vilarino et al. (2017) “desativaram” o gene PDX1, impedindo a pancreatogênese em ovelhas, visando a produção de órgãos interespecíficos para medicina regenerativa. No futuro, combinar a edição de genes com a complementação de CRISPR/Cas9 e células-tronco pluripotentes pode resultar em uma abordagem poderosa para a geração de órgãos humanos em modelos animais (Vilarino et al., 2017).

Edição gênica, transgênicos e regulamentações

Os animais transgênicos seguem sendo uma das ferramentas de pesquisa mais importantes das ciências biológicas, pois representam modelos únicos e passíveis de serem personalizados para abordar questões específicas. Portanto, a capacidade de introduzir genes funcionais em animais confere uma estratégia muito poderosa para compreender processos e sistemas biológicos complexos. A transferência de genes é de particular valor em animais de produção, cujos longos ciclos das práticas clássicas de melhoramento genético são reduzidos (Pinkert, 2014). O transgênico é um organismo que possui uma sequência de DNA vinda de outro organismo e apesar de serem considerados por alguns uma metodologia com potencial para melhorias no setor agrícola, divide opiniões e está geralmente ligada à



questionamentos e receios quanto aos efeitos na saúde humana. Um dos pontos relevantes abordados, é que os transgênicos poderiam predispor às alergias, resistência a antibióticos, alterações no conteúdo nutritivo dos alimentos, além de preocupação pelo uso de vírus nas modificações genéticas (González, 2008).

O CRISPR/Cas9 revolucionou a geração de animais editados. Na agropecuária, a edição gênica permite modificar o genoma de modo a acelerar a introdução de uma variante natural de alelo específico na população alvo (Mueller et al., 2019). Este sistema demonstra eficiência e facilidade de uso sem precedentes, reduzindo o tempo e o custo necessários para a edição do genoma, permitindo a produção de animais com modificações genéticas mais extensas. A técnica do CRISPR permite gerar um organismo geneticamente modificado (OGM), porém não obrigatoriamente transgênico. Transgênicos e OGM não são sinônimos (Pelaez e Schmidt, 2000), visto que para o primeiro é necessária a adição de sequências de DNA de organismos distintos.

Em relação ao uso dos transgênicos no mundo, diversos países, como os do continente europeu são bastante enfáticos em relação a proibição ou restrição do uso destes animais na cadeia produtiva (Bonny, 2003). No Brasil, a Lei nº 11.105 de 24 de março de 2005 estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados (Brasil, 2005), por meio da criação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - (CTNBio). Porém, quando o assunto é edição gênica e o sistema CRISPR, ainda há muito o que ser discutido a cerca do uso dos organismos editados com esta tecnologia. Em 2018, o Tribunal Europeu de Justiça considerou que plantas modificadas com CRISPR não diferem de transgênicos convencionais e decidiu que culturas editadas por genes devem estar sujeitas aos mesmos regulamentos rigorosos (Callaway, 2018). No Brasil, a resolução Normativa Nº 24 da CTNBio, de 07 de janeiro de 2020 (Brasil, 2020) impõe condições para a comercialização de OGM, incluindo animais editados apresentando construção genética idêntica à própria espécie, sendo que esses casos serão avaliados individualmente quanto aos riscos. Um exemplo ilustrativo é o da modificação genética para bovinos mochos (Carlson et al., 2016), no qual houve inserção de região de trecho de DNA plasmidial (Norris et al., 2020), portanto, este animal deve ser considerado transgênico e não geneticamente editado. Entretanto, é digno de nota que uma tilápia geneticamente editada foi liberada para produção na Argentina sem ser considerada animal transgênico (Gratacap et al., 2019).

Regulamentos restritivos em alguns países são oportunidades para outros e conseqüentemente, aqueles que hoje restringirem excessivamente o uso de biotecnologias pagarão pelo uso e pelos produtos no futuro (Menchaca et al., 2020). A discussão sobre o uso da técnica deve ser pautada pela segurança às pessoas e ao meio ambiente, de modo a não reduzir a aceitação pela sociedade de uma tecnologia com potencial de impacto econômico e na sustentabilidade das atividades da cadeia produtiva animal.

Considerações Finais

A tecnologia CRISPR/Cas9 demonstra ser aplicável a uma grande variedade de animais, desde metazoários de ramificação precoce até primatas. O sistema permite a construção de modelos precisos de doenças humanas e terapias potenciais foram testadas e validadas em diferentes modelos animais. Com base no progresso notável até o momento, pode-se antecipar que, no futuro, a tecnologia CRISPR/Cas9 permitirá avanços adicionais de longo alcance, incluindo o entendimento de doenças com origens genéticas complexas, a engenharia de animais para produção de órgãos para transplante humano e a transformação genética de populações inteiras de organismos para impedir a propagação de doenças.

A utilização da metodologia em diferentes genomas, aliada à facilidade de aplicação da técnica, já foram comprovados. Além da tecnologia demonstrar ao longo de anos e diferentes estudos a sua funcionalidade, quando trazida para o cenário atual da produção animal, carrega consigo novos conceitos e possibilidades para acelerar o melhoramento genético de maneira específica e ainda com capacidade de gerar novos produtos. A modernização da edição gênica em animais de produção poderá otimizar significativamente a cadeia produtiva animal no Brasil e no mundo, repaginando a forma de produção de carne, leite e derivados e possibilitando a associação direta do bem-estar em conjunto à elevados índices zootécnicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2017/09576-3, 2017/25574-0 e 2018/18924-8 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento



Científico e Tecnológico (CNPq), processo 408634/2018-9. Agradecemos também aos membros dos Laboratórios de Fecundação in vitro, Clonagem e Transgenia Animal e Laboratório de Biologia do Espermatozoide, em especial a Vivian Cardoso Castiglioni, pela leitura crítica desse manuscrito.

Referências

- Agudelo D, Durringer A, Bozoyan L, Huard CC, Carter S, Loehr J, Synodinou D, Drouin M, Salsman J, Dellaire G, Laganière J, Doyon Y.** Marker-free coselection for CRISPR-driven genome editing in human cells. *Nat Methods*, v.14, p.615–620, 2017.
- Alanis-Lobato G, Zohren J, McCarthy A, Fogarty NME, Kubikova N, Hardman E, Greco M, Wells D, Turner JMA, Niakan KK.** Frequent loss-of-heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos. *BioRxiv*, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.06.05.135913>, acesso em 23 de outubro de 2020.
- Amosii L, Hildyard JCW, Li H, Sanchez-Ortiz E, Mireault A, Caballero D, Harron R, Stathopoulou TR, Massey C, Shelton JM, Bassel-Duby R, Piercy RJ, Olson EN.** Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, v.362, p.86-91, 2018.
- Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M.** Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, v.513, p.569–573, 2014.
- Ansai S, Kinoshita M.** Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas system in medaka. *Biol Open* v.3, p.362-371, 2014.
- Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, Chen PJ, Wilson C, Newby GA, Raguram A, Liu DR.** Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, v.576, p.149-157, 2019.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P.** *CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes*. *Science*, v.315, p.1709–1712, 2007.
- Bevacqua RJ, Martín RF, Savy V, Canel NG, Gismondi MI, Kues WA, Carlson DF, Fahrenkrug SC, Niemann H, Taboga OA, Ferraris S, Salamone DF.** 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.
- Billon P, Bryant EE, Joseph SA, Nambiar TS, Hayward SB, Rothstein R, Ciccio A.** CRISPR-Mediated Base Editing Enables Efficient Disruption of Eukaryotic Genes through Induction of STOP Codons. *Mol Cell*, v.67, p.1068–1079, 2017.
- Bogliotti YS, Wu J, Vilarino M, Okamura D, Soto DA, Zhong C, Sakurai M, Sampaio RV, Suzuki K, Belmonte JCI, Ross PJ.** Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts. *PNAS*, v.115, p.2090-2095 2018.
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD.** Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading)*, v.151, p.2551-2561, 2005.
- Bond GB, Almeida R, Ostrensky A, Molento AFM.** Métodos de diagnóstico e pontos críticos de bem-estar de bovinos leiteiros. *Cienc Rural*, v.42, p.1286-1293, 2012.
- Bonny S.** Why are most Europeans opposed to GMOs? Factors explaining rejection in France and Europe. *Electron J Biotechnol*, v.6, p.50-71, 2003.
- Brasil.** Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Presidência da República. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/L11105.htm. Acesso em 10 de julho de 2020.
- Brasil.** Resolução Normativa nº 24, de 07 de janeiro de 2020. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações/Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Disponível em <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-normativa-n-24-de-7-de-janeiro-de-2020-237272300>. Acesso em 10 de julho de 2020.
- Brazelton VA, Jr, Zarecor S, Wright DA, Wang Y, Liu J, Chen K, Yang B, Lawrence-Dill CJ.** A quick guide to CRISPR sgRNA design tools. *GM Crops Food*, v.6, p.266-276, 2015.
- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yaglet MK, Palmiter RD.** Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* v.82, p.4438-4442, 1985.
- Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ,**



- Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J.** Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, v.321, p.960–964. 2008.
- Callaway E.** CRISPR plants now subject to tough GM laws in European Union. *Nature*, v.560, p.7716, 2018.
- Camargo LSA, Owen JR, Van Eenennaam AL, Ross PJ.** Efficient one-step knockout by electroporation of ribonucleoproteins into zona-intact bovine embryos. *Front genet*, v.11, p.1047, 2020.
- Canver MC, Bauer DE, Dass A, Yien YY, Chung J, Masuda T, Maeda T, Paw BH, Orkin SH.** Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)/cas9 nuclease system in mammalian cells. *J Biol Chem*, v.289, p.21312-21324, 2014
- Cao S, Wang F, Chen Z, Liu Z, Mei C, Wu H, Huang J, Li C, Zhou L, Liu L.** Isolation and culture of primary bovine embryonic stem cell colonies by a novel method. *J Exp Zool*, v.311, p.368–376, 2009.
- Carlson DF, Lancto CA, Zang B, Kim ES, Walton M, Oldeschulte D, Seabury C, Sonstegard TS, Fahrenkrug SC.** Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nat Biotechnol*, v.34, p.479-481, 2016.
- Chan AWS, Kukolj G, Skalka NA, Bremel RD.** Timing of dna integration, transgenic mosaicism, and pronuclear microinjection. *Mol Reprod Dev*, v.52, p.406-413. 1999.
- Chen S, Lee B, Lee AY, Modzelewski AJ, He L.** Highly efficient mouse genome editing by crispr ribonucleoprotein electroporation of zygotes. *J Biol Chem*, v.291, p.14457-14467, 2016.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, León FAP, Robl JM.** Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nature Biotechnol*, v.16, p.642-646, 1998.
- Ciccarelli M, Giassetti MI, Miao D, Oatley MJ, Robbins C, Lopez-Biladeau B, Waqas MS, Tibary A, Whitelaw B, Lillico S, Park CH, Park KE, Telugu B, Fan Z, Liu Y, Regouski M, Polejaeva IA, Oatley JM.** Donor-derived spermatogenesis following stem cell transplantation in sterile *NANOS2* knockout males. *PNAS*, v.117, p.24195-24204, 2020
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F.** Multiplex genome engineering using crispr/cas systems. *Science*, v.339, p.819-823, 2013.
- Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Crénéguy A, Brusselle L, Anegón I, Menchaca A.** Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/cas9 technology and microinjection into zygotes. *Plos One*, v.10, pe0136690, 2015.
- Ezashi T, Yuan Y, Roberts RM.** Pluripotent stem cells from domesticated mammals. *Annu Rev Anim Biosci*, v.4, p.8.1-8.31, 2015.
- FAO.** The future of food and agriculture – Trends and challenges. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. Rome, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>. Acesso em 27 ago. 2020.
- Filho KE, Alencar MM, Cezar IM, Fávero JA, Vasconcelos VR, Collares RS.** Cadeias produtivas como plataformas para o desenvolvimento da ciência, da tecnologia e da inovação / Kepler Euclides Filho [et al.]. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, p.133, 2002.
- Fischer K, Kraner-Scheiber S, Petersen B, Rieblinger B, Buermann A, Flisikowska T, Flisikowski K, Christan S, Edlinger M, Baars W, Kurome M, Zakhartchenko V, Kessler B, Plotzki E, Szczerbal I, Switonski M, Denner J, Wolf E, Schwinzer R, Niemann H, Kind A, Schnieke A.** Efficient production of multi-modified pigs for xenotransplantation by ‘combineering’, gene stacking and gene editing. *Sci Rep*, v.6, p.e29081, 2016.
- Friedland AE, Baral R, Singhal P, Loveluck K, Shen S, Sanchez M, Marco E, Gotta GM, Maeder ML, Kennedy EM, Kornepati AVR, Sousa A, Collins MA, Jayaram H, Cullen BR, Bumcrot D.** Characterization of *Staphylococcus aureus* Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications. *Genome Biol*, v.16. p.e257, 2015.
- Gao X, Tao Y, Lamas V, Huang M, Yeh WH, Pan B, Hu YJ, Hu JH, Thompson DB, Shu Y, Li Y, Wang H, Yang S, Xu Q, Polley DB, Liberman MC, Kong WJ, Holt JR, Chen ZY, Liu DR.** Treatment of autosomal dominant hearing loss by *in vivo* delivery of genome editing agents. *Nature*, v.553, p.217–221. 2018.
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V.** Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.109, p.E2579-E2586, 2012.
- Georges M, Charlier C, Hayes B.** Harnessing genomic information for livestock improvement. *Nat Rev*



Genet, v.20, p.135-156, 2019.

Gonçalves GAR, Paiva RMA. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. Einstein, n.15 no.3, São Paulo. 2017.

González JEG. Alimentos geneticamente alterados: transgênico. Biocenosis, v. 21, n.1-2, p.47-50, 2008.

Gratacap RL, Wargelius A, Edvardsen RB, Houston RD. Potential of genome editing to improve aquaculture breeding and production. Trends Genet, v.35, p.672-684, 2019.

Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, Hamm DC, Donohue LK, Harrison MM, J Wildonger J, O'Connor-Giles KM. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. Genetics, v.194, p.1029-1035, 2013.

Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. BMC Bioinform, v.8, p.e172. 2007.

Guide Design Resources. In: Zhang Lab website, Broad Institute, MA, EUA. Disponível em <<https://zlab.bio/guide-design-resources>>. Acesso em 29 de julho de 2020.

Hai T, Teng F, Guo R, Li W, Zhou Qi. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. Cell Res, v.24, p.372-375, 2014.

Hansen, PJ. Prospects for gene introgression or gene editing as a strategy for reduction of the impact of heat stress on production and reproduction in cattle. Theriogenology, v.154, p.190-202, 2020.

Harmsen T, Klaasen S, Vrugt HV, Riele HT. DNA mismatch repair and oligonucleotide end-protection promote base-pair substitution distal from a CRISPR/Cas9-induced DNA break. Nucleic Acids Research, v.46, p.2945-2955, 2018.

Havlicek S, Shen Y, Alpagu Y, Bruntraeger MB, Zufir NBM, Fu Z, Lawrence NR, Stanton W. Re-engineered rna-guided foki-nucleases for improved genome editing in human cells. Mol Ther, v.25, p.342-355, 2017

Hellmich R, Sid H, Lengyel K, Flisikowski K, Schlickerrieder A, Bartsch D, Thoma T, Bertzbach LD, Kaufer BB, Nair V, Preisinger R, Schusser B. Acquiring resistance against a retroviral infection via crispr/cas9 targeted genome editing in a commercial chicken line. Front Genome Ed, v.2, p.e3, 2020.

Hill WG. Applications of population genetics to animal breeding, from wright, fisher and lush to genomic prediction. Genetics, v.196, p.1-16, 2014.

Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. J Bacteriol, v.169, p.5429-5433, 1987.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable dual-rna-guided dna endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science, v.337, p.816-882, 2012.

Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol Microbiol, v.43, p.1565-1575, 2002.

Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. Nat Rev Mol Cell Biol, v.14, p.49-55, 2013

Kang Y, Chu C, Wang F, Niu Y. CRISPR/Cas9 mediated genome editing in nonhuman primates. Dis Model Mech, v.12, dmm039982, 2019.

Kasap C, Elemento O, Kapoor TM. DrugTargetSeqR: a genomics- and CRISPR-Cas9-based method to analyze drug targets. Nat Chem Biol, v.10, p.626-628, 2014.

Kishimoto K, Washio Y, Yoshiura Y, Toyoda A, Ueno T, Fukuyama H, Kato K, Kinoshita M. Production of a breed of red sea bream *Pagrus major* with an increase of skeletal muscle mass and reduced body length by genome editing with CRISPR/Cas9. Aquaculture, v.495, p.415-427, 2018.

Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature, v.533, p.420-424, 2016.

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, 2020

Li X, Hao F, Hu X, Wang H, Dai B, Wang X, Liang H, Cang M, Liu D. Generation of Tβ4 knock-in Cashmere goat using CRISPR/Cas9. International J Biol Sci, v.15, p.1743-1754, 2019.

Long JS, Idoko-Akoh A, Mistry B, Goldhill D, Staller E, Schreyer J, Ross C, Goodbourn S, Shelton H, Skinner MA, Sang H, McGrew MJ, Barclay W. Species specific differences in use of ANP32 proteins by influenza A virus. eLife, v.8, p.e45066, 2019.

Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. Biol Direct, v.1, p.e7, 2006.



- Mali P, Esvelt KM, Church GM.** Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*, v.10, p.957–963, 2013.
- Mali P, Luhan Yang, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM.** RNA guided human genome engineering via cas9. *Science*, v.339, p.823-826. 2013.
- McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JSM, Speake BK.** Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil*, v.118, p.163–170, 2000.
- Menchaca A, Dos Santos PC, Mulet AP, Crispo M.** CRISPR in livestock: From editing to printing. *Theriogenology*, v.150, p. 247-254, 2020.
- Mehravar M, Shirazi A, Nazari M, Banan M.** Mosaicism in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Dev Biol*, v.445, p.156-162, 2019
- Miao D, Giassetti MI, Ciccarelli M, Lopez-Biladeau B, Oatley JM.** Simplified pipelines for genetic engineering of mammalian embryos by CRISPR-Cas9 electroporation. *Biol Reprod*, v.101, p.177-187, 2019.
- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C.** Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading)*, v.155, p.733-740, 2009.
- Mueller ML, Cole JB, Sonstegard TS, Van Eenennaam AL.** Comparison of gene editing versus conventional breeding to introgress the POLLED allele into the US dairy cattle population. *J Dairy Sci*, v.102, p.4215-4226, 2019.
- Nakayama T, Fish MB, Fisher M, Oomen-Hajagos J, Thomsen GH, Grainger RM.** Simple and efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Xenopus tropicalis*. *Genesis*, v.51, p.835–843, 2013.
- Niu D, Wei HJ, Lin L, George H, Wang T, Lee IH, Zhao HY, Wang Y, Kan Y, Shrock E, Lesha E, Wang G, Luo Y, Qing Y, Jiao D, Zhao H, Zhou X, Wang S, Wei H, Güell M, Church GM, Yang L.** Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*, v.357, p.1303-1307, 2017.
- Norris AL, Lee SS, Grenlees KJ, Tadesse DA, Miller MF, Lombardi HA.** Template plasmid integration in germline genome-edited cattle. *Nat Biotechnol*, v.38, p.163-164, 2020
- Oishi I, Yoshii K, Miyahara D, Kagami H, Tagami T.** Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, v.6, p.e23980, 2016.
- Oliveira CB, Bortoli EC, Barcellos JOJ.** Diferenciação por qualidade da carne bovina: a ótica do bem-estar animal. *Cienc Rural*, v.38, p.2092-2096, 2008.
- Owen JR, Hennig SL, McNabb BR, Mansour TA, Smith JM, Lin JC, Young AE, Trott JF, Murray JD, Delany ME, Ross PJ, Van Eenennaam AL.** One-step generation of a targeted knock-in calf using the CRISPR-Cas9 system in bovine zygotes. *BMC Genomics*, v.22, p.118, 2021.
- Palermo G, Ricci CG, Fernando A, Basak R, Jinek M, Rivalta I, Batista VS, McCammon JA.** Protospacer adjacent motif-induced allostery activates CRISPR-cas9. *J Am Chem Soc*, v.139, p.16028-16031, 2017
- Park KE, Frey JF, Waters J, Simpson SG, Coutu C, Plummer S, Campbell M, Donovan DM, Telugu BP.** One-step homology mediated CRISPR-cas editing in zygotes for generating genome edited cattle. *CRISPR J*, v.3, p.523–534, 2020.
- Pelaez V, Schmidt W.** A difusão dos OGM no Brasil: imposição e resistências. *Estud Soc Agric*, v.14, p.5-31, 2000.
- Pinkert CA.** *Transgenic Animal Technology, a laboratory handbook (Third Edition)*, Estados Unidos da América, Elsevier, 2014.
- Pinzon-Arteaga C, Snyder MD, Lazzarotto CR, Moreno NF, Juras R, Raudsepp T, Golding MC, Varner DD, Long CR.** Efficient correction of a deleterious point mutation in primary horse fibroblasts with CRISPR-Cas9. *Sci Rep*, v.10, p.e7411, 2020.
- Qin W, Dion SL, Kutny PM, Zhang Y, Cheng AW, Jillette NL, Malhotra A, Geurts AM, Chen YG Wang H.** Efficient CRISPR/cas9-mediated genome editing in mice by zygote electroporation of nuclease. *Genetics*, v.200, p.423-430, 2015.
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F.** Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, v.8, p.2281-2308, 2013.
- Rees HA, Liu DR.** Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet*, v.19, p.770-788, 2018.
- Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V.** The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, v.39,



p.9275–9282, 2011.

Schuster F, Aldag P, Frenzel A, Hadeler KG, Lucas-Hahn A, Niemann H, Petersen B. CRISPR/Cas12a mediated knock-in of the Polled Celtic variant to produce a polled genotype in dairy cattle. *Sci Rep*, v.10, p.13570, 2020.

Shah SA, Erdmann S, Mojica FJ, Garrett RA. Protospacer recognition motifs: mixed identities and functional diversity. *RNA Biol*, v.10, p.891-899, 2013.

Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, Heck D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-cas9 knockout screening in human cells. *Science*, v.343, p.84-87, 2014

Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KI, Lancaster E, Mangan PA, Kulikovskaya I, Gupta M, Chen F, Tian L, Gonzalez VE, Xu J, Jung IY, Melenhorst JJ, Plesa G, Shea J, Matlawski T, Cervini A, Gaymon AI, Desjardins S, Lamontagne A, Salas-McKee J, Fesnak A, Siegel DI, Levine BI, Jadowsky JK, Young RM, Chew A, Hwang W, Hexner EO, Carreno BM, Nobles CI, Bushman FD, Parker KR, Qi Y, Satpathy AT, Chang HY, Zhao Y, Lacey SF, June CH. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*, v.367, p.e7365, 2020.

Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li Y, Trombetta J, Sur M, Zhang F. In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, v.33, p.102-106, 2015.

Talbot NC, Powell AM, Rexroad Jr. CE. In vitro pluripotency of epiblasts derived from bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* v.42, p.35-52, 1995.

Tan G, Ren L, Huang Y, Tang X, Zhou Y, Zhou Y, Li D, Song H, Ouyang H, Pang D. Isolation and culture of embryonic stem-like cells from pig nuclear transfer blastocysts of different days. *Zygote*, v.20, p.347–352, 2011.

Tu Z, Yang W, Yan S, Guo X, Li XJ. CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener*, v.10, p.e35, 2015.

Urnov F, Rebar E, Holmes M, H. Zhang S, Gregory FD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, v.11, p.636–646, 2010.

Vackova I, Ungrova A, Lopes F. Putative embryonic stem cell lines from pig embryos. *J Reprod Dev*, v.53, p.1137-1149, 2007.

Vilarino M, Rashid ST, Suchy FP, McNabb BR, Meulen TVD, Fine EJ, Mursaliyev SAN, Sebastiano V, Diab SS, Huising MO, Nakauchi H, J. Ross P. CRISPR/Cas9 microinjection in oocytes disables pancreas development in sheep. *Sci Rep*, v.7, p.e17472, 2017.

Vogel G. 'Ethical' eggs could save day-old chicks from slaughter. *Science*, v.365, p.627-628, 2019.

Vora S, Tuttle M, Cheng J, Church G. Next stop for the CRISPR revolution: RNA guided epigenetic regulators. *FEBS J*, v.283, p.3181-3193, 2016.

Waaaijers S, Portegijs V, Kerver J, Lemmens BBLG, Tijsterman M, van den Heuvel S, Boxem M. CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v.195 p.1187–1191, 2013.

Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell*, v.153, p.910–918, 2013.

Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Science*, v.343, p.80-84, 2014

Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, v.482, p.331–338, 2012.

Whitworth KM, Lee K, Benne JA, Beaton BP, Spate LD, Murphy SL, Samuel MS, Mao J, O’Gorman C, Walters EM, Murphy CN, Driver J, Mileham A, McLaren D, Wells KD, Prather RS. Use of the crispr/cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biol Reprod* v.91, p.78, 2014.

Whitworth KM, Rowland RRR, Ewen CL, Tribble BR, Kerrigan MA, Cino-Ozuna AG, Samuel MS, Lightner JE, McLaren DG, Mileham AJ, Wells KD, Prather RS. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat Biotechnol*, v.34, p.20–22, 2016.

Whitworth KM, Rowland RRR, Petrovan V, Sheahan M, Cino-Ozuna AG, Fang Y, Hesse R, Mileham A, Samuel MS, Wells KD, Prather RS. Resistance to coronavirus infection in amino peptidase N-deficient pigs. *Transgenic Res*, v.28, p.21–32, 2019.

Yan F, Wang W, Zhang J. CRISPR-Cas12 and Cas13: the lesser known siblings of CRISPR-Cas9. *Cell Biol Toxicol*, v.35, p.489–492, 2019.

Yeh YC, Kinoshita M, Ng TH, Chang YH, Maekawa S, Chiang YA, Aoki T, Wang HC. Using



CRISPR/Cas9 mediated gene editing to further explore growth and trade-off effects in myostatin-mutated F4 medaka (*Oryzias latipes*). *Sci Rep*, v.7, p.e11435, 2017.

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.e69, 2019.

Yunes MC, Teixeira DL, von Keyserlingk MAG, Hötzel MJ. Is gene editing an acceptable alternative to castration in pigs? *PLoS ONE*, v.14, p.e0218176, 2019.

Zhou X, Xin J, Fan N, Zou Q, Huang J, Ouyang Z, Zhao Y, Zhao B, Liu Z, Lai S, Yi X, Guo L, Esteban MA, Zeng Y, Yang H, Lai L. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cell Mol Life Sci*, v.72, p.1175-1184, 2015.

Zu Y, Tong X, Wang Z, Liu D, Pan R, Li Z, Hu Y, Luo Z, Huang P, Wu Q, Zhu Z, Zhang B, Lin S. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nature Methods*, v.10, p.329-331, 2013.

Zuo Z, Wang Y, Cheng S, Lian C, Tang B, Wang F, Lu Z, Ji Y, Zhao R, Zhang W, Jin K, Song J, Zhang Y, Li B. Site-directed genome knockout in chicken cell line and embryos can use crispr/cas gene editing technology. *G3 (Bethesda)*, v.6, p.1787-1792, 2016.
