

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA

VANESSA CRISTINA DE OLIVEIRA

**Edição do gene TFAM pela engenharia CRISPR Cas9 em
modelo bovino**

São Paulo
2016

VANESSA CRISTINA DE OLIVEIRA

Edição do gene TFAM pela engenharia CRISPR Cas9 em modelo bovino

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3417
FMVZ

Oliveira, Vanessa Cristina de
Edição do gene TFAM pela engenharia CRISPR Cas9 em modelo bovino / Vanessa Cristina de Oliveira. -- 2016.
79 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. TFAM. 2. Mitocôndria. CRISPR Cas9. Bovino. I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "Edição do gene TFAM pela engenharia CRISPR Cas 9 em modelo bovino", protocolado sob o CEUA nº 5828250215, sob a responsabilidade de **Carlos Eduardo Ambrósio e equipe; Vanessa Cristina de Oliveira ; Flavio Vieira Meirelles** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) na reunião de 01/06/2016.

We certify that the proposal "Edition of the TFAM gene by CRISPR Cas 9 engineering in bovine model", utilizing 5 Bovines (5 males), protocol number CEUA 5828250215, under the responsibility of **Carlos Eduardo Ambrósio and team; Vanessa Cristina de Oliveira ; Flavio Vieira Meirelles** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 06/01/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [02/2013](#) a [02/2017](#)

Área: [Clínica Médica Veterinária](#)

Procedência: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [a](#)

N: [5](#)

Linhagem: [Nelore](#)

Peso: [a](#)

Resumo:

Local do experimento:

São Paulo, 07 de junho de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OLIVEIRA, Vanessa Cristina.

Título: Edição do gene TFAM pela engenharia CRISPR Cas9 em modelo bovino

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em: ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICO,

Vou começar primeiramente pelo símbolo da minha família, exemplo de homem, de honestidade e de inteligência! Dedico ao meu Avô Benedito pelas sábias palavras desde o início da minha escolha de profissão, pelos ensinamentos, por compartilhar sua grande experiência de vida e por sempre me incentivar nas minhas escolhas. O senhor para mim foi e sempre será um grande exemplo!

Aos meus pais e meu irmão, que são meus exemplos, minha força! Por me darem a certeza de que tudo o que fazemos com amor, paciência, dedicação e fé dará certo no final. Amo muito vocês!

Agora venho aqui fazer minha maior declaração! Para o amor da minha vida, que agora será papai!! Luís Henrique Pontes, meu Amor, meu companheiro de todas as horas, minha fortaleza! Que sempre me apoiou, participou e apostou que tudo daria certo. Obrigada por estar ao meu lado sempre! Sua participação e apoio dia a dia me incentiva a crescer! E como esta crescendo, até um novo integrante reinará em nosso lar! Logo o nosso pacotinho de amor estará em nossos braços! Tenho certeza que será o melhor e mais dedicado pai! Te amo!

E ao meu bebê! Meu maior presente de todos! Meu presente de Natal adiantado! Sinto você tão pequenino em meu ventre, e já te amo tanto! Me pergunto como irei suportar amor tamanho que não cabe no peito!. Você neste apenas 1 mês de vida em meu ventre sentiu minhas angústias, alegrias, medos e sonhos. A maternidade neste momento esta sendo algo grandioso, fantástico! Te amo!

Sendo assim finalizo esta dedicatória homenageando a Vida! O presente mais belo que alguém pode ganhar!

*Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As
facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as
críticas nos auxiliam muito.*

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Finalizo um percurso de 4 anos de doutorado e mais 2 de mestrado na USP. Sinto uma mistura de sentimentos que se combinam. Sendo assim, não posso deixar de expressar minha eterna gratidão pelas pessoas tão queridas que me acompanharam de alguma forma nesta trajetória árdua e ao mesmo tempo feliz!

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, são seis anos de convivência, em que você apostou em mim, apresentou obstáculos, ensinou-me a superar limites! Que entregou em minhas mãos o novo, o desconhecido, nunca duvidando da minha capacidade de desenvolvimento deste. Caju, você acompanhou momentos de minha vida, mestrado, mestrado com bolsa no exterior, doutorado, doutorado com bolsa no exterior, casamento, e agora a maternidade. Posso-te dizer que presenciou os melhores momentos de minha vida. Sou muito grata por ter tido você como orientador. Deixo aqui o meu muito obrigado pela confiança, amizade, pelas infindáveis oportunidades de aprendizagem regadas por tanto apreço e incentivo.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Flavio Vieira Meirelles primeiramente por me apresentar o mundo magnífico das Mitocôndrias!!! Pela generosa acolhida, possibilitando-me reflexões e crescimento. Obrigada pela solicitude em sempre querer ajudar e a sua prestimosa contribuição neste projeto.

A Profa. Dra. Fabiana Bressan, nossa querida Martini! Pelo exemplo de generosidade, você como ninguém soube aquietar meu coração nos momentos mais difíceis, renovando minha energia e coragem quando ela insistia em ir embora. Sou muito grata por toda ajuda e confiança depositada em mim!

A Profa. Dra. Daniele Martins pela convivência e ensinamentos durante todo o período de mestrado e doutorado, agradeço! Inclusive pelas boas risadas!!

A Profa. Dra. Celina .A. Furlanetto Mançanares pela amizade em primeiro lugar! Por me inserir na pesquisa, me ajudar em minha formação e por sempre estar ao meu lado me dando força! Miguixa sem você nada disso teria sentido! Te amo, melhor melhor tia coruja!

Ao Prof. Dr. Ricardo Moro pela solicitude em sempre querer ajudar, pelas palavras de conforto e contribuições significativas ao longo de minha formação.

Ao Prof. **Dr. Jean Paul Concordet** pela inestimável oportunidade concedida no *Muséum National d' Histoire Naturelle* e principalmente pelos os ensinamentos tão valiosos.

A **Marine Charpentier e Charlotte Boix** pela recepção, amizade e ajuda no momento de estágio no exterior. Sinto muita falta de vocês aqui no Brasil!

Ao Prof. **Dr. Marcos Chiaratti** pela solicitude em sempre me ajudar desde o início deste projeto.

A **Luíza Junqueira e Dra. Virgília Picanço** pela colaboração e ajuda com as transfeções em Ribeirão Preto.

Ao Prof. **Dr. José Ernesto Belizário** (ICB-USP) pela ajuda na concessão da bolsa de estudos para o exterior.

Ao **Renan Sper** que mesmo de longe sempre me auxiliou ! Muito obrigada mala!

A todos os meus colegas de trabalho do GDTI e LMMD, pela convivência e cumplicidade. Agradeço a cada um, todos foram imprescindíveis:

Ao **Fabio Cury**, pelo exemplo de seriedade, é muito bom estar ao lado de pessoas serenas como você, deixo aqui o meu muito obrigada! E vamos que vamos defender juntos no mesmo dia de novo! Acredito que dará sorte!

A **Luciana Machado** pelo exemplo de alegria! Como é bom ter pessoas como você por perto! Você alegrava meus almoços e cafés da tarde! Obrigada!

Ao nosso querido amigo **Atanasio Vidani**, pelo exemplo de simplicidade;

A nossa chaveirinha **Kelly Roballo**, pelo exemplo de determinação, obrigada por me erguer e dizer sempre *Acredite em Você!* Vai dar certo! Sua amizade foi e sempre será muito especial para mim!

A que para todos se chama **Valéria Lara**, mas para mim pode ser *Vanderleia, Valdirene* e até mesmo *Vanuza*!! Não importa! Agradeço-te Val pelo exemplo de ternura. Sua chegada ao laboratório alegrou os nossos dias, obrigada pelas palavras sábias de conforto e amizade;

A Alessandra Pinheiro, nossa querida Veia do Rio! Entre alegrias e dissabores, saberes e erros, medos e sonhos. Nunca imaginávamos que doses diárias de convivência entre Pirassununga até São João e vice e versa seriam momentos de tantas reflexões! Obrigada pelo exemplo de amizade!!!

A Aline Fernanda de Souza pelo exemplo disposição, mesmo o mundo caindo ela sempre se manteve firme e pronta

A Natalia Nardelli, pelo exemplo de superação, foram diversos os momentos de tristezas hoje já superados, te admiro por isso!

A Ingrid Gomes, Jéssica Orlandin e ICS pela companhia no laboratório!

Ao Gabriel Moreira por me apoiar em minhas loucuras científicas, pela amizade de anos e ajuda nos PCRs e Sequenciamentos, que me deixavam atordoadas. Sem você teria sido tão mais difícil! Muito obrigada!

Ao Gabriel, Heloisa e Kelly pela hospitalidade! Como é bom ter o aconchego mesmo longe de casa! Helo como seus stroggs surpresas me deixam feliz!

Ao Mateus Maldonado e Juliano Sagalli pela solicitude em sempre me ajudar nos momentos de desespero! Deixo aqui o meu muito obrigada!

A todos meus amigos e familiares (primos e tios) que sempre estiveram presentes e me apoiaram nesta jornada. Deixo aqui um agradecimento especial para minha tia Valdírene Oliveira pelas doces palavras de conforto e pelo apoio espiritual

A CNPq pela concessão da bolsa de estudos

Ao COFECUB pela concessão de bolsa no exterior

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) e ao Programa de Pós Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres (FMVZ/USP) pela possibilidade de execução desta tese.

A todos que não encontraram seus nomes aqui e que de forma direta ou indireta colaboraram para a concretização desta pesquisa.

*A pesquisa só engrandece minha crença na força de **Deus**, e por isso agradeço a Ele, por me dar todos os dias a coragem necessária para seguir em frente e por me mostrar que com sua ajuda, tudo é possível!*

RESUMO

OLIVEIRA, V. C. Edição do gene TFAM pela engenharia CRISPR Cas9 em modelo bovino. [Edition of TFAM gene by CRISPR Cas9 engineering in bovine model]. 2016. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O fator de transcrição A mitocondrial (TFAM) é um membro da subfamília HMGB que se liga a promotores do DNA mitocondrial (mtDNA). É um gene importante para a manutenção do mtDNA, pois regula o número de cópias e é essencial para inicialização da replicação e transcrição do mtDNA. Recentemente técnicas de edição gênica vêm sendo utilizada como uma ferramenta bastante eficaz na manipulação genômica. A nova tecnologia chamada de CRISPR/ Cas9 (Regularly interspaced clustered short palindromic repeats) utiliza um RNA guia (gRNA) curto que contém 20 nucleotídeos complementares a sequência de DNA. Quando o RNA guia se liga ao local alvo, a proteína Cas9 é recrutada para se ligar no local alvo e induzir a dupla quebra na cadeia de DNA. Neste contexto, este estudo propôs editar o gene TFAM pela tecnologia CRISPR Cas9, com o objetivo de gerar células Rho zero através do knock-out em fibroblastos bovinos. Os fibroblastos bovinos utilizados neste estudo foram derivados de uma biopsia de pele coletada de animais adultos. A sequência do gene foi obtida a partir do banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e esta foi inserida no site CRISPR direct (crispr.dbcls.jp) e no site rgenome (rgenome.net) a fim de desenhar o gRNA. O gRNA foi desenhado no exon 1 do gene TFAM bovino. Os fibroblastos foram cultivados e após as células atingirem 80% de confluência, estas foram eletrotransfectadas com Cas9 (Addgene 48668), gRNA, GFP e plasmídeo controle. Foi utilizado o kit Primary Mammalian Fibroblasts (VPI-1002) e a transfecção foi realizada no equipamento AMAXA Nucleofector 2B. Após a transfecção foi realizada a citometria de fluxo para avaliar a taxa de transfecção, e as células pós transfectadas foram plaqueadas em placas de 96 poços, pela técnica de sorting. O sorting separou uma célula por poço de 96. Após 20 dias em cultura essas células foram tripsinizadas em placas de 6 poços e o DNA genômico foi extraído, utilizando o kit Qiamp DNA microkit-Qiagen. Para avaliar a frequência de mutações, foi realizada a digestão com a enzima T7 endonuclease, e após confirmado mutações, os clones foram enviados para análise de sequenciamento. Observamos uma taxa de transfecção eficiente de 51,3%. Obtivemos 40 clones com DNA extraído para análise, no qual 7 destes possuíam mutações no local de inserção da CRISPR Cas 9. Com isso, concluímos uma heterozigose mostrando que o desenho da CRISPR foi eficiente, gerando uma deleção do gene TFAM.

Palavras-chave: TFAM. Mitocôndria. CRISPR Cas9. Bovino.

ABSTRACT

OLIVEIRA, V. C. **Edition of TFAM gene by CRISPR Cas9 engineering in bovine model.** [Edição do gene TFAM pela engenharia CRISPR Cas9 em modelo bovino]. 2016. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The mitochondrial transcription factor A (TFAM) is a member of HMGB subfamily that binds to promoters of mtDNA. It is a very important gene that maintains mtDNA, regulates the number of copies and is essential for the initiation of transcription mtDNA. Recently, gene edition techniques have been used as a very effective tool in genomic manipulation. The new technology called CRISPR/Cas9 (Regularly interspaced clustered short palindromic repeats) uses a short gRNA containing 20 nucleotides complementary to the DNA sequence. When gRNA binds to the target site, the Cas9 protein is recruited to bind in the chosen location and induce double strands breaks in DNA. In this context, this study proposed to edit the TFAM gene by CRISPR Cas9 technology aiming to generate Rho zero cell through the knock-out in bovine fibroblasts. Bovine fibroblasts used in this study were derived from a skin biopsy collected from an adult. The sequence obtained from the database GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) was inserted in the CRISPR direct site (crispr.dbcls.jp) and in the rgenome site (rgenome.net) to design the RNA guide. The gRNA was designed in the CRISPR direct site (crispr.dbcls.jp) for the Exon 1 of the gene TFAM bovine and after was performed the CRISPR cloning. The fibroblast were cultured and after reaching 80% of confluence, were electro-transfected with Cas9 (Addgene 48668) and control plasmids using the Nucleofector™ Kit for Primary Mammalian Fibroblasts (VPI-1002) and transfected with Cas 9 (Addgene 48668), GFP and control plasmid. Were used the Primary Mammalian Fibroblasts (VPI-1002) and the transfection was performed on the AMAXA Nucleofector 2B. Post transfected cells were analyzed by flow cytometry to evaluate the rate of transfection. The cells post transfected were further split into 1 cell/well (96- well plates for cell cloning). After days in culture these cells were trypsinized in 6-well plates and the genomic DNA was extracted using the Qiasm DNA microkit- Qiagen. To assess the mutation frequency, T7 endonuclease assay were performed and after confirmed the mutations, the clones were sent for sequencing analysis. We observed that the cells were efficiently transfected since they have a rate of 51,3% transfection. We obtained 40 clones with extracted for analysis, in which 7 of these had mutations at the insertion site of CRISPR/Cas 9. We concluded that until this moment the CRISPR design was efficient and that we obtained a deletion of the TFAM gene.

Keywords: TFAM. Mitochondria. CRISPR Cas9. Bovine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do DNA mitocondrial (mtDNA) de mamíferos, e os fatores nucleares responsáveis pela replicação e transcrição do mtDNA	22
Figura 2 - Mapa do vetor Cas9, figura adaptada Addgene 48668.....	38
Figura 3 - Esquema do desenho do gRNA no Exon1 do gene TFAM.....	38
Figura 4 - Mapa do vetor U6SK.....	40
Figura 5 - Alinhamento das sequências (mRNA) do TFAM bovino em relação ao TFAM humano.....	46
Figura 6 - Alinhamento das sequencias proteicas do TFAM bovino em relação ao TFAM humano, com similaridade de 79,29% entre as sequências.....	47
Figura 7 - Modelo criado da estrutura proteica do TFAM bovino em relação ao TFAM humano.....	48
Figura 8 - Sequência Bovina (NM_001034016.2) com os exons separados por cores, regiões não conservadas (azul escuro) e regiões que os aminoácidos se ligam ao DNA (números em roxo)	49
Figura 9 - Sequência Humana (NM_003201.2) com os exons separados por cores , regiões não conservadas (azul escuro) e regiões que a proteína se liga ao DNA (números em roxo)..	50
Figura 10 - Citometria de fluxo para análise dos programas transfecção por Amaxa Nucleofector.....	52
Figura 11 - Citometria de fluxo para análise da transfecção por Amaxa Nucleofector	54
Figura 12 - Taxa de transfecção por GFP positivo.....	55
Figura 13 - Taxa de transfecção por GFP positivo.....	56
Figura 14 - Taxa de transfecção por GFP positivo.....	57
Figura 15 - Análise por citometria de fluxo transfecção por lipofectamina.....	57
Figura 16 - Células transfectadas pós congelamento	58
Figura 17 - Gel de agarose 2,5% para o teste T7.	59
Figura 18 - Taxa de mutação por teste T7.....	60
Figura 19 - Cultivo dos clones selecionados.....	61
Figura 20 - Gel de agarose a 1,5%. PCR dos clones, região amplificada com 361 pb.	62
Figura 21 - Gel de agarose com 2,5% evidenciando por teste T7 os clones de 1 a 6.	63
Figura 22 - Gel de agarose com 2,5% evidenciando por Teste T7 os clones de 1 a 7.	64
Figura 23 - Análise de sequenciamento dos clones.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração de gRNA e Cas9 (Addgene 48668)	42
Tabela 2 - Primers utilizados para PCR/ T7 teste, desenhados no Exon 1	44
Tabela 3 - Transfecções com diferentes concentrações de Cas9	53
Tabela 4 - Protocolos de extração, concentração e pureza do DNA extraído.....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	20
2.1	Mitocôndria, DNA mitocondrial (mtDNA) e células Rho zero (p0).....	20
2.2	Herança Mitocondrial e Transferência Ooplasmica	23
2.3	O papel do TFAM.....	24
2.3.1	<i>TFAM bovino e humano</i>	25
2.4	Espécies reativas de oxigênio (ROS).....	26
2.5	Doenças mitocondriais e terapias	27
2.6	Edição Gênica como ferramenta para terapia	29
2.6.1	<i>Tecnologia CRISPR Cas9</i>	31
2.6.2	<i>Aplicações da técnica e futuras direções</i>	32
3	HIPÓTESE	34
4	OBJETIVO GERAL	35
4.1	Objetivos Específicos	35
5	MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1	Cultivo dos fibroblastos e congelamento celular	36
5.2	Análise da sequência.....	37
5.3	Construção do RNA guia (gRNA).....	37
5.4	Clonagem Gênica.....	39
5.4.1	<i>Hibridização</i>	39
5.4.2	<i>Vetor e Ligação</i>	39
5.4.3	<i>Transformação</i>	41
5.5	Protocolo de Transfecção	41
5.5.1	<i>Teste do programa de transfecção</i>	41
5.5.2	<i>Transfecção com gRNA e Cas9</i>	42
5.5.3	<i>Transfecção teste por lipofectamina</i>	42
5.6	Citometria de fluxo	43
5.7	Extração do DNA	43
5.8	PCR e teste T7	43
5.9	Clones	44
5.9.1	<i>Sorting de uma única célula</i>	44
5.9.2	<i>Separação dos clones e expansão</i>	44

5.9.3	<i>Caracterização e validação dos clones</i>	45
5.10	Avaliação de clivagem por sequenciamento Sanger	45
6	RESULTADOS	46
6.1	Análise da homologia das Sequências TFAM humana e bovina	46
6.2	Modelo da estrutura tridimensional da proteína do TFAM bovino versus TFAM humano	47
6.3	Análise dos Exons humanos e bovinos	48
6.4	Construção gRNA, Oligos e Clonagem Gênica	51
6.5	Cultivo celular e escolha do programa de transfecção	51
6.6	Transfecções do gRNA e Cas 9	53
6.6.1	<i>Transfecção 1</i>	53
6.6.2	<i>Transfecção 2</i>	54
6.6.3	<i>Transfecção 3</i>	55
6.6.4	<i>Transfecção 4</i>	56
6.6.5	<i>Transfecção por Lipofectamina</i>	57
6.7	Congelamento celular	58
6.8	Teste T7	58
6.9	Crescimento dos clones	60
6.10	Extração do DNA	61
6.11	Análise de PCR convencional	62
6.12	Teste T7 dos clones da Transfecção 1	63
6.13	Teste T7 transfecção 3	63
6.14	Análise de sequenciamento	64
7	DISCUSSÃO	66
8	CONCLUSÃO	72
	REFERENCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

A mitocôndria é uma organela presente no citoplasma das células eucarióticas. Possui um papel de fundamental importância para as células, sendo responsável pela síntese de ATP através do processo de fosforilação oxidativa, homeostase do cálcio e regulação de apoptose (KANG; HAMASAKI, 2007).

As mitocôndrias realizam processos químicos como o Ciclo de Krebs e energia aeróbica das células. São o principal sítio de reações oxidativas, sendo uma fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS). Com isso, entram em processo de regulação de apoptose, no qual o DNA mitocondrial (mtDNA) é o fator que está ligado a essa função (KANG; HAMASAKI, 2007).

As mitocôndrias possuem seu próprio DNA, o mtDNA (DNA mitocondrial), sendo este DNA circular, no qual se observa uma região específica denominada por D-loop, local que contém sítios de transcrição (HSP e LSP). Para garantir o seu funcionamento, a mitocôndria é coordenada por dois genomas, DNA nuclear (nDNA) e o DNA mitocondrial (mtDNA). No mtDNA múltiplas cópias existem no interior da célula, relacionadas com a síntese de ATP (KANG; HAMASAKI, 2005; KANG; HAMASAKI, 2007; CRISTOPHER et al., 2012).

O mtDNA pode causar falhas no processo de obtenção de energia, com isso pode gerar diversas mutações que estão associadas a doenças humanas. O genoma mitocondrial foi o primeiro completamente sequenciado, mas pouco se sabe sobre os processos de como o núcleo e as mitocôndrias interagem, como os mecanismos moleculares conduzem à doenças humanas, assim como é resultado os danos do mtDNA (KANG; HAMASAKI, 2007).

O fator A de transcrição mitocondrial (TFAM) é um membro da subfamília HMGB, composto estruturalmente por 2 domínios HMG box, o HMG1 e HMG2, que se ligam a promotores do mtDNA (CHOI et al., 2011). É um gene de grande importância, pois faz a manutenção do mtDNA, regula o número de cópias e é absolutamente necessário para a iniciação da transcrição do mtDNA (CHOI et al., 2011). Muitos estudos estão associando o gene TFAM ao funcionamento do mtDNA.

Gunter et al. (2004) consideram o TFAM um gene candidato para ser investigado devido o seu posicionamento e função na transcrição e replicação do DNA mitocondrial.

A possibilidade de modificar o genoma é uma realidade devido a diversas técnicas de edição gênica. É um método de extrema importância, pois podemos prever predisposição a patologias, como as mutações.

Recentemente, ferramentas de edição gênica vêm sendo utilizadas como as nucleases por gRNA conhecidas como CRISPR/ Cas 9 (Clustered regulary interspaced short palindromic repeats). É encontrada em bactérias e arqueas e é um mecanismo de defesa adaptativo contra o DNA exógeno (JINEK et al., 2012).

A tecnologia CRISPR/ Cas9 utiliza um gRNA curto que é uma junção de sequências tracrRNA com crRNA, que contém 20 nucleotídeos complementares a sequência de DNA, assim como um RNA guiado a nuclease Cas 9. Quando gRNA se liga no local alvo, a proteína Cas9 é recrutada para ligar no local escolhido e induzir uma quebra nas duplas fitas de DNA na região genômica (JINEK et al., 2012).

A ferramenta de edição gênica baseada em CRISPR Cas9 visará à edição do TFAM bovino em linhas celulares, e, além disso, a implementação de tal tecnologia será de extrema importância para estudos futuros baseados em edição gênica.

Dentre todos os genes que regulam a replicação e a transcrição mitocondrial, este é o que tem maior variabilidade interespecífica. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo editar o gene TFAM através da ferramenta de edição CRISPR Cas9, justamente por este gene regular a especificidade de replicação do mtDNA, conseqüentemente visando gerar uma célula Rho zero (p0) através do knock-out em fibroblastos bovinos.

O mecanismo CRISPR Cas9 surgiu como uma alternativa poderosa que vem sendo utilizado em diversas aplicações na medicina humana e animal. Nesse sentido, novas tecnologias que abordem modificações no genoma fazem necessário. A presente proposta propôs depletar o mtDNA através do knock-out, a fim de gerar um modelo de estudo que possibilita a análise da herança e segregação mitocondrial.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 mitocôndria, DNA mitocondrial (mtDNA) e células ROS ero (p0)

A mitocôndria é uma das organelas mais importantes. Encontra-se presente no citoplasma das células eucarióticas e é herdada através de herança materna. São estruturalmente cilíndricas, delimitadas por membranas possuindo 4 compartimentos: a membrana interna, membrana externa, espaço intermembrana e matriz (KANG; HAMASAKI, 2005).

Exerce a função de fornecer à célula energia em forma de ATP. A síntese de ATP é a principal função da mitocôndria é realizada pelo processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS), que se baseia no transporte e utilização de substrato por vários complexos enzimáticos. Através deste processo elétrons são doados à membrana interna mitocondrial. As cadeias transportadoras de elétrons são constituídas por 4 complexos adjacentes presos na membrana. O complexo I (NADH- coenzima Q oxirredutase) recebe elétrons do NADH, o complexo II (succinato-ubiquinona oxirredutase) recebe elétrons do succinato, o complexo III (ubiquinona oxirredutase) e o complexo IV (citocromo-c oxidase COX) são responsáveis por remover energia dos elétrons. Esse mecanismo de geração de energia deve funcionar devidamente para que todo o organismo obtenha a energia necessária para abastecimento dos mais diversos órgãos e tecidos (KANG; HAMASAKI, 2005; KANG; HAMASAKI, 2007).

A mitocôndria também tem funções no metabolismo energético de cálcio e ferro, transdução de sinal e apoptose. Essas funções são determinantes no desenvolvimento embrionário inicial em vários níveis, incluindo a organização do fuso, ciclo celular, compactação, eclosão de blastocisto e segregação cromossômica (MAY-PANLOUP et al., 2005).

O sistema genético mitocondrial é composto por um genoma de DNA circular, com cerca de 16.500 pares de bases nos mamíferos, o mtDNA bovino sendo composto por 16.338 pares de bases e o mtDNA humano por 16.568 pares de bases. O mtDNA contém 37 genes, codificando 13 proteínas, que são consideradas subunidades da cadeia respiratória, 2 rRNAs e 22tRNA, que estão envolvidos no processo de tradução dos RNAs (mRNAs) mitocondriais.

Os rRNAs e tRNAs são essenciais para a síntese das proteínas codificadas pelo DNA mitocondrial (mtDNA) (MEIRELLES et al., 1999; KANG; HAMASAKI, 2005; WALLACE, 2005; LARSSON E CLAYTON, 1995) (Figura 1).

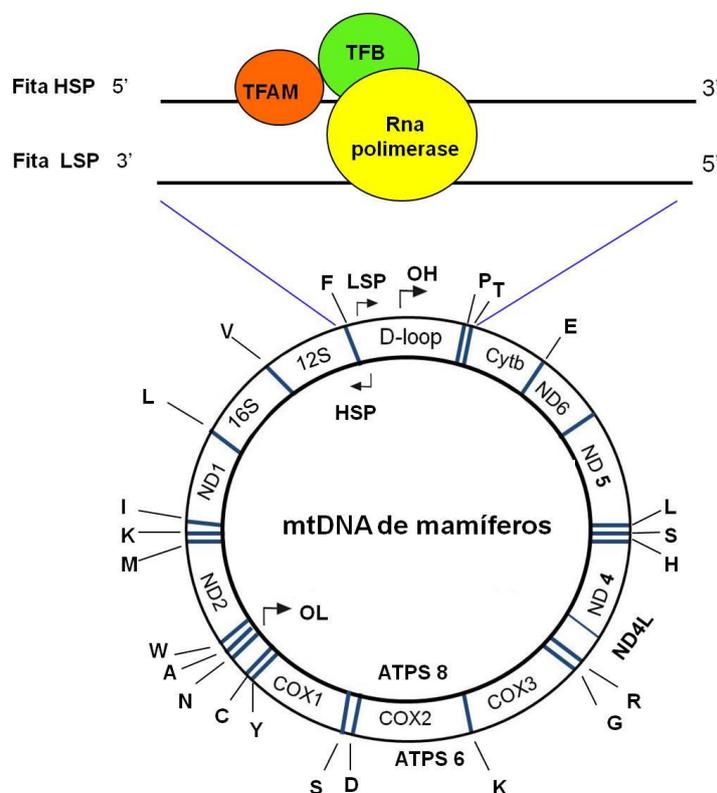
No mtDNA existem centenas de cópias em cada célula e o número de cópias irá variar de acordo com o metabolismo e tipo celular, diferente do que acontece no DNAn. Células mais especializadas que necessitam de mais energia como células musculares apresentam mais moléculas de mtDNA do que em outros tecidos (KANG; HAMASAKI, 2005). O número de cópias do mtDNA está relacionado com a capacidade de produção de ATP, e esta síntese pode ser comprometida quando sofre mutações (CHIARATTI et al., 2010).

O mtDNA é responsável por 15% da síntese de proteínas da cadeia respiratória, sendo o restante feito pelo DNA nuclear (DNAn). O DNAn é o responsável pela síntese de proteínas que terão funções diversas na mitocôndria como o controle da replicação e da transcrição do mtDNA. O funcionamento perfeito da mitocôndria depende da interação entre o DNA mitocondrial e o DNA nuclear (SHADEL; CLAYTON, 1997).

Existem diversos fatores de transcrição, tais como o fator nuclear respiratório 1 e 2 (NRF1 e NRF2). O NRF1 funciona como um fator de transcrição que ativa a expressão de alguns genes importantes que regulam o crescimento celular e os genes nucleares. Quando NRF1 e NRF2 estão juntos medeiam a expressão de diversas proteínas, como fatores de controle da replicação, transcrição e tradução do mtDNA (CHOI et al., 2011).

Ainda em relação à replicação e transcrição do mtDNA, sabemos que existe um local específico do mtDNA conhecido por D-loop, que contém os sítios promotores da transcrição, HSP e LSP (KANG; HAMASAKI, 2005; KANG; HAMASAKI, 2007; CRISTOPHER et al., 2012). A replicação do mtDNA conta com a DNA polimerase específica (POLG) que é codificada no núcleo. A transcrição bidirecional e a replicação dependem de fatores que ocorrem através do D-loop, em interação com o fator de transcrição mitocondrial (TFAM), fatores de transcrição B1 e B2 mitocondriais (TFB1M e TFB2M) e RNA polimerase (POLRMT). TFAM inicia a transcrição do mtDNA, na presença de RNA polimerase e fator de transcrição (TFB1M e TFB2M) (LARSSON; CLAYTON, 1995; FALKENBERG et al., 2002; EKSTRAND et al., 2004; KANG; HAMASAKI, 2007) (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática do DNA mitocondrial (mtDNA) de mamíferos, e os fatores nucleares responsáveis pela replicação e transcrição do mtDNA



Fonte: Oliveira VC (2016).

Legenda: D-loop é a região que contém os promotores HSP e LSP, esta região foi amplificada para ressaltar os fatores TFB2, RNA polimerase e TFAM que se ligam a promotores do mtDNA e ativam a transcrição e a replicação. A transcrição se inicia na fita HSP na origem de replicação e inicia a replicação na fita LSP ao passar pela origem de replicação OL. Os produtos da transcrição irão gerar 13 proteínas (Cytb1 a 3, ND1 a ND6, COX1 a COX3 e ATP5.), 22 RNA transportadores (E, L, S, H, R, G, K, D, S, Y, C, N, A, W, M, K, I, L, V, F, P, T), 2 RNA ribossômicos (16S e 12S).

A fim de entender melhor os mecanismos mitocondriais, em 1990 o grupo do pesquisador Giuseppe Attardi geraram células desprovidas de mtDNA, chamadas de células Rho zero ou p0. Criaram uma linhagem que poderia ser mantida viva em cultura quando suplementada em meio de cultura com uridina e piruvato. O objetivo de gerar essas células foi realizar uma experiência de fusão com citoplastos de pacientes (células sem núcleos) para avaliar as mitocôndrias do paciente (SCHUBERT et al., 2015).

O procedimento adotado para gerar as células sem mtDNA, foi a utilização de brometo de etídio em meio de cultura, a fim de depletar o mtDNA das células, durante um período de 4 a 8 semanas período em que as células perdem seu mtDNA devido a redução da taxa de replicação (SCHUBERT et al., 2015).

2.2 Herança Mitocondrial e Transferência Ooplasmica

Em mamíferos a herança mitocondrial é uniparental, especificamente chamada de herança materna. Em geral, o mtDNA paterno é perdido durante as primeiras divisões celulares embrionárias e não contribui para a descendência do mtDNA, embora haja relatos da presença da linhagem paterna em tecidos somáticos (SCARPULLA, 2002).

Outro fator considerável é que as mitocôndrias paternas são marcadas com ubiquitina para serem destruídas no estágio inicial do desenvolvimento embrionário. A eliminação do mtDNA paterno é favorável, pois este é exposto a uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SUTOVSKY et al., 2000).

Mesmo com a eliminação das mitocôndrias paternas, as mutações encontram-se presentes no mtDNA. As células contêm milhares de moléculas de mtDNA, na maioria dos casos a sequência é idêntica, conhecida como homoplasmia. No entanto, uma reparação ineficiente do mtDNA ou mesmo um ambiente oxidativo aumenta a replicação, causando mutações (SACARPULLA, 2008).

O mtDNA é um genoma de múltiplas cópias. Um indivíduo pode abrigar mais do que uma única sequência, uma condição referida como heteroplasmia, ou seja moléculas mutantes e selvagem podem coexistir em uma mesma célula (SACARPULLA, 2008).

Uma variante da sequência prejudicial pode ser tolerada, em número de baixas cópias, porque o produto do gene defeituoso não atinge o limiar para destruir a função da célula. No entanto, as variantes da sequência se segregam rapidamente de heteroplasmia para homoplasmia, passando para a geração seguinte. Isto pode resultar em prole em que a variante prejudicial predomina, levando a um fenótipo mitocondrial defeituoso (SACARPULLA 2008).

Muitas mutações patogênicas são heteroplasmicas. Diversos estudos vêm avaliando mecanismos de herança mitocondrial e segregação dentro de uma mesma espécie, assim como em espécies diferentes através da transferência ooplasmica.

A transferência ooplasmica, também chamada de transferência citoplasmática, é um mecanismo que transfere parte do citoplasma de um oócito doador que é microinjetado no citoplasma de um receptor.

Ferreira et al. (2010) e seus colaboradores, avaliaram a transferência ooplasmica em espécies do mesmo gênero utilizando como doador *Bos primigenius indicus* e como receptor *Bos primigenius taurus*. Embora tenha sido mostrada a compatibilidade interespecífica, foram encontrados níveis moderados de heteroplasmia.

Em espécies diferentes (Búfalo e Bovino), não houve manutenção da organela de origem interespecífica. Este estudo transferiu de 10 a 15% de ooplasma de búfalos em zigoto bovino para avaliar a persistência do mtDNA de búfalos. Foi, entretanto observado que o citoplasma introduzido em zigoto bovino, não comprometia o desenvolvimento do animal, assim como quando há mitocôndria interespecífica a replicação não acontece (CHIARATTI et al., 2010).

2.3 O papel do TFAM

O fator de transcrição A mitocondrial conhecido como TFAM foi estudado primeiramente por Fisher e Clayton (1985), estes notaram que o gene TFAM era extremamente necessário para a transcrição do DNA mitocondrial, junto com a DNA polimerase mitocondrial e fator de transcrição B2 (TFB2).

TFAM é uma proteína que é codificada no núcleo e é exportada para a mitocôndria (HALLBERG; LARSSON, 2011). Foi identificado pela primeira vez como um grupo de alta mobilidade (HMG- High Mobility Group), sendo um importante fator de transcrição mitocondrial, pois é composto por dois domínios que estimulam a transcrição através de ligação específica a locais de reconhecimento nos promotores LSP e HSP (GARSTKA et al., 1994; SCARPULLA, 2002).

A ligação de TFAM ao seu local de reconhecimento promove a transcrição bidireccional, facilitando a interação com a RNA polimerase mitocondrial (POLRMT) e ativando (*in vitro*) a transcrição junto aos dois promotores o HSP e LSP. Os promotores mitocondriais resultam no dobramento do mtDNA que é de fundamental importância na ativação da transcrição mitocondrial. A cauda C-terminal de TFAM é essencial para a ativação da transcrição (GARSTKA et al., 1994; FALKENBERG et al., 2002; LARSSON; HALLBERG, 2011; KUKAT; LARSSON, 2013).

O TFAM é caracterizado como um gene de cópia nuclear única é regulado pelo NFR-1, assim como diversos outros genes. Também tem um papel importante na replicação do DNA mitocondrial porque a iniciação da replicação é dependente de um primer iniciador de RNA formado pela transcrição a partir de LSP (KUKAT; LARSSON, 2013).

É um gene de dupla função, além de realizar a transcrição e o também faz o empacotamento do DNA. Ao contrário do DNA nuclear o mtDNA não está associado a histonas, dentro da matriz mitocondrial existem complexos núcleoproteicos associados a membrana interna chamados de nucleoides. O mtDNA presente na mitocôndria forma esses nucleoides em seu interior e cada nucleoide contém de 2 a 10 cópias de mtDNA. Diversas proteínas podem estar associadas a este, inclusive o TFAM, pois este possui a capacidade de se ligar em sequências não específicas do mtDNA, formando este complexo (CANIGOVI et al. 2010).

O TFAM também pode estar associado ao reparo de DNA, diversos estudos mostraram esta relação, como os relatos de Canugovi et al. (2010), em que avaliaram a atividade da DNA glicosilase junto ao TFAM. Observaram que p53 estimulava o reparo quando estava na presença de TFAM. Este estudo levantou a hipótese de que o empacotamento do DNA relacionado ao TFAM pode desempenhar uma proteção contra oxidações, como por exemplo ROS (espécies reativas de oxigênio). Assim como TFAM possui um papel fundamental na manutenção da estabilidade mitocondrial.

2.3.1 *TFAM bovino e humano*

O gene está localizado no cromossomo 10, possui uma sequência composta por 7 exons, com um tamanho de 5.223 pares de bases (KANG; HAMASAKI, 2005).

O gene do TFAM bovino está localizado no cromossomo 28, possui uma sequência composta por 7 exons, com um tamanho de 1.266 bp. Este é expresso nuclearmente e é importado para as mitocôndrias (MAY-PANLOUP et al., 2005).

2.4 Espécies reativas de oxigênio (ROS)

As espécies reativas de oxigênio são representadas por moléculas e radicais livres, através do metabolismo do oxigênio. Os organismos expostos ao oxigênio produzem espécies reativas de oxigênio no seu metabolismo normal. Embora sejam produzida fisiologicamente durante o metabolismo celular, a produção excessiva de ROS contribui para danos em uma variedade de patologias (SILVA; GUERRA, 2010).

Mitocôndrias são importantes fontes de ROS dentro da maioria das células de mamíferos. Os primeiros estudos sobre a teoria que a cadeia respiratória de produção de ROS se iniciou com Jensen (1996) que demonstrou que mitocôndrias isoladas podem produzir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). E, após, foi demonstrado que H_2O_2 surgiu a partir da dismutase do super oxido $O_2^{\cdot-}$.

ROS podem danificar macromoléculas mitocondriais, portanto, além de as mitocôndrias exercerem o papel como fonte de ROS, estas podem ser danificadas por ROS. O mtDNA é suscetível a danos causados por ROS por diversas razões. Primeiramente, pois a mitocôndria não possui uma cromatina constituída por proteínas de histonas, que servem como uma barreira protetora contra ROS. Segundo, o mtDNA tem uma atividade de reparo limitada contra danos do DNA. Terceiro, uma grande parte de $O_2^{\cdot-}$ que é formado dentro das mitocôndrias não passa através das membranas, e, portanto danos por ROS podem ser contidos em grande parte dentro das mitocôndrias (TSUTSUI et al., 2009).

Com isso, o mtDNA acumula níveis significantes do produto da oxidação do DNA, ao contrário dos genes codificados pelo núcleo, a expressão dos genes codificados pela mitocôndria é amplamente regulado pelo número de cópias mitocondriais (TSUTSUI et al., 2009).

Contudo, ROS pode causar danos ao mtDNA, bem como declínio dos transcritos de RNA mitocondrial (mtRNA), síntese protéica e função mitocondrial (TSUTSUI et al., 2009).

2.5 Doenças mitocondriais e terapias

A mitocôndria é uma organela responsável pela produção de energia em forma de ATP, através do processo de fosforilação oxidativa. É descendente evolutivo de uma célula procariótica aeróbia, propondo-se que as mitocôndrias tornaram-se especializadas na síntese de energia posteriormente a simbiose com uma célula anaeróbica. Diversas mutações no nDNA e mtDNA vem sendo descobertas desde a década de 60, no qual podem-se observar um número crescente de doenças humanas (KANG; HAMASAKI, 2007).

O que caracteriza as doenças mitocondriais são que as mutações do mtDNA podem causar falhas no processo de obtenção de energia nas células, que comprometendo a cadeia transportadora de elétrons e a função mitocondrial (MAY-PANLOUP et al., 2005).

As doenças mitocondriais apresentam-se de forma sistêmica em humanos e variam de nível leve a mortal (NASSEH et al., 2001). Os defeitos moleculares encontrados são em deleções e duplicações, sendo que a grande maioria das mutações ocorre em genes de RNA transportador (tRNA) (MAY-PANLOUP et al., 2005).

Foram descobertas diversas patologias humanas referentes ao mtDNA. Os exemplos típicos são síndrome de Kearns- Sayre (SKS); mutação com deleções simples e múltiplas e duplicação do mtDNA, sendo as principais características oftalmoplegia e retinite pigmentosa e síndrome de Pearson, mutação com deleções múltiplas, esporádicas do mtDNA, sendo que os pacientes que sobreviventes adquirem tardiamente a síndrome de Kearns-Sayre (BEYNUM et al., 2012).

Dentre tantas a síndrome de MERRF (Epilepsia mioclônica com fibras rotas vermelhas) apresenta uma mutação heteroplásmica na região 8344 do gene tRNA^{lys}, mas em algumas famílias ocorre na posição 8356 do gene tRNA^{lys} (WALLACE et al., 1988). Ao diagnóstico de MERRF, estão associadas à encefalopatia associado à epilepsia mioclônica, ataxia cerebelar, miopatia e atrofia óptica (NASSEH et al., 2001).

A síndrome de LHON (neuropatia óptica hereditária de Leber) com mutação a A11778G (Complexo I da cadeia respiratória- ND4), identificada pela troca do aminoácido arginina por histidina, sendo que outras mutações também ocorrem como a G3460A identificada pela troca do aminoácido Alanina por treonina, codificada pelo gene ND1, e a

mutação T14484C com a troca do aminoácido metionina na proteína codificada pelo gene ND6, caracterizada pela perda da acuidade visual (central e bilateral) de forma indolor.

A doença NARP (neuropatia, ataxia e retinite pigmentar) é caracterizada pelo atraso de desenvolvimento, cardiomiopatia hipertrófica, convulsões, ataxia e retinite pigmentosa. É uma doença de herança materna, geralmente se desenvolve na infância, é caracterizada por duas mutações do mtDNA, a T8993 G e T8993 no gene mitocondrial que codifica para a subunidade do complexo IV (ATPase 6) (ZEVIANE et al., 1996).

A MELAS (Encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios similares a acidentes vasculares cerebrais) é uma doença que pode aparecer em qualquer idade. Os sintomas geralmente são ataxia, cardiomiopatia, diabetes, retinite pigmentosa, problemas no túbulo renal e acidose láctica. A mutação ocorre do gene para o tRNA da leucina, realizando a troca de A por G no mtDNA (A3243G) (GOTO et al., 1991).

Tratamentos efetivos e específicos para as doenças mitocondriais ainda não estão disponíveis. Existe tratamentos como dietético com suplementação de vitaminas, tratamento da deficiência CoQ10 e o uso de fármacos, mas infelizmente os tratamentos não tiveram resultados significativos, muitas vezes em alguns pacientes o tratamento teve efeitos adversos (SOUZA; GIUGLIANI, 2001).

O sequenciamento de DNA humano e o desenvolvimento de modelos experimentais para doenças mitocondriais permitem prever um avanço no entendimento da fisiopatologia dessas doenças que ocorrerá nos próximos anos. A pesquisa das doenças mitocondriais tem atraído a atenção de pesquisadores de diferentes áreas, pois sabemos que a mitocôndria está ligada no processo de apoptose, neurodegeneração e envelhecimento. Embora sejam inúmeros fatores que causam as doenças mitocondriais, poucos apresentam explicações plausíveis (SOUZA; GIUGLIANI, 2001).

No momento, o grande enfoque está sendo na prevenção para as gerações seguintes. Também estão sendo traçadas estratégias que visam corrigir o funcionamento anormal da cadeia respiratória, sendo o principal objetivo aumentar a produção de ATP.

Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de gerar possibilidades de prevenção para redução de transmissão de doenças mitocondriais. Uma das alternativas avaliadas é o diagnóstico pré-implantação, que seria a remoção de uma célula de embriões fecundados (*in vitro*), na qual poderá ser estimado a quantidade de DNA mutante, selecionando e utilizando somente embriões com baixo risco de mutação, transferindo-os para o útero da mãe (HUA et

al., 2007). Outra alternativa é a técnica de transferência nuclear, que consiste na troca de mtDNA entre duas células, em que o núcleo (célula doadora) será isolado e transferido para uma célula anucleada, onde a célula receptora irá fornecer seus componentes citoplasmáticos, sendo esta uma boa ferramenta para prevenção de doenças mitocondriais (ROBERTS, 1999).

2.6 Edição gênica como ferramenta para terapia

A edição precisa do genoma vem sendo utilizada como uma ferramenta bastante eficaz na manipulação genômica. É compreendido como um fragmento de DNA exógeno introduzido na célula que irá substituir um segmento endógeno de DNA. O método é utilizado em vários experimentos como também é uma importante ferramenta a ser utilizada na terapia gênica (BRADLEY et al., 1992).

Para ser realizada a edição no genoma alvo, é necessária a criação de uma quebra na dupla fita de DNA no locus genômico a ser modificado. A dupla quebra do DNA abre caminhos para reparo de uma célula, quanto para a engenharia do genoma (BRADLEY et al., 1992).

Na maioria dos organismos a edição de genoma conta com a quebra dupla do DNA em locais específicos. A edição pode ocorrer por recombinação homologa (HR) ou por recombinação não homologa (NHEJ) (BRADLEY et al., 1992).

NHEJ pode levar à introdução eficiente de inserção / deleção (indels) de vários comprimentos, o que pode comprometer a estrutura de leitura transcricional de uma sequência de codificação ou os sítios de ligação em promotores. Já o reparo mediado por HDR pode ser utilizado para introduzir mutações pontuais específicas ou para inserir sequências desejadas por meio da recombinação com o locus alvo fornecido (BAKER, 2012).

Segundo Porteus e Baltimore (2003) a quebra nas duas fitas de DNA no genoma receptor aumenta a eficiência do gene alvo. Para realizar uma quebra na fita dupla de DNA no local desejado foram desenvolvidos diversas técnicas como as Zinc Finger Nucleases (ZFNs) que são proteínas artificiais construídas através da fusão com vários domínios de ligação de Cys2 e His2 mais o domínio de clivagem FokI, sendo que cada domínio de ligação compreende a 4 aminoácidos, um sítio de 3 pares de bases, sendo que o monômero ZFN apresenta 3 a 6 unidades de ligação ao DNA, produzindo a quebra em sítios pré-

determinados (KIM et al., 1996; SMITH et al., 2000; LIU et al., 2002; RADECKE et al., 2010; PATTANAYAK et al., 2011).

Outras técnicas também são utilizadas como Cre-Lox, uma tecnologia de recombinação específica do local alvo, que é utilizada para a realização de deleções, inserções, inversões e translocações no DNA. A recombinase Cre deriva do bacteriófago P1 e requer apenas um pequeno local (Lox P com 34 bp) para catalisar a recombinação. A expressão da recombinase Cre ativada pelo promotor, catalisa a recombinação entre os locais loxP e inativa o gene. O tempo de expressão da recombinase Cre pode ser controlado utilizando sistemas indutores da sua expressão como sistemas virais (adenovírus e lentivirus) (STERNBERG et al., 1986).

A tecnologia TALENS (transcription activator like effector nucleases) utiliza o domínio FokI como modo de clivagem do DNA e funciona como dímeros. Os domínios de ligação do DNA de TALEN são compostos por uma série de repetições de sequências de DNA das bactérias patogênicas do gênero *Xanthomonas*. Cada repetição é composta por 34 aminoácidos em geral. A especificidade de reconhecimento do DNA é conferida pelo aminoácido altamente variável nas posições 12 e 13 (LI; YANG, 2011; BAKER, 2012; SUN; ZHAO, 2013).

Todas as técnicas de edição vêm possibilitando avanços importantes, sendo aplicadas em diversos organismos, mas cada um tem seu próprio conjunto de vantagens e desvantagens associadas. As ZFNs possuem a dificuldade de atingir o local desejado, possui a falta de especificidade de alguns domínios, em que pode gerar a não clivagem do DNA, levando a mutações indesejáveis. As ZFNs e TALENs são métodos de montagem difíceis, sendo necessária a montagem em empresas especializadas, tornando-se assim uma técnica de alto custo. Já a Cre-Lox é considerada uma tecnologia de baixa eficiência, porém em alguns estudos esta técnica vem sendo utilizada para induzir a expressão tecido específica (PATTANAYAK et al., 2011; LI; YANG, 2011).

Recentemente a técnica chamada CRISPR Cas9 surgiu como uma ferramenta alternativa na edição gênica. Esta vem sendo considerada uma tecnologia de grande eficiência, devido à simplicidade de criar o direcionamento através da construção de um oligonucleotídeo curto de DNA em um plasmídeo apropriado, além disso, é uma técnica de baixo custo que leva um curto espaço de tempo de montagem.

2.6.1 *Tecnologia CRISPR Cas 9*

Os procariotos são expostos a inúmeras infecções, tanto por vírus quanto por plasmídeos. As bactérias possuem uma série de mecanismos para equilibrar estas invasões, sendo um deles é o sistema imunitário adaptativo CRISPR (BHAYA et al., 2011).

O locus CRISPR varia entre os organismos, o mesmo acontece com o número de repetições. O comprimento de repetições varia de 21-47 pares de bases, com uma média de 32 pares de bases. Para um dado CRISPR, as repetições são quase sempre idênticas em comprimento e sequência. Essas repetições são separadas por sequências únicas chamadas de espaçadores, que são fragmentos de DNA do invasor (BHAYA et al., 2011; FINERAN; RON, 2014).

O mecanismo CRISPR é dividido em três fases: Adaptação, Expressão e Interferência. No momento da adaptação as sequências de ácidos nucleicos a partir do invasor (espaçadores) são incorporadas para a matriz CRISPR na sequência líder. Esse processo requer proteínas Cas 1 e Cas2, as quais são universalmente presentes no genoma que tem o sistema CRISPR funcional, sendo assim características do sistema. Na segunda fase definida por Expressão, um transcrito primário ou pré- RNA CRISPR (pré-crRNA) será gerado do locus CRISPR, no qual será transcrito pela RNA polimerase. Já a terceira etapa é a fase de interferência, o pré-crRNA é processado em crRNAs curtos que contém totalidade ou parte do espaçador e as repetições CRISPR. Os crRNAs formam um complexo ribonucleoproteína com as proteínas Cas para o ácido nucleico do invasor (DNA ou RNA) resultando na clivagem deste (BHAYA et al., 2011; JIANG et al., 2013; FINERAN; RON, 2014).

Atualmente o sistema mais adequado para a maioria das aplicações na engenharia genética é o sistema CRISPR Cas Tipo II. Este sistema Tipo II utiliza apenas uma única proteína conhecida por Cas9. O processo baseia-se da seguinte forma: cada crRNA formará um complexo com um segundo RNA chamado de trans-ativação crRNA (tracrRNA) um DNA conservado da bactéria. A fusão destes dois RNAs (crRNA e tracrRNA) formará o gRNA que contém uma sequência com aproximadamente 20 pares de bases para ligação ao DNA alvo e este seguido por uma sequência chamada protospacer motifs adjacentes (PAM), que é uma sequência curta que servirá para identificar o DNA alvo juntamente com a Cas9. O sistema

CRISPR Tipo II é o mais amplamente utilizado sendo este derivado de *Streptococcus pyogenes*. A sequência PAM compreende esta NGG localizada no fim 3' da sequência de reconhecimento gRNA (HSU et al., 2014; SANDER; JOUNG, 2014).

Para a Cas 9 se ligar com sucesso ao DNA, a sequência alvo no DNA genômico deve ser complementar a sequência de gRNA e deve ser seguida pela sequência correta PAM. A sequência PAM está presente na sequência do alvo, mas não na sequência do gRNA, que só servirá como guia. O CRISPR loci não contém a sequência PAM. Então este não será cortado pela Cas9, somente o DNA alvo conterá a sequência PAM e este será clivado pela a Cas9 (SANDER; JOUNG, 2014).

O sistema CRISPR tipo II foi adaptado para induzir a dupla quebra do DNA em locais específicos da sequência e edição de genoma segmentado. De forma simples, dois componentes devem ser introduzidos ou expressos em células ou através de um organismo para realizar a edição no genoma: A nuclease Cas9, o gRNA que consiste em uma fusão de crRNA e tracrRNA. Este gRNA deverá conter 20 nucleotídeos na extremidade 5' do gRNA e uma sequência PAM de identificação para a Cas9 clivar (SANDER; JOUNG, 2014).

2.6.2 Aplicações da técnica e futuras direções

Os gRNA vem sendo montados em uma ampla gama de tipos celulares e organismos. Estes testes são realizados através de diferentes métodos de transfecção. Em células de mamíferos pesquisadores utilizam eletroporação, nucleofecção e transfecção para expressão Cas9 e gRNA. Vetores lentivirais e lipofectamina tem sido utilizados através de gRNA baseados em humanos e camundongos. Além de modelos animais e linhagens celulares, a CRISPR Cas9 tem sido utilizada em várias plantas (SANDER; JOUNG, 2014).

A edição do genoma mediada por Cas9 permitiu a geração de diversos modelos transgênicos expandindo a pesquisa biológica, criando novos modelos de estudo. Para a geração de novos modelos celulares, a Cas9 pode ser facilmente introduzida nas células alvo através da transfecção de plasmídeos que transportam a Cas9 e o gRNA previamente desenhado. Para a geração de modelos transgênicos, pode-se usar diretamente em zigotos fertilizados para atingir modificações genéticas, assim como injeções *in vitro* diretamente nos

embriões. Essa forma de aplicação vem sendo desenvolvidas em diversos animais tais como: peixe zebra, camundongos, ratos e macacos (HSU et al., 2014; SANDER; JOUNG, 2014).

Através da facilidade da nova tecnologia é obtida com a facilidade de interrupção de genes específicos em muitos modelos não previamente passíveis de estudos genéticos desse tipo como: o rato ou o peixe-zebra (SANDER et al., 2011). Assim como editar as células-tronco e diferencia-las em tipos celulares de interesse.

As estratégias para alterar as mutações permanecem como prioridade na utilização da técnica. O desenvolvimento de pesquisas baseada na tecnologia CRISPR Cas9 tem sido focado no método de induzir HDR, NHEJ, bem como implementação de estratégias de multiplex (SANDER; JOUNG, 2014).

Recentemente Cyranoski (2016) tornou-se o primeiro a injetar em humanos, células que contém genes editados pela técnica de CRISPR Cas9. Os experimentos ainda estão em processo, estão utilizando 3 ensaios clínicos contra câncer de próstata, bexiga e células renais.

A simplicidade, alta eficiência e ampla aplicabilidade do sistema CRISPR Cas9 podem transformar a pesquisa biológica e biomédica. A facilidade de alterar sequências, assim como a expressão de um gene pode ser utilizada em qualquer organismo ou tipo celular de interesse dando abertura para o tratamento de uma ampla variedade de doenças humanas e de animais (SANDER; JOUNG, 2014).

3 HIPÓTESE

É possível gerar uma célula Rho zero através da edição gênica “knock-out” por CRISPR Cas9.

É possível manter essas células em cultura com a suplementação de uridina e piruvato.

4 OBJETIVO GERAL

Gerar uma nova linhagem celular Rho zero através do knock-out do gene TFAM em fibroblastos bovinos através da tecnologia CRISPR Cas9, visando / avaliar a letalidade celular e depleção do mtDNA confirmando seu papel na manutenção do mtDNA em bovinos.

4.1 Objetivos Específicos

- Analise de diferentes desenhos e oligos;
- Avaliar a taxa de transfecção em fibroblastos bovinos;
- Manter os clones viáveis em cultura;
- Avaliar a taxa de criopreservação das células;
- Gerar edição nos fibroblastos através da inserção do RNA guia e Cas9;

5 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório Structure and Instabilité des Genomes localizado no Muséum National d'Histoire Naturelle/Paris, no Laboratório de Células Terapias Gênicas, Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento localizado no Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo, Campus Pirassununga e no Hemocentro do Campus USP de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEUA nº 5828250215) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/FMVZ-USP.

5.1 Cultivo dos fibroblastos e congelamento celular

Os fibroblastos bovinos utilizados neste estudo foram obtidos através da coleta de um fragmento de pele de um indivíduo adulto. O tecido retirado foi lavado com tampão fosfato salino (Phosphate buffer saline, PBS), dividido em pedaços menores e incubado por 3h a 38,5° C em solução de colagenase IV (Sigma, 0,040g/mL). Após a incubação, o tecido digerido foi lavado e plaqueado em meio de cultivo DMEM (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (Hyclone) e antibióticos (Gibco). Após o procedimento de transfecção para manter as células knock-out em cultura, o meio de cultura DMEM (Gibco) além da suplementação normal de cultivo, também foi suplementado com 50µg/mL de uridina e com 100 µg/mL de piruvato.

Para congelamento celular o “pellet” celular foi ressuspendido em meio composto por 70% de meio DMEM (Gibco) suplementado com 20% de SFB, 10% de DMSO e 1% estreptomicina/penicilina, distribuídos em criotubos (1ml para cada criotubo) e posteriormente os criotubos foram transferidos para o aparelho *Mr Frost* e mantidas em freezer -80°C (por aproximadamente 16 horas). Após os criotubos foram acondicionados em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenados.

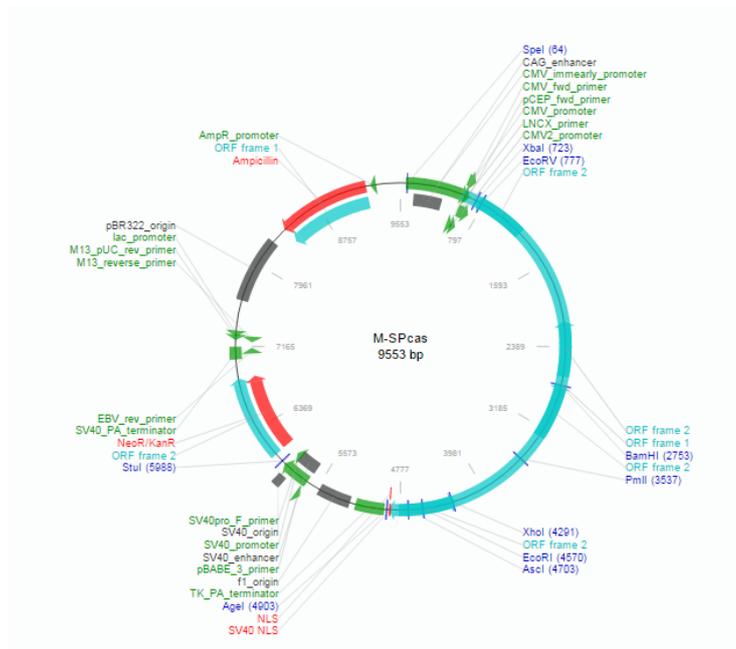
5.2 Análise da sequência

Foi realizada a análise da similaridade da sequência bovina/ humana, através do alinhamento pelo programa Clustal W2. Através do programa Chimera 1.8 foi criado um modelo de análise comparativa da estrutura tridimensional da proteína do TFAM bovino versus TFAM humano, em que foi possível observar as regiões conservadas e não conservadas em comparação com as duas espécies estudadas e os locais que os aminoácidos se ligam ao DNA. Para melhor compreensão das regiões conservadas do gene e região de ligação com o DNA, utilizamos as sequências e estrutura da proteína do gene TFAM humano obtidas do banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) para criamos um modelo tridimensional da estrutura proteica das duas espécies em questão.

5.3 Construção do RNA guia (gRNA)

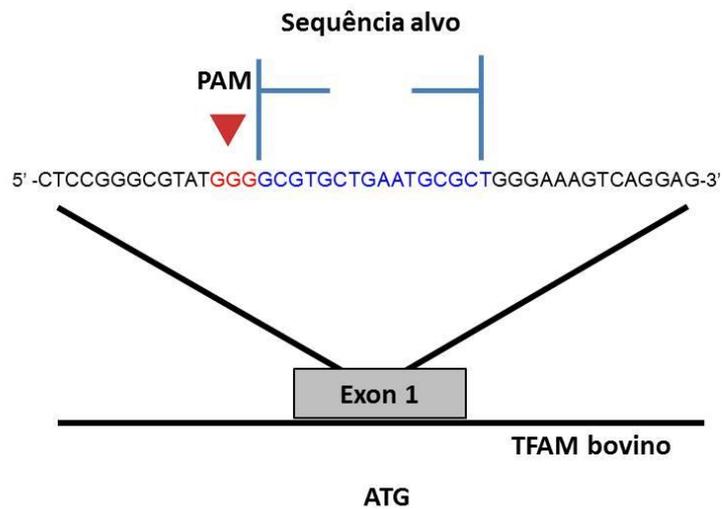
Foi realizado o desenho do gRNA para atingir a sequência alvo junto com a Cas9 (Addgene 48668) (Figura 2). Diferentes gRNAs foram desenhados para o Exon 1 do gene TFAM em bovinos. A sequência foi obtida no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Esta foi inserida no site Crispr direct (crispr.dbcls.jp) e no site rgenome (rgenome.net). Foram selecionados 4 diferentes gRNA com menor número de offtarget que são mutações em diferentes locais fora do local alvo e as sequências PAM foram selecionadas para direcionamento da Cas9 (Figura 3).

Figura 2 - Mapa do vetor Cas9, figura adaptada Addgene 48668



Fonte: Esvelt et al. (2013).

Figura 3 - Esquema do desenho do gRNA no Exon1 do gene TFAM



Fonte: Oliveira, V. C., (2016).

5.4 Clonagem gênica

Toda a clonagem foi realizada através dos protocolos de hibridização, ligação e transformação.

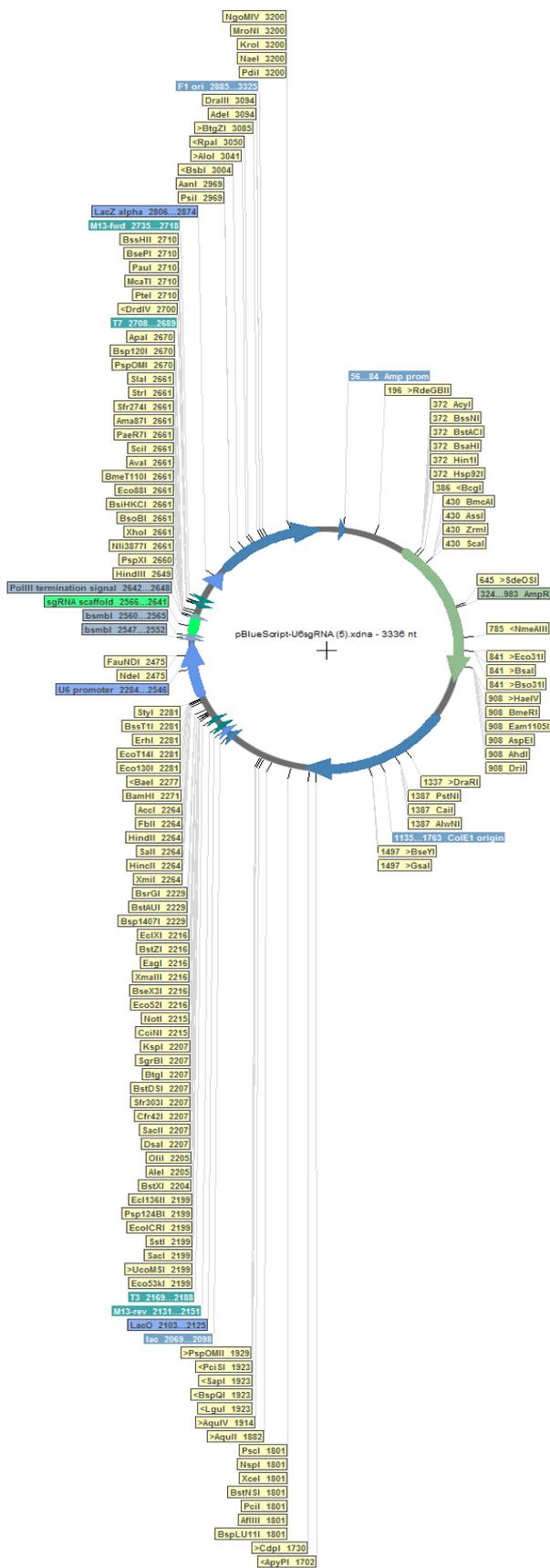
5.4.1 Hibridização

Os oligos gRNA sintetizados foram ressuspensos em água no volume de 100 mol/ μL . Após 5 μL do primer sense e 5 μL do primer antisense foram separados e adicionados em um mix com 35 μL de água, 5 μL de Buffer NEB2, este foi hibridizado na temperatura de 90°C por 5 minutos e após, mantido em temperatura ambiente por 2 horas.

5.4.2 Vetor e Ligação

Foi utilizado 1 μL da hibridização com 5 μL de T4 DNA ligase (Invitrogen®)/Buffer T4 junto com 9 μL do mix do vector U6SK (Figura 4) com Buffer T4 e Água. O total da reação foi de 15 μL . A mistura foi incubada a 16 °C por 1 hora e, após, a 65°C por 10 minutos, para inativação da enzima.

Figura 4 - Mapa do vetor U6SK



5.4.3 Transformação

Bactérias *Escherichia Coli* C3019 (NEB 10-beta) foram transformadas pela técnica de choque térmico do seguinte modo: 2µL da reação de ligação foram misturados com 7µL e foram incubados em gelo por 30 minutos. Após foram transferidos para o banho maria a 42 °C por 30 segundos. Em seguida foram acrescentados 200µL de meio LB. A cultura foi então incubada a 37 °C por 1 hora e então espalhada em meio LB/ Amp/ Ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas para o aparecimento das colônias. Após 16 horas, cada colônia foi colocada em 25 mL de meio LB com ampicilina. Estas foram incubadas sob agitação por 12 horas e após foram retiradas, realizando o procedimento de miniprep seguido de sequenciamento.

5.5 Protocolo de Transfecção

Os fibroblastos coletados cultivados com 85% de confluência foram lavados em solução dPBS. Em seguida foram adicionados 3mL de Tripsina por 5 minutos. Após foram adicionados 10mL de meio de cultura DMEM para a inativação da tripsina. As células foram contadas e aliquotadas, baseando-se no cálculo de 1×10^6 células para o procedimento pelo protocolo de transfecção da Empresa Lonza equipamento AMAXA Nucleofector.

5.5.1 Teste do programa de transfecção

Para o primeiro teste de transfecção utilizamos o equipamento AMAXA Nucleofector 2B com a solução Nucleofector™ Kit for Primary Mammalian Fibroblasts (VPI-1002). Foi realizada a padronização da transfecção com o tipo celular específico, através de testes dos programas (A-24, T-016, U-012, U-023, V-13). Com a melhor taxa de transfecção analisada, escolhemos o melhor programa para realizar as transfecções com o desenho gRNA e Cas9.

5.5.2 Transfecção com gRNA e Cas9

1x10⁶ células foram utilizadas para cada tubo com 100µL solução Basic Nucleofector[®] Kit (25 RCT)-VPI-002. Foram utilizados 7 tubos contendo as células com a solução Basic Nucleofector, a Cas9 e o gRNA, baseando-se nas concentrações mostrada na Tabela 1. Como controle positivo foi utilizado o plasmídeo pCAG com GFP e controle negativo PCAG com água. Todos os tubos foram colocados no equipamento AMAXA (Nucleofector[™] 2b) para ser realizado a transfecção nuclear. Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços com 2mL de meio de cultura DMEM (Gibco) e após 2 dias, estas foram analisadas por citometria de fluxo.

Tabela 1 – Concentração de gRNA e Cas9 (Addgene 48668)

gRNA	Cas9
500 ng	2 µg
1 µg	2 µg
2 µg	2 µg
2 µg	4 µg
2 µg	6 µg

Fonte: Oliveira, V. C., (2016).

5.5.3 Transfecção teste por Lipofectamina

Os fibroblastos coletados cultivados com 85% de confluência foram lavados em solução dPBS, em seguida foi adicionado 3mL de Tripsina por 5 minutos. Após, foram adicionadas 10mL de meio de cultura DMEM para a inativação da tripsina. As células foram contadas, e aliquotadas baseada no cálculo de 1.5x10⁵ para transfecções por Lipofectamina[®] 2000 (Thermofisher-11668027).

5.6 Citometria de fluxo

As células pós transfectadas com 2 dias em cultura, foram retiradas da estufa. Estas foram tripsinizadas, inativadas com Meio DMEM e posteriormente centrifugadas. O meio de cultura com a tripsina foi removido e o sedimento foi ressuspensionado em 200 μ L de PBS. Estas foram analisadas por citometria de fluxo para avaliar a expressão de GFP, no qual foi possível analisar se a taxa de transfecção foi eficiente, em comparação com os controles positivos e negativos.

5.7 Extração do DNA

Após avaliada a taxa de transfecção, 1 mL das células foram separadas para extração genômica. O DNA foi extraído utilizando o kit QiAmp DNA microkit Qiagen e Blood and Tissue (Qiagen). A concentração do total foi determinada através da utilização do espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA) e integridade determinada pela Agilent 2100 Bioanalyzer 6000 Pico LabChip kit (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA). O DNA extraído foi armazenado a -20°C até a análise.

5.8 PCR e teste T7

Para detecção de mutações, foi realizada a técnica de PCR seguida do teste T7. Para realização deste, o DNA extraído foi diluído na concentração final de 5ng/mL, seguido da técnica de PCR convencional com o mix de primers (Tabela 2), 5x buffer, DNA polimerase Phusion e 10 mM DNTPs, com 35 ciclos de 98°C por 2 minutos, 98°C por 15 segundos, 60°C por 20 segundos, 72°C por 25 segundos, 72°C por 7 minutos e 4°C infinito. Após o procedimento de PCR, as amostras foram diluídas em Tampão NEB2 e estas foram hibridizadas na temperatura de 95°C por 5 minutos, seguido de 139 ciclos. Em seguida, foi

realizado um mix de NEB2, Água, Amostra Hibridizada e T7 DNA ligase e este colocado a 37°C por 20 minutos. Para aplicação em gel de agarose 2.5% utilizamos 10µL reação com 10µL de sucrose/ proteína pK (20ng/µL). O gel foi analisado em Fotomicroscópio e a quantificação das bandas foi realizada através do software Image J.

Tabela 2 - Primers utilizados para PCR/ T7 teste, desenhados no Exon 1

Nome	Primer	Sequência (5'-3')
TFAM_b1a	Foward	5' GGTGCTCCAAGGTACGAGAA 3'
TFAM_b1b	Reverse	5' TAGCCGATTTCCCATAGTGC 3'
TFAM_b2a	Forward	5'CAAGGTTCGAGGTCGGAATC 3'
TFAM_b2b	Reverse	5' GGGCATGATAGTAAATCCGGT 3'

Fonte: Oliveira, V. C., (2016)

5.9 Clones

Com a confirmação de mutações por teste T7, as células pós transfectadas com mais de 70% de confluências foram diluídas na contagem de uma célula por poço em placas de 96 poços pela técnica de Sorting.

5.9.1 *Sorting de uma única célula*

Foi esperado o crescimento destas por um período de 20 dias. Em cada poço foi analisado individualmente o crescimento dos clones e trocado o meio de cultura de dois em dois dias.

5.9.2 *Separação dos clones e expansão*

Com o período de 20 dias em cultura, as células individuais de cada poço foram selecionadas. Os poços com confluência maior que 70% foram tripsinizados e replaqueados

em placas de 6 poços. Quando atingida a confluência de 80% parte destas células foi destinada a extração de DNA e a outra foi mantida em cultura para serem posteriormente congeladas.

5.9.3 Caracterização e validação dos clones

As células em placas de 6 poços com confluência foram separadas para extração de DNA. A concentração do total de DNA foi determinada através da utilização do espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Com a concentração ideal de DNA foi realizado o teste T7 para avaliar as mutações de clone individual. Seguindo o mesmo protocolo do item 5.8.

5.10 Avaliação de clivagem por sequenciamento Sanger

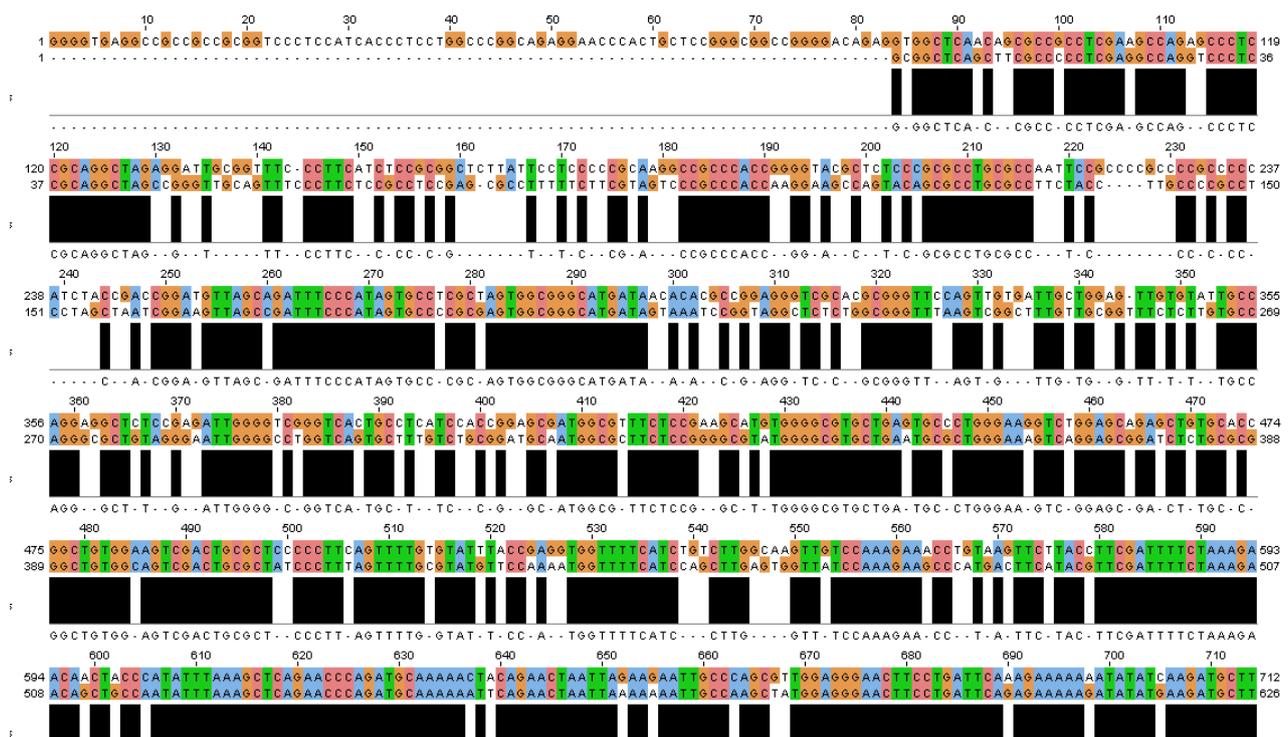
O produto do PCR dos clones foi enviado junto aos primers para sequenciamento Sanger, para avaliar se o gRNA e Cas9 clivaram o local alvo.

6 RESULTADOS

6.1 Análise da homologia das Sequências TFAM humana e bovina

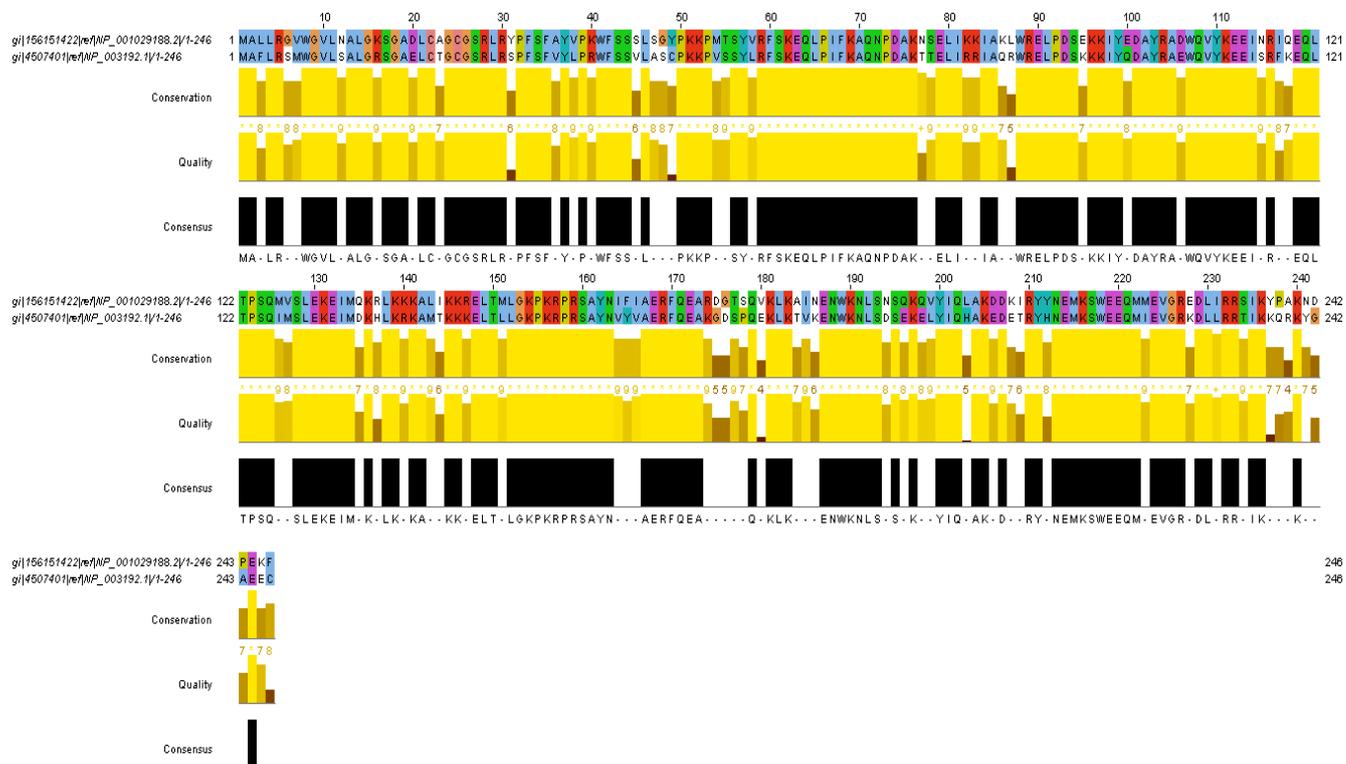
O TFAM humano possui uma similaridade de 70,73% da sequência de mRNA (Figura 5) e 79,29% da sequência de aminoácidos (Figura 6) com o TFAM bovino.

Figura 5 - Alinhamento das sequências (mRNA) do TFAM bovino em relação ao TFAM humano. Programa Clustal W2.



Fonte: Oliveira, V. C., (2016)

Figura 6 - Alinhamento das sequencias proteicas do TFAM bovino em relação ao TFAM humano, com similaridade de 79,29% entre as sequências. Programa Clustal W2.

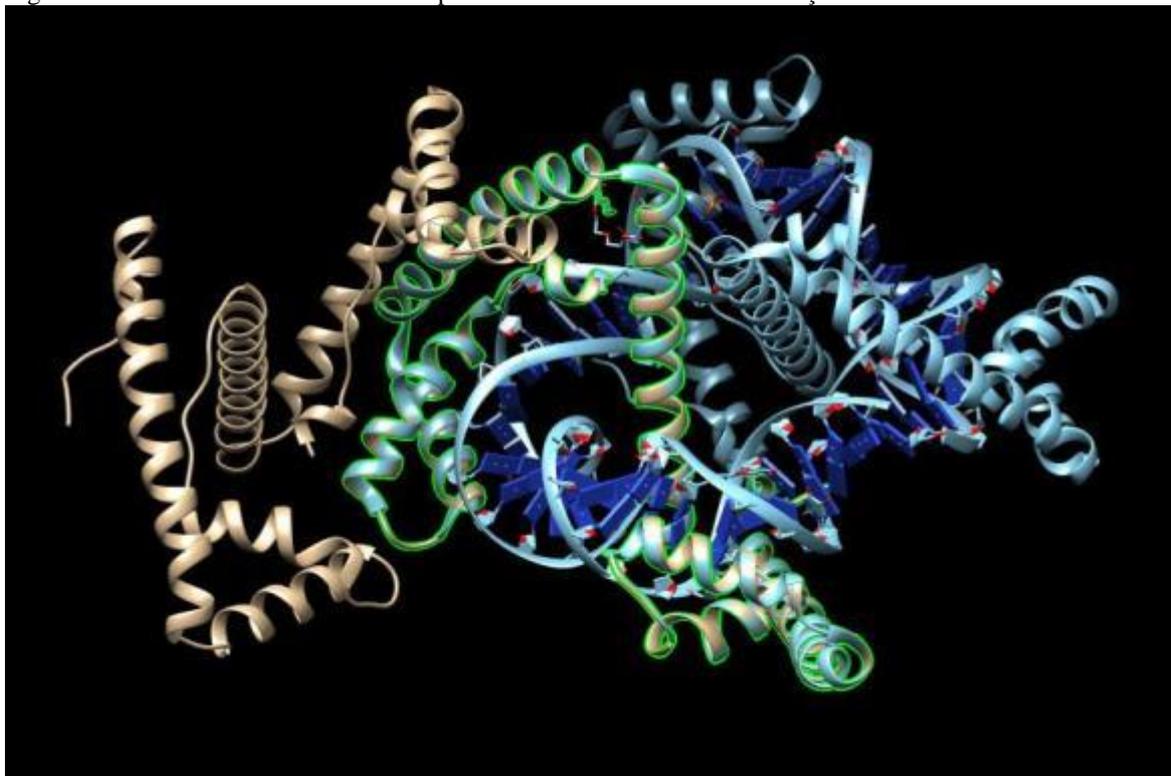


Fonte: Oliveira, V. C., (2016)

6.2 Modelo da estrutura tridimensional da proteína do TFAM bovino versus TFAM humano

Para melhor compreensão das regiões conservadas do gene e região de ligação com o DNA, utilizamos as sequências e estrutura da proteína do gene TFAM humano obtidas do banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) para criarmos um modelo tridimensional da estrutura proteica das duas espécies em questão, visto que a estrutura proteica do TFAM bovino não se encontra nos dados do GenBank. Utilizamos o programa Chimera 1.8 e notamos em que partes da estrutura houve sobreposição, resultando em regiões bem conservadas e regiões que se ligam ao promotor LSP no DNA (Figura 7)

Figura 7 - Modelo criado da estrutura proteica do TFAM bovino em relação ao TFAM humano



Fonte: Oliveira VC (2016) e Rubio-Cosials et al. (2011)

Legenda: Em azul claro podemos observar a estrutura do gene TFAM humano; Em azul escuro notamos a proteína complexada ao DNA "alvo"; Em cinza: TFAM bovino com regiões (cadeia) sobreposta no TFAM humano observada em verde.

6.3 Análise dos exons humanos e bovinos

Para montagem da estrutura proteica de TFAM bovino utilizamos como modelo a estrutura humana, seguindo como referência o artigo "[Human mitochondrial transcription factor a induces a U-turn structure in the light strand promoter](#)". Rubio-Cosials A, Sidow JF, Jimenez-Menendez N, Fernandez-Millan P, Montoya J, Jacobs HT, Coll M, Bernado P, Sola M. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 18 (11): 1281- 1289, 2011., através do banco de dados do GenBank. Com a utilização deste artigo como referência, realizamos a montagem da estrutura tridimensional bovina em relação à humana. Com esta foi possível analisar a similaridade entre as sequências (em azul escuro na sequência) e os locais em que as proteínas se ligam ao DNA. Os locais de ligação foram L58, T78, T81, Y57, T77, Q179, Y162, L182, P178, V166 e N163 (aminoácidos representados em roxo na sequência) (Figuras 8 e 9). Foi possível

observar que somente 6/11 aminoácidos são conservados entre as espécies, e que estes se encontram distribuídos nos exons 2, 3, 5 e 6.

Figura 8 - Sequência bovina (NM_001034016.2) com os exons separados por cores, regiões não conservadas (azul escuro) e regiões que os aminoácidos se ligam ao DNA (números em roxo)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
EXON 1	ATG	GCG	CTT	CTC	CGG	GGC	GTA	TGG	GGC	GTG	CTG	AAT	GCG	CTG	GGA	AAG	TCA	GGA	GCG
	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
	GAT	CTC	TGC	GCG	GGC	TGT	GGC	AGT	CGA	CTG	CGC	TAT	CCC	TTT	AGT	TTT	GCG	TAT	GTT
	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57
EXON 2	CCA	AAA	TGG	TTT	TCA	TCC	AGC	TTG	AGT	GGT	TAT	CCA	AAG	AAG	CCC	ATG	ACT	TCA	TAC
	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
	GTT	CGA	TTT	TCT	AAA	GAA	CAG	CTG	CCA	ATA	TTT	AAA	GCT	CAG	AAC	CCA	GAT	GCA	AAA
	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
EXON 3	AAT	TCA	GAA	CTA	ATT	AAA	AAA	ATT	GCC	AAG	CTA	TGG	AGG	GAA	CTT	CCT	GAT	TCA	GAG
	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114
	AAA	AAG	ATA	TAT	GAA	GAT	GCT	TAC	AGG	GCA	GAC	TGG	CAG	GTA	TAC	AAG	GAA	GAG	ATA
	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133
EXON 4	AAC	AGA	ATT	CAA	GAA	CAA	CTA	ACT	CCA	AGT	CAA	ATG	GTA	TCT	TTG	GAA	AAA	GAA	ATC
	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152
	ATG	CAG	AAA	CGT	TTA	AAA	AAG	AAA	GCG	TTA	ATA	AAA	AAG	AGA	GAG	TTA	ACA	ATG	CTT
	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171
EXON 5	GGA	AAA	CCG	AAA	AGA	CCT	CGC	TCA	GCT	TAT	AAC	ATT	TTT	ATA	GCT	GAA	CGT	TTT	CAG
	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190
	GAA	GCT	AGG	GAT	GGC	ACA	TCA	CAG	GTA	AAG	CTG	AAA	GCT	ATA	AAT	GAA	AAC	TGG	AAA
	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209
EXON 6	AAT	CTC	TCT	AAT	TCT	CAA	AAG	CAA	GTA	TAT	ATT	CAG	CTT	GCT	AAA	GAT	GAT	AAA	ATT
	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228
Exon 7	CGT	TAT	TAT	AAC	GAA	ATG	AAA	TCT	TGG	GAG	GAA	CAA	ATG	ATG	GAA	GTT	GGA	CGA	GAA
	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247
	GAT	CTT	ATA	CGT	CGC	TCA	ATT	AAA	TAC	CCA	GCA	AAA	AAT	GAC	CCT	GAG	AAG	TTT	TAA

Fonte: Oliveira, V. C., (2016)

Notas: Observamos que somente 6/11 aminoácidos são conservados entre as espécies, que são os números: 57, 81,162,163,179 e 182; já os não conservados são: 58, 77,78,166 e 178.

Figura 9 - Sequência Humana (NM_003201.2) com os exons separados por cores, regiões não conservadas (azul escuro) e regiões que a proteína se liga ao DNA (números em roxo).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
EXON 1	ATG	GCG	TTT	CTC	CGA	AGC	ATG	TGG	GGC	GTG	CTG	AGT	GCC	CTG	GGA	AGG	TCT
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
	GGA	GCA	GAG	CTG	TGC	ACC	GGC	TGT	GGA	AGT	CGA	CTG	CGC	TCC	CCC	TTC	AGT
	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
EXON 2	TTT	GTG	TAT	TTA	CCG	AGG	TGG	TTT	TCA	TCT	GTC	TTG	GCA	AGT	TGT	CCA	AAG
	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68
	AAA	CCT	GTA	AGT	TCT	TAC	CTT	CGA	TTT	TCT	AAA	GAA	CAA	CTA	CCC	ATA	TTT
	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85
	AAA	GCT	CAG	AAC	CCA	GAT	GCA	AAA	ACT	ACA	GAA	CTA	ATT	AGA	AGA	ATT	GCC
	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102
EXON 3	CAG	CGT	TGG	AGG	GAA	CTT	CCT	GAT	TCA	AAG	AAA	AAA	ATA	TAT	CAA	GAT	GCT
	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
EXON 4	TAT	AGG	GCG	GAG	TGG	CAG	GTA	TAT	AAA	GAA	GAG	ATA	AGC	AGA	TTT	AAA	GAA
	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136
	CAG	CTA	ACT	CCA	AGT	CAG	ATT	ATG	TCT	TTG	GAA	AAA	GAA	ATC	ATG	GAC	AAA
	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153
	CAI	TTA	AAA	AGG	AAA	GCT	ATG	ACA	AAA	AAA	AAA	GAG	TTA	AÇA	CTG	CTT	GGA
	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
EXON 5	AAA	CCA	AAA	AGA	CCT	CGT	TCA	GCT	TAT	AAC	GTT	TAT	GTA	GCT	GAA	AGA	TTC
	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187
	CAA	GAA	GCT	AAG	GGT	GAT	TCA	CCG	CAG	GAA	AAG	CTG	AAG	ACT	GTA	AAG	GAA
	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204
EXON 6	AAC	TGG	AAA	AAT	CTG	TCT	GAC	TCT	GAA	AAG	GAA	TTA	TAT	ATT	CAG	CAT	GCT
	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217				
EXON 7	AAA	GAG	GAC	GAA	ACT	CGT	TAT	CAT	AAT	GAA	ATG	AAG	TC				

Fonte: Oliveira, V. C., (2016)

6.4 Construção gRNA, Oligos e Clonagem Gênica

Foi realizado o desenho CRISPR. Foram selecionados 4 diferentes gRNA com o menor número de off-target (locais fora do alvo). A partir destes foram sintetizados os oligos para posterior hibridização e procedimento de clonagem gênica. Os oligos sintetizados foram:

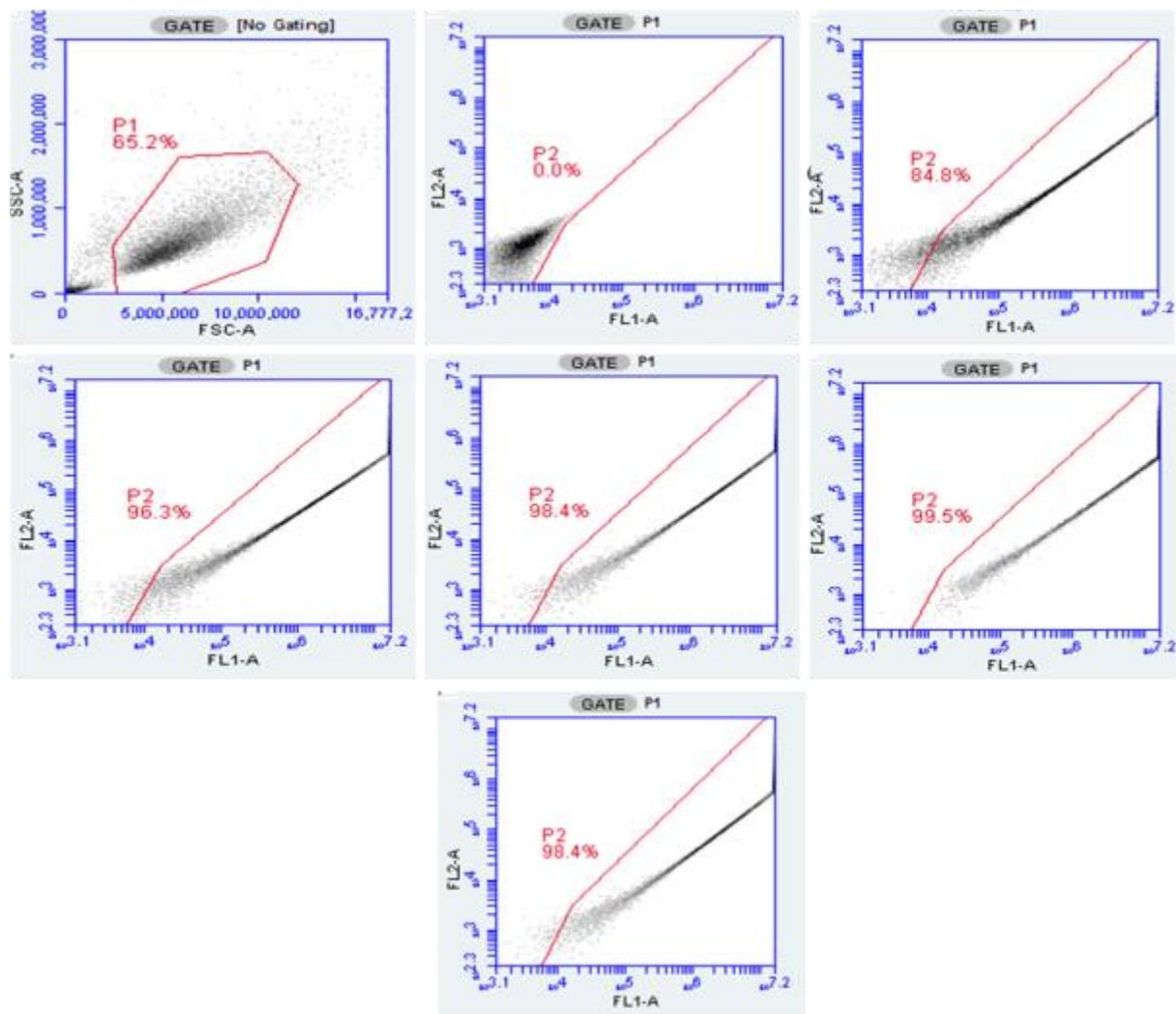
- 1) acaccGGCGCTTCTCCGGCGTATg;
- 2)acaccgCAGGAGCGGATCTCTGCGCg;
- 3)acaccgCAGCACGCCCCATACGCCg.
- 4) acaccgGGGGCGTGCTGAATGCGCTg;

6.5 Cultivo celular e escolha do programa de transfecção

Os fibroblastos bovinos cultivados quando obtiveram 85% de confluência, foram separados para transfecção. Para esta foi utilizado o equipamento AMAXA Nucleofector 2B que é um método baseado na combinação de soluções e parâmetros elétricos que transfere diretamente o DNA para o núcleo das células.

Na padrozinção dos programas do equipamento, todas as transfecções foram realizadas utilizando o plasmídeo pCAG e GFP como controle positivo e como controle negativo o plasmídeo pCAG com água. Após 2 dias, as células pós transfectadas foram analisadas por citometria de fluxo utilizando o equipamento BD Accure C6. Observamos que todos os programas tiveram uma alta taxa de transfecção (Figura 10). Escolhemos o programa U-012 devido a alta expressão de 98,4% e por essas células estarem mais confluentes em cultura.

Figura 10 - Citometria de fluxo para análise dos programas transfecção por Amxa Nucleofector



Fonte: Oliveira, V. C., (2016)

Legenda: Em A viabilidade celular 65,2%, B controle pCAG com água, C programa A-24 com 84,8%, D programa T-016 com 96,3%, E programa U-012 com 98,4%, F programa U-023 com 99,5% e G programa V-013 com 98,4%.

6.6 Transfecções do gRNA e Cas 9 por Amaxa Nucleofector

Com a escolha do programa, a fim de gerar células knock-out, realizamos 3 transfecções com diferentes concentrações de gRNA (Tabela 3), assim como com diferentes concentrações de Cas9. Após 2 dias as células pós transfectadas foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo BD Accuri C6 ou através de fotografia de fluorescência celular.

Tabela 3 - Transfecções com diferentes concentrações de Cas9

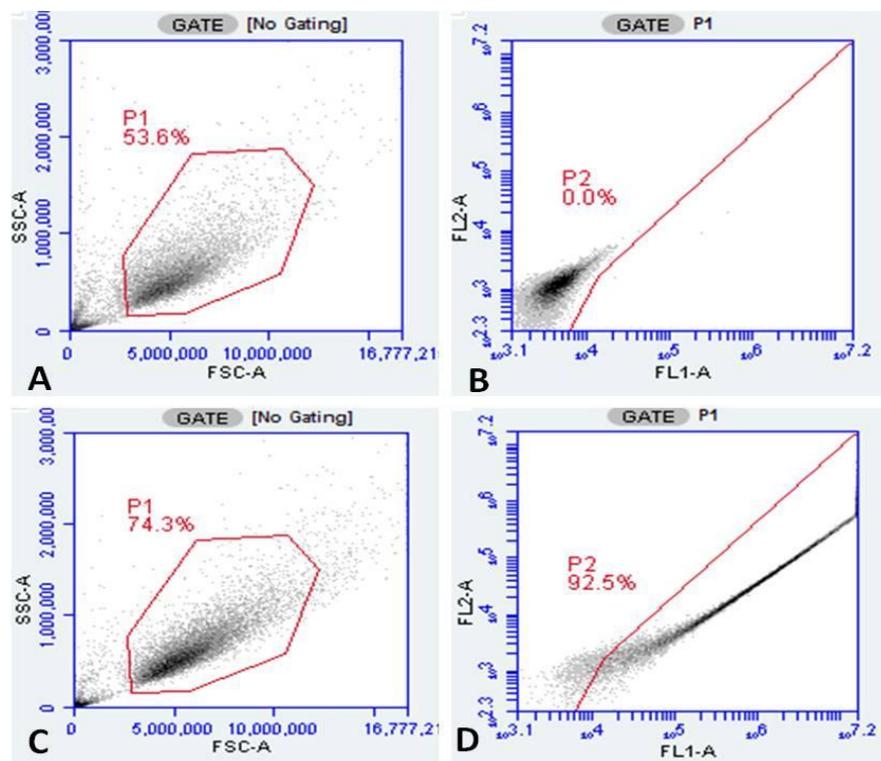
Transfecções	Concentração gRNA	Concentração Cas9
1	2 µg	2 µg
2	2 µg	2 µg
3	2 µg	2 µg
4	2 µg	4 µg

Fonte: Oliveira, V. C., (2016).

6.6.1 Transfecção 1

Foi realizada citometria de fluxo e observamos uma porcentagem eficiente de 92,5% de GFP positivo e 74,3% de viabilidade (Figura 11).

Figura 11 - Citometria de fluxo para análise da transfecção por Amaxa Nucleofector



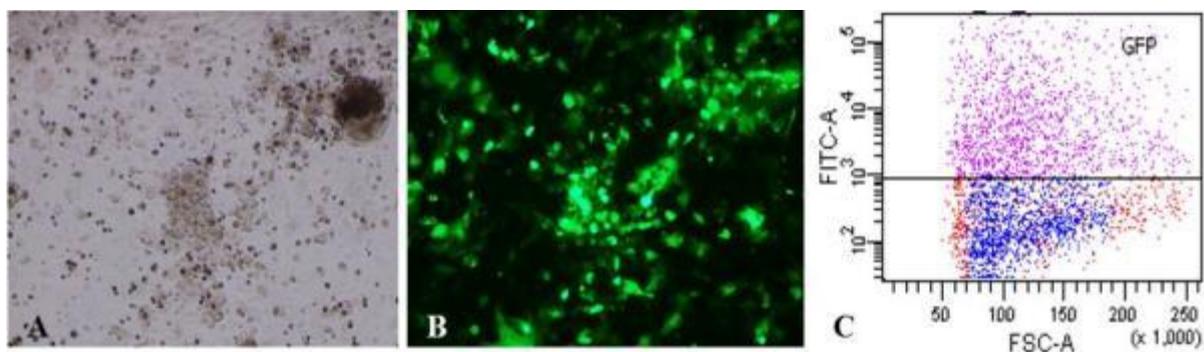
Fonte: Oliveira, V. C., (2016)

Legenda: Em A, controle mostrando viabilidade da amostra, B controle GFP, C viabilidade da amostra e D expressão positiva de 92,5% GFP.

6.6.2 Transfecção 2

Com análise das fotografias de fluorescência observamos uma porcentagem de 40,8% de GFP positivo (Figura 12).

Figura 12 - Taxa de transfecção por GFP positivo



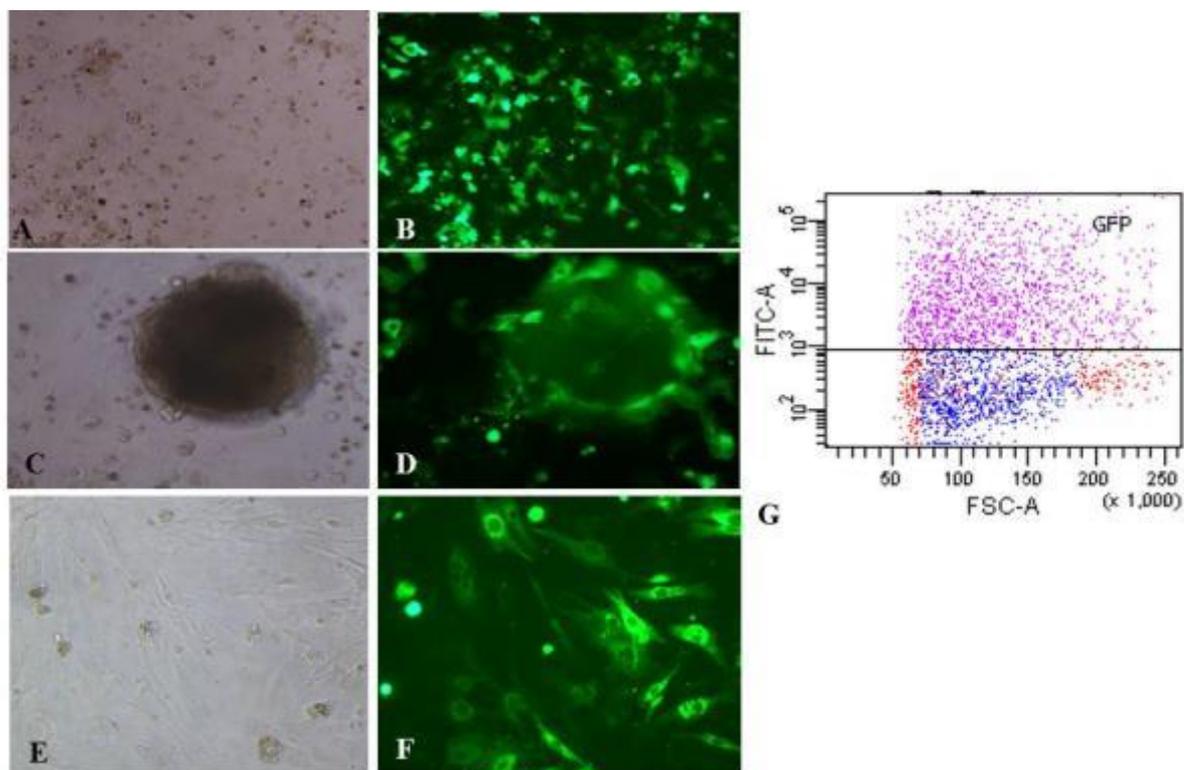
Fonte: Oliveira, V. C., (2016)

Legenda: Em A células controle; B células GFP positiva; e C marcação positiva de 40,8% de GFP.

6.6.3 Transfecção 3

Com análise das fotografias de fluorescência observamos uma porcentagem de 51,3% de GFP positivo (Figura 13).

Figura 13 - Taxa de transfecção por GFP positivo



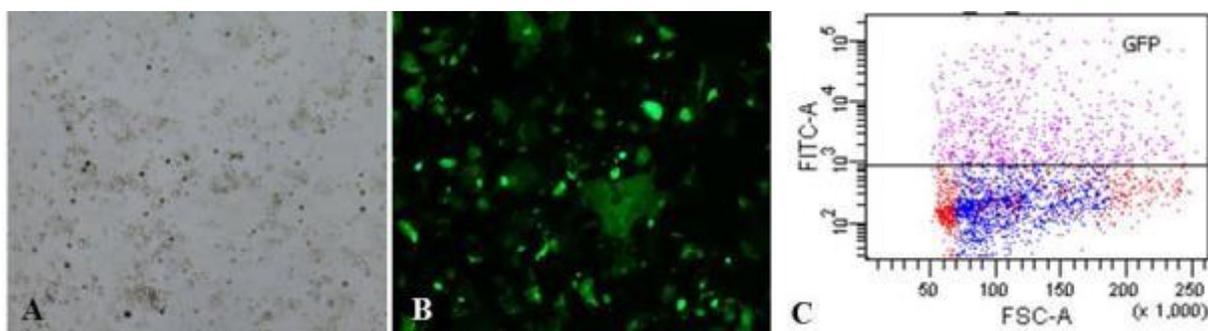
Fonte: Oliveira, V. C., (2016).

Legenda: A-C-E células controle; B-D-F células GFP positivas, G marcação de 51,3% de GFP.

6.6.4 Transfecção 4

Com análise das fotografias de fluorescência observamos uma porcentagem de 25% de GFP positivo (Figura 14).

Figura 14 - Taxa de transfecção por GFP positivo



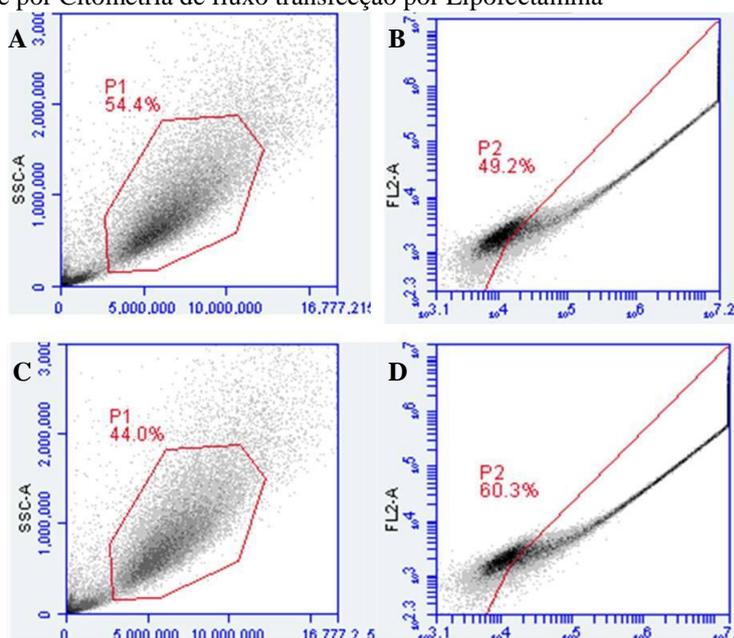
Fonte: Oliveira, V. C., (2016).

Legenda: A células controle; B células GFP positivas; C marcação positiva de 25% de GFP.

6.6.5 Transfecção por Lipofectamina

Após 2 dias as células pós transfectadas foram analisadas por citometria de fluxo utilizando o equipamento BD Accuri C6 e notamos uma taxa de transfecção de 49.2% e 60.3% (Figura 15), por mais que a taxa de transfecção não tenha sido baixa, optamos pela transfecção por Amaxa Nucleofector, pois as células se mantiveram mais viáveis em cultura.

Figura 15 - Análise por Citometria de fluxo transfecção por Lipofectamina



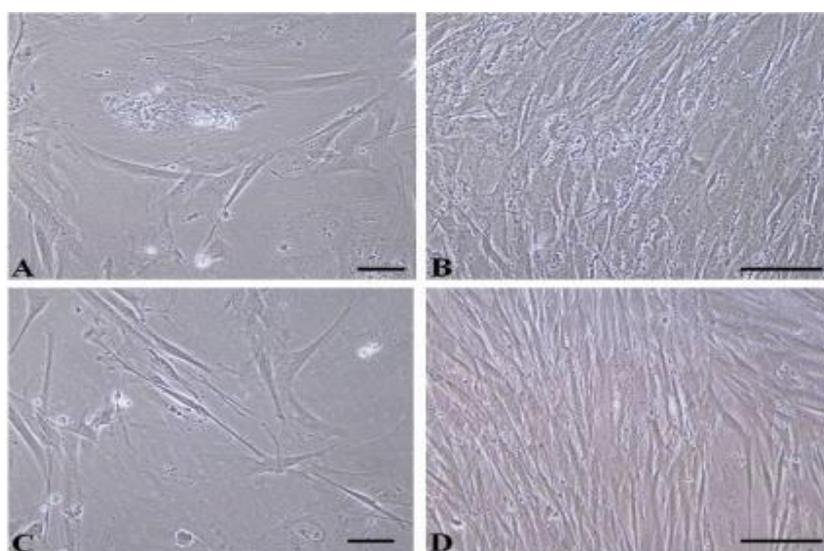
Fonte: Oliveira, V. C., (2016)

Legenda: Em A, controle viabilidade da amostra, B expressão GFP positivo, C viabilidade da amostra e D expressão positiva de GFP

6.7 Congelamento celular

Observamos que após o descongelamento as células levaram 7 dias para atingir a confluência. Observamos que mantiveram a mesma morfologia das células transfectadas sem o processo de congelamento celular (Figura 16).

Figura 16 - Células transfectadas pós congelamento



Fonte: Oliveira, V. C., (2016).

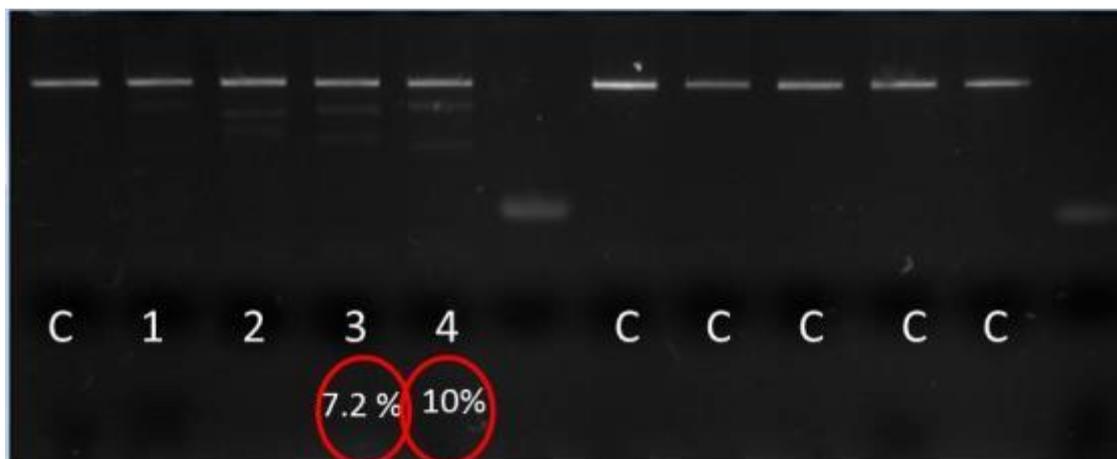
Legenda: A e C: 10 dias após transfecção. 20X. B e D: 15 dias após transfecção.40X. separar a legenda para as demais figuras e tabelas.

6.8 Teste T7

Células pós transfectadas foram separadas e o DNA foi extraído. Foi realizado a técnica de PCR seguida por teste T7. Observamos que dos 4 desenhos testados os que tiveram uma melhor taxa de mutação foram os gRNA de número 3 e 4 (Figura 17). Para estes utilizamos uma concentração de 2ug de gRNA e 2ug Cas9. Através destes dados selecionamos o número 4 que obteve melhor taxa de mutação. Com esses resultados testamos diferentes concentrações de Cas9 na transfecção avaliando se aumentaria ainda mais a taxa de

mutação. Observamos que com 6 μ g de Cas9 e 2 μ g de concentração de gRNA (número 4), taxa de mutação foi melhor aumentando de 10% para 40% como mostrado na Figura 18.

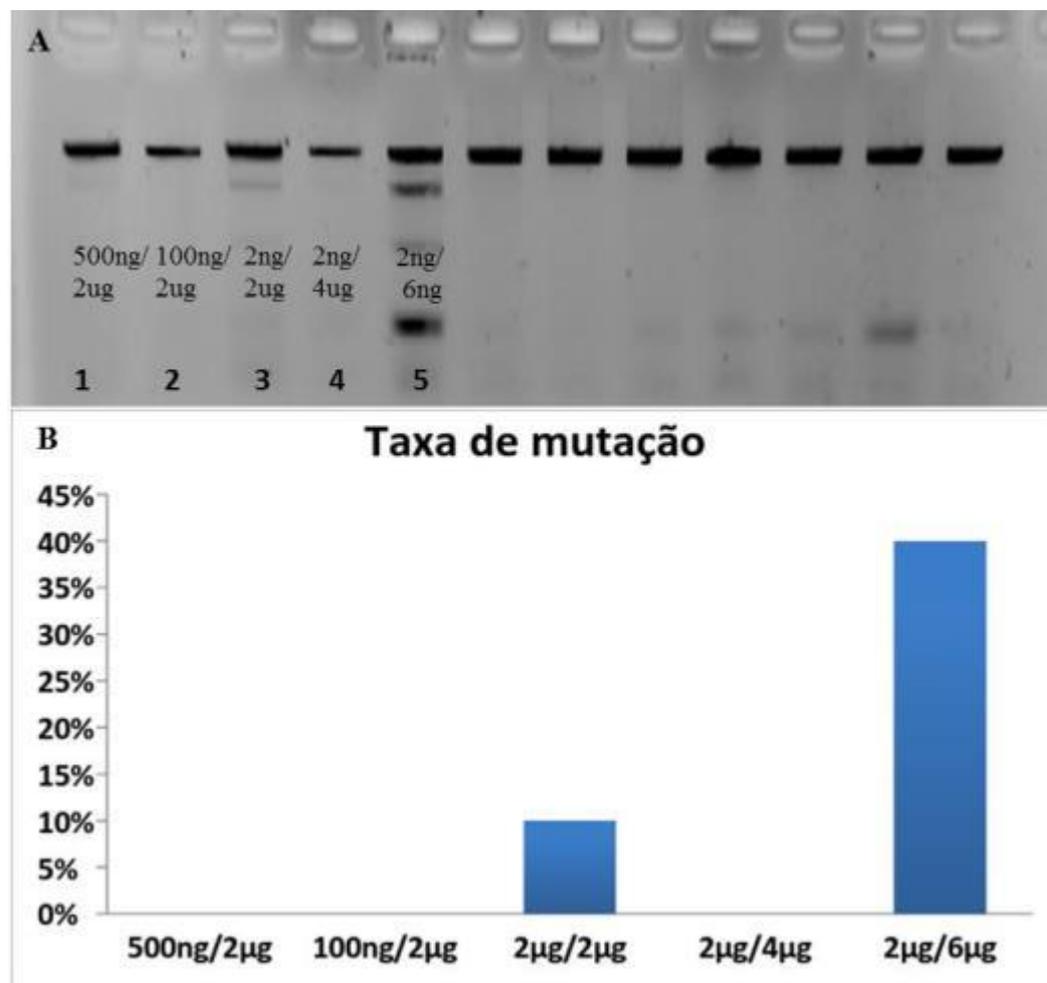
Figura 17 - Gel de agarose 2.5% para o teste T7



Fonte: Oliveira, V. C., (2016)

Legenda: Observar gRNA 3 com 7,2% de taxa de mutação e gRNA 4, com 10% de taxa de mutação.

Figura 18 - Taxa de mutação por teste T7



Fonte: Oliveira, V. C., (2016).

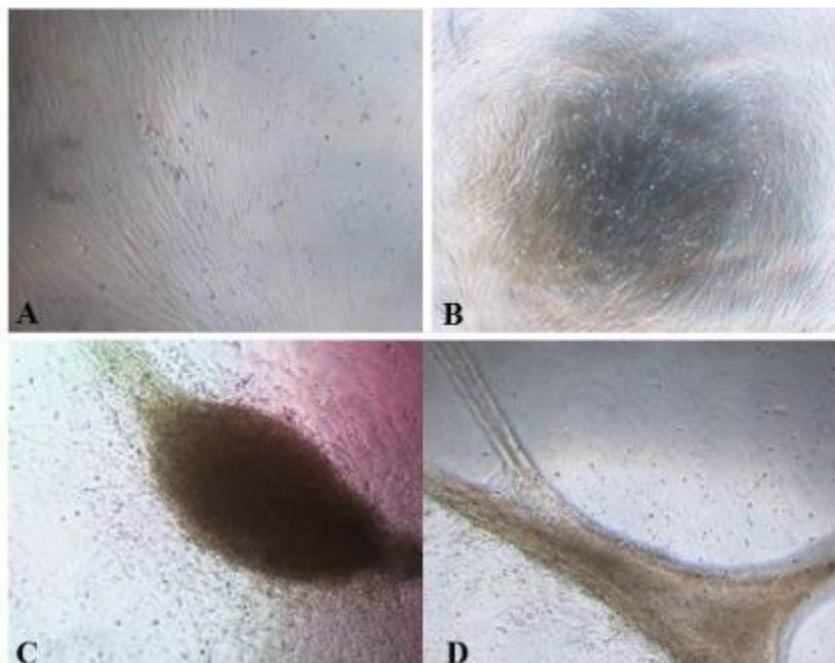
Legenda: Em A, gel de agarose 2,5% para T7 teste, gRNA desenho 4 em diferentes concentrações (de 1 a 5). B gráfico de barra mostrando a taxa de mutação encontrada em cada concentração.

6.9 Crescimento dos clones

Dentre as 4 transfecções realizadas, optamos por fazer a geração dos clones pela transfecção 1 e 3. A transfecção 1 e 3 foram realizada com o gRNA de número 4 devido a maior taxa de mutação conforme mostrado na Figura 18. Com a seleção dos gRNAs mais eficientes, baseada na taxa de mutação apresentado pelo teste T7, as células pós transfectadas com 80% de confluência foram repicadas e diluídas em placas de 96 poços. As células foram acompanhadas por um período de 20 dias, estas foram analisadas e os poços que continham

colônias individuais foram selecionados e repicadas posteriormente em placas de 6 poços. Quando plaqueados em placas de 6 poços, as células cresceram bem, atingiram confluência em 4 dias em cultura (Figura 19).

Figura 19 - Cultivo dos clones selecionados



Fonte: Oliveira, V. C., (2016).

Legenda Clones com 7 dias em placas de 6 poços, notar aderência ao plástico e confluência.

6.10 Extração do DNA

Para extração do DNA foram testados 8 diferentes protocolos e kits de extração de DNA conforme a Tabela 4. Notamos que o melhor resultado foi com o Qiam DNA microkit, pois obtivemos uma concentração maior em relação aos outros protocolos e pureza dentro dos parâmetros de 1.8 a 2.0. Todas as amostras foram padronizadas utilizando esse kit, quando as células que obtiveram alta confluência a extração de DNA foi realizada com kit Blood and Tissue da Qiagen.

Tabela 4 - Protocolos de extração, concentração e pureza do DNA extraído

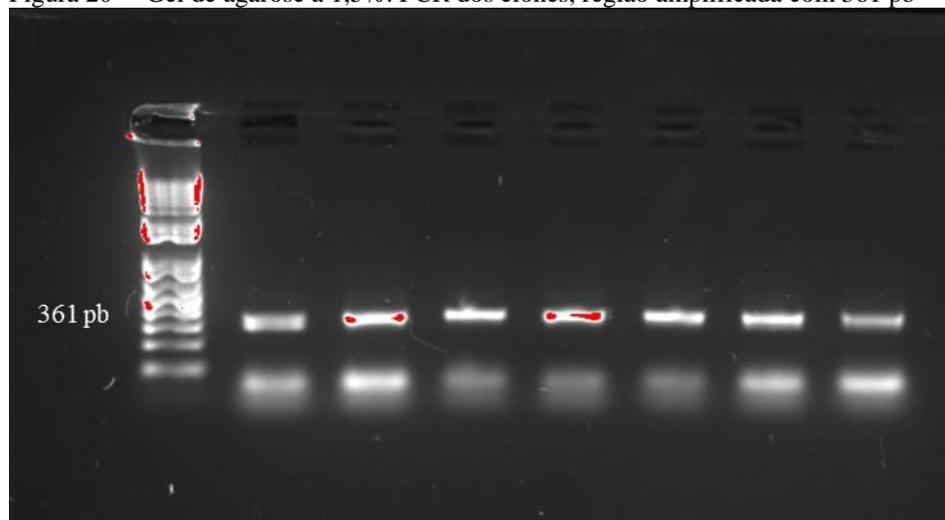
Protocolos	Concentração	Pureza razão 260/230
<i>Kit Omega Biotec</i>	~50 ng/ μ L	1.7
<i>Mini kit Qiagen</i>	~20 ng/ μ L	1.8
<i>Solução de Lise- Bauer et al., 2015</i>	~100ng/ μ L	1.3
<i>Kit GE Healthcare</i>	~50 ng/ μ L	1.7
<i>Kit Promega</i>	~20 ng/ μ L	1.7
<i>Blood and Tissue Qiagen</i>	~50 ng/ μ L	1.8
<i>QiAmp DNA microkit</i>	~200 ng/ μ L	2.0

Fonte: Oliveira, V. C., (2016)

6.11 Análise de PCR convencional

Foi realizado o PCR para amplificação da região alvo, em todos os clones obtivemos uma banda no local de amplificação (Figura 20).

Figura 20 - Gel de agarose a 1,5%. PCR dos clones, região amplificada com 361 pb



Fonte: Oliveira, V. C., (2016).

6.12 Teste T7 dos clones da Transfecção 1

Dentre 19 clones crescidos, 6 clones foram analisados e foi observado que clone de número 6 havia mutação pelo teste T7 (Figura 21).

Figura 21 - Gel de agarose com 2,5% evidenciando por teste T7 os clones de 1 a 6



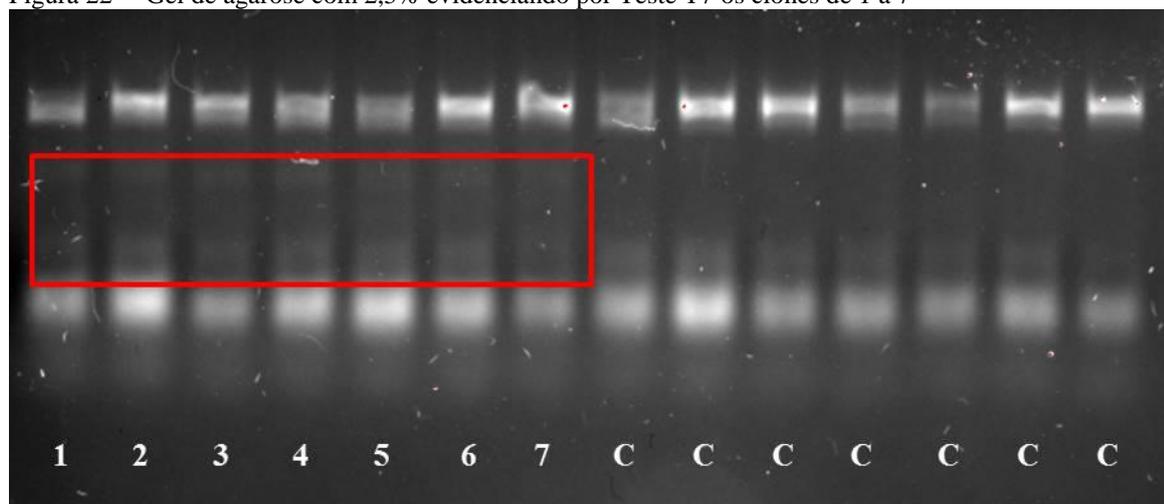
Fonte: Oliveira, V. C., (2016).

Legenda: Observar número 6 mutação evidente.

6.13 Teste T7 transfecção 3

Na transfecção 3 obtivemos 40 clones, destes 7 foram avaliados e obtiveram mutação evidente (Figura 22).

Figura 22 - Gel de agarose com 2,5% evidenciando por Teste T7 os clones de 1 a 7



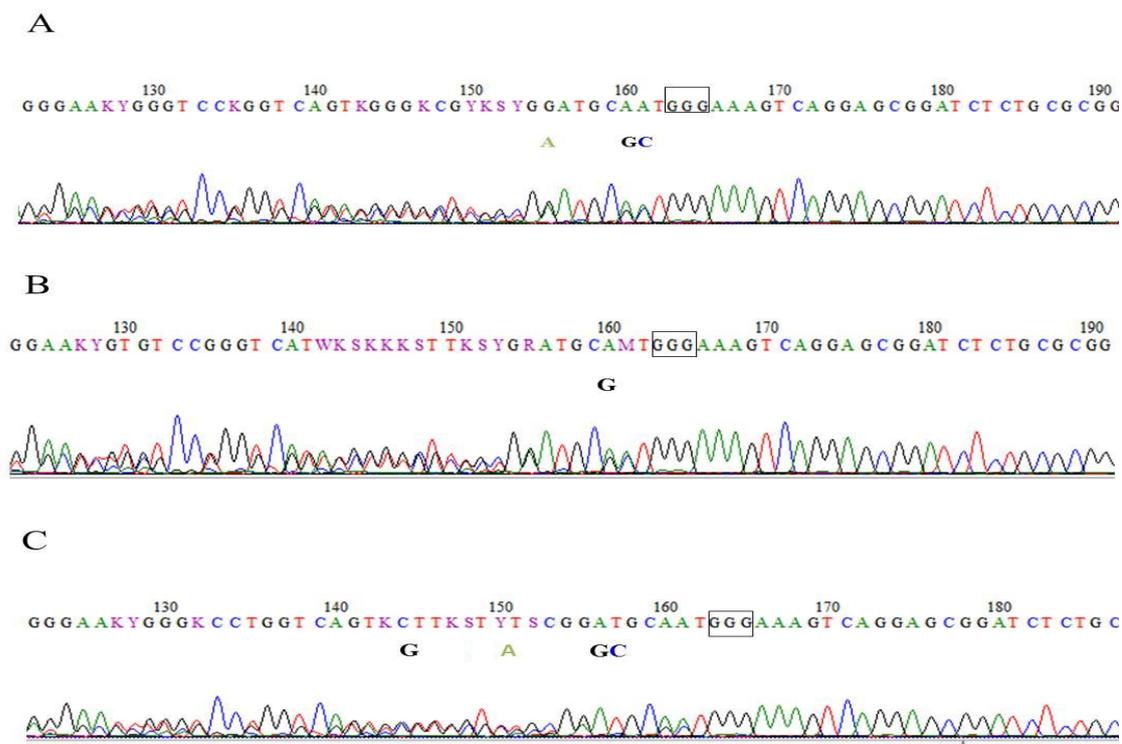
Fonte: Oliveira, V. C., (2016)

Legenda: Observar mutações nos números de 1 a 7, notar as 2 bandas no centro do gel.

6.14 Análise de sequenciamento

Através do sequenciamento conseguimos obter certeza das mutações, os clones da transfecção 1 e 3 obtiveram o mesmo perfil. Perto da região alvo, notamos a presença de 2 picos por obter mutações em heterozigose. O mecanismo CRISPR cliva 3 pares de bases anterior a região PAM, em todos os nossos clones notamos uma deleção nesta região (Figura 23).

Figura 23 - Análise de sequenciamento dos clones



Fonte: Oliveira, V. C., (2016).

Legenda: Notar em A, B e C o quadrado (nucleotídeos 163-165) mostrando a região PAM da sequência. O local de clivagem são os 3 pb anterior a PAM (160-162). Em A notar a inserção de dois AA, no local deveria ser GC, no nucleotídeo 155 também ocorreu uma inserção de A, no local de G. Em B, notar no 160 a inserção de A no local de G; Em C inserção de AT nos nucleotídeos 156 e 157, no local deveria ser GC. Inserção de T no local de A no nucleotídeo 151, e a inserção de C no local de G no nucleotídeo 144.

7 DISCUSSÃO

O TFAM é um gene nuclear que quando transcrito tem ação direta em sequências específicas do mtDNA em especial na região hipervariável conhecida como D-Loop. Esta região possui 3 regiões hipervariáveis e portanto uma das candidatas a gerar de maneira mais acelerada o isolamento genético reprodutivo (EXCOFFIER; YANG, 1999; NICHOLLS; MINCZUK, 2014). De maneira similar ao que ocorre no D-loop do DNA mitocondrial, o gene TFAM é muito variável, pois encontramos no modelo bovino em comparação com o modelo humano 70% de similaridade na sequência nucleotídica e 79% de similaridade reduzida na sequência de aminoácidos da proteína. Além desta variabilidade, quando comparada às espécies bovinas e humanas, em relação aos aminoácidos que interagem com o DNA, foi possível observar que somente 6/11 aminoácidos são conservados entre as espécies. Sendo assim, dada à interação do D-loop e TFAM e da variabilidade interespecífica em ambas as sequências, nos propomos à hipótese de que este gene de alguma maneira co-evoluiu com as variações da região hipervariável do mtDNA e é um dos candidatos a especificidade da replicação do mtDNA.

Além dessa variabilidade encontrada, escolhemos o modelo bovino devido as suas vantagens em relação a outros modelos, pois são passíveis de produção de clones. São animais com o período de gestação mais similares aos dos humanos, tornando este modelo mais adequado à terapia gênica quando comparado aos modelos roedores de laboratório (MITTENDORF et al., 1990; WOODING; BURTON, 2008; ASSIS NETO et al., 2010). Também, já foi demonstrado maior similaridade filogenética entre bovinos e humanos como mostrado através do sequenciamento do genoma bovino segundo Elsik et al. (2009).

Diversos avanços tecnológicos foram realizados na última década na engenharia do genoma bovino. A primeira técnica utilizada até hoje foi a técnica de clonagem pela transferência nuclear de células somáticas (SNCT). Técnica que podemos realizar futuramente, utilizando a linhagem celular produzida neste estudo como doadora de núcleo, e desta maneira, possibilitar a produção de animais clones contendo o TFAM bovino deletado e mais futuramente a inserção do TFAM humano por knock-in.

Existem diversas técnicas para conduzir a edição gênica em células, as modificações genéticas podem ser realizadas por recombinação homóloga e não homóloga. O locus bovino,

por exemplo, pode ser modificado em células somáticas gerando um knock-out ou knock-in de um gene específico. Com base nisto, a engenharia genética é definida como a inserção de um DNA específico no local da sequência do DNA genômico ou a conversão de uma sequência endógena de DNA para outra, com a troca de pares de bases.

Quando se tem uma deleção, o resultado será a perda de função da sequência alvo de DNA, gerando o que chamamos de knock-out. Já quando se tem uma inserção, será gerado um knock-in, ou seja, uma modificação genética. Com ambas as técnicas é possível a geração de animais modificados geneticamente (CHOI et al., 2015).

A edição gênica em bovinos tem sido considerada uma ferramenta importante para gerar modelos de gados knockout, assim como embriões transgênicos. Essas modificações genéticas são de extrema importância para a ciência agrícola básica e aplicações biomédicas (CHOI et al., 2015).

Tecnologias de edição vêm sendo utilizadas em diversas espécies. Um dos avanços mais inovadores na engenharia genética nos últimos anos é a utilização de nucleases. Técnicas como Zinc Fingers e TALENS vieram para melhorar consideravelmente a eficiência e versatilidade na engenharia de genomas. As principais características são o desenho de nucleases para gerar a quebra na dupla fita de DNA, eficiência, e reparo por recombinação homóloga e não homóloga (WANG, 2015).

Técnicas de edição como Zinc Fingers (ZFN) e TALENS já foram utilizadas em modelos bovinos a fim de gerar knock-out. Nestes estudos, Yu et al. (2011) utilizaram a técnica de Zinc Finger para gerar o knock-out no gene Beta-lactoglobulina (BLG) em fibroblastos bovinos e observaram deleções e inserções de 20 pares de bases, gerando o knock-out deste gene.

Kambadur et al. (1997) e McPherron e Lee (1997) analisaram mutações no gene da Miostatina (MSTN) nas raças de gado Piemontês que causam o aumento muscular. Realizaram o desenho de uma ZFN para modificar o gene MSTN em gado chinês. Notaram que bovinos clonados a partir de fibroblastos do bovino MSTN chinês apresentaram aumento do crescimento muscular.

Liu et al. (2014) utilizaram a técnica ZFN para realizar o knock-in do gene Lisozima humana no gene Caseína bovino. O objetivo foi aumentar a expressão de lisozima humana na glândula mamária bovina. E os resultados foram positivos onde o gene da lisozima humana foi integrado e as concentrações de lisozima aumentaram.

Carlson et al. (2012) utilizou a ferramenta TALENS para induzir o knock-out em zigotos bovinos. Aplicaram injeções citoplasmáticas de TALENS mRNAs em zigotos bovinos induzindo o knock-out em 75% dos embriões analisados.

Além das técnicas de edição gênica por Zinc Finger e TALENS, atualmente surgiu à ferramenta de edição gênica CRISPR-Cas que está se difundida em praticamente todos os campos das ciências da vida. A tecnologia de clivagem CRISPR-Cas9 conta com o Sistema *Streptococcus pyogenes* que provou ser extraordinariamente simples e eficiente, necessitando apenas de um único gRNA e co-expressão com Cas9 (HAEUSSLER; CONCORDET, 2016).

Em bovinos Heo et al. (2014), mostraram a viabilidade da direção do gene *Nanog* em locus bovino mediada por CRISPR Cas9. Este mecanismo foi altamente eficiente em embriões bovinos e em células tronco pluripotentes. Em nosso estudo, utilizamos a tecnologia CRISPR Cas9 a fim de editar o gene *TFAM*. Realizamos o desenho da CRISPR, do gRNA utilizando o site crispr.dbcls.jp seguindo o protocolo de Auer et al. (2014) em peixes zebra. Para transfecção em fibroblastos bovinos utilizamos o equipamento AMAXA Nucleofector 2B por ser um método baseado na combinação de soluções e parâmetros elétricos que transfere diretamente o DNA para o núcleo das células. Wang (2015) relata que a eletroporação realiza melhor direcionamento dos genes em fibroblastos bovinos, assim como em células fibroblastóides de outros mamíferos.

Esta técnica vem sendo utilizada por diversos autores no qual relatam que a eletroporação é revolucionária em estudos com expressão de genes em muitas células primárias (HAMM et al., 2002; LENZ et al., 2003; NAMBIAR et al., 2003).

Realizamos primeiramente a transfecção para a padronização dos programas. E escolhemos o programa U-012 no qual obtivemos uma taxa de transfecção de 98,4%.

Também realizamos a transfecção por Lipofectamina por ser um reagente que realiza a repulsão eletrostática da membrana celular. Nesta transfecção as taxas foram de 49.2% na densidade celular de 1×10^5 e 60% na densidade celular de 1.5×10^5 .

Nakayama et al. (2007) também realizaram transfecções com GFP através do equipamento Amaxa para avaliar a taxa em fibroblastos embrionários suínos, dentre os testes realizados o programa U-023 foi o escolhido pela alta taxa de transfecção encontrada de 79%.

Semelhantes aos achados por Nakayama et al. (2007), observamos que a eficiência do Amaxa Nucleofector foi muito melhor do que por Lipofectamina, Assim como quando

avaliada a taxa de transfecção a fim de gerar o knock out por CRISPR Cas9 em fibroblastos bovinos, observamos uma transfecção eficiente pelo equipamento Amaxa de 92,5%, na transfecção 1 e 51,3% na transfecção 3, com uma alta viabilidade celular de 74,3%. Com esses resultados obtidos optamos assim por utilizar essa técnica devido a sua alta efetividade e por preservar a viabilidade celular.

Diversos tipos celulares vem sendo utilizados para indução de indels por CRISPR Cas 9. Semelhante ao nosso estudo em que utilizamos fibroblastos bovinos, Choi et al. (2016) utilizaram o mecanismo CRISPR Cas9 para interromper (knock-out) o gene eGFP em fibroblastos bovinos. Após transfecção por eletroporação mantiveram as células em cultura e observaram que após 10 dias, mais de 40% perderam a expressão de eGFP. E quando avaliada a região alvo das células transfectadas notou-se pequenas mutações, deleções de 6-203 pares de bases, similar aos nossos achados, no qual obtivemos uma deleção (CHOI et al. 2016).

Lee et al. (2013) também obtiveram resultados eficientes com a utilização de fibroblastos bovinos para edição do gene da eritropoietina humana, pela tecnologia TALEN.

Han et al. (2014) também utilizaram fibroblastos de ovinos para knock-out do gene da Miostatina, constatando por PCR uma eficiência de clivagem de 19,3%.

Assim como nos estudos realizados por Kim et al. (2014), em que foi gerado o knock-out do gene CCR5 em fibroblastos e em células tronco embrionárias humanas, através da transfecção pelo protocolo AMAXA, observando uma taxa de mutação de 19% em fibroblastos e 23% em células H9 células tronco embrionárias humanas. Em nossos achados, a taxa de mutação inicial encontrada nos fibroblastos bovinos foi de 7,2% e 10% de duas transfecções realizadas, porém, descobrimos que se aumentarmos a concentração de Cas9 e gRNA conseguimos elevar essa taxa para 40% de eficiência. Toda via, quando cultivados os clones com maior concentração de Cas9 notamos que estes não cresceram em cultura e logo entraram em apoptose, sugerindo que alta concentração de Cas9 pode ser tóxica para as células. Semelhante aos achados de Peng et al. (2016) que relatam que um excesso molar de até 6 vezes superior de Cas9 perante ao gRNA, resulta em uma taxa de mutação mais elevada, porém quando se tem excesso de Cas9 pode gerar diferentes locais fora do local alvo (offtargets).

Como a interrupção do gene TFAM é letal, para manter as células pós transfectadas em cultura, suplementamos o meio de cultura com uridina e piruvato, pois sabemos que existe a possibilidade de não sobreviverem sem o gene TFAM, semelhante às células Rho zero que

são capazes de sobreviverem sem mtDNA. As células Rho zero são inteiramente dependentes de glicólise para sua demanda energética, assim como são auxotróficas para uridina, porque a enzima responsável pela síntese de uridina (dehydrogenase dihydro orotate) esta localizada na membrana interna mitocondrial e exige uma função da cadeia de transporte de elétrons para esta atividade. As Rho zero necessitam de um meio suplementado com uridina e piruvato como fonte de energia de modo que possa proliferar e sobreviver (KING; ATTARDI 1989; KING; ATTARDI, 1996). Sendo assim, as células tratadas com uridina e piruvato possuem a capacidade de manutenção in vitro de forma semelhante às células que não contém o mtDNA. Para efetuar a suplementação, seguimos o protocolo de Chiaratti e Meirelles (2006) e Pessoa et al. (2015) em seus estudos trataram fibroblastos fetais bovinos com Brometo de Etídio, para avaliar seu efeito sobre o número de cópias do DNA mitocondrial e sua ação no metabolismo celular. As culturas de fibroblastos tratadas e controle com uridina e piruvato se mantiveram bem em cultura, com isso foi observado que o tratamento não afetou a taxa de crescimento celular e que a suplementação foi capaz de suportar o crescimento normal das células. Semelhante aos nossos achados em que as células se mantiveram viáveis pós transfecção, não afetando a taxa de crescimento celular.

Diversos estudos tem avaliado os níveis de expressão (superexpressão e baixa expressão) de TFAM e sua relação com o numero de cópias do mtDNA. Em um estudo realizado por Larsson et al. (1998) o gene TFAM foi interrompido em camundongos pela tecnologia Cre-loxP in vivo, observaram que camundongos heterozigotos exibiram a letalidade embrionária e uma depleção do mtDNA.

Em nossos achados, até o momento certificamos a deleção de pares de bases do gene TFAM bovino, provavelmente gerando uma heterozigose. Mesmo sem poder atestar o knock-out do gene TFAM, sabemos que a interrupção do gene homozigoto de TFAM é letal em camundongos e frango, e em heterozigotos diminui a quantidade de TFAM por cerca de 50% (KANG; HAMASAKI, 2005). Com isso, acreditamos que geramos um novo modelo de estudo, pois como mostrado por Kang e Hamasaki (2005) a heterozigose diminui a quantidade de TFAM podendo acarretar em disfunções no mtDNA e geração de doenças, pois a superexpressão ou a baixa expressão pode acarretar em diversas disfunções do mtDNA e diminuição do número de cópias mitocondriais.

Marin-Garcia (2016) também demonstraram em seus estudos que camundongos heterozigotos apresentaram diminuição do número de cópias do mtDNA do miocárdio e os

camundongos homozigotos apresentaram depleção do mtDNA com uma diminuição de OXPHOS e morte durante o desenvolvimento embrionário. Assim como Nishiyama et al. (2010) relatam que alta expressão de TFAM em camundongos transgênicos, aumentam o número de cópias mitocondriais, mostrando que este aumento melhorou sintomas severos de doenças mitocondriais.

O produto do gene é necessário para regular o número de cópias do genoma mitocondrial e é essencial para o desenvolvimento embrionário em camundongos (ESTRAND et al., 2004). Assim como o gene TFAM é extremamente importante na manutenção do mtDNA, como citado por May-Panloup et al. (2005) que analisaram oócitos bovinos em diferentes fases embrionárias e relataram a grande importância de TFAM na manutenção dos primeiros estágios da embriogênese.

Em nossos estudos esta nova linhagem celular criada através da heterozigose do gene TFAM necessita ser estudada, caracterizada, a fim de afirmar que o TFAM que tem ação direta no mtDNA e que pode desempenhar um papel fundamental na manutenção da estabilidade genética, herança e segregação.

8 CONCLUSÃO

Este estudo propôs a edição do gene TFAM pela engenharia CRISPR Cas 9. O objetivo deste estudo foi gerar um novo modelo a fim de futuramente entender os mecanismos de herança e segregação mitocondrial. A técnica utilizada foi CRISPR Cas 9 uma ferramenta nova e eficaz na engenharia genética.

Pudemos concluir que os fibroblastos bovinos são viáveis para edição gênica por CRISPR/Cas9, pois estes obtiveram alta taxa de transfecção e se mantiveram bem em cultura quando cultivados com meio suplementado com uridina e piruvato. Também foi possível afirmar que o desenho do gRNA foi eficiente pois atingiu a sequência alvo na região exata de clivagem próximo a sequência PAM.

Quando avaliamos o sequenciamento obtivemos uma deleção de pares de bases, mostrando que o mecanismo foi viável e eficaz. Através desta edição conseguimos gerar um novo modelo de estudo, pois a baixa ou a alta expressão e regulação deste gene pode acarretar em diversas disfunções mitocondriais, acometendo o mtDNA e números de cópias.

REFERENCIAS

ASSIS NETO, A. C.; PEREIRA, F. T.; SANTOS, T. C.; AMBROSIO, C. E.; LEISER, R. MIGLINO, M. A. Morpho-physical recording of bovine conceptus (*Bos indicus*) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. **Reproduction Domestic Animals**, v. 45, n. 5, p. 760-72, 2010.

AUER, T. O.; DUROURE, K.; DE CIAN, A.; CONCORDET, J. P.; DEL BENE, F. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. **Genome Research**, v. 24, n. 1, p. 142-53, 2014.

BAKER, M. Gene- editing nucleases. **Nature Methods**, v. 9, p. 23-26, 2012.

BEYNUM, I.; MORAVA, E.; TAHER, M.; RODENBURG, R.J.; KARTESZI, J.; TOTH, K.; SZABADOS, E. Cardiac Arrest in Kearns- Sayre Syndrome. **JIMD reports**, v. 2, p. 7-10, 2012.

BHAYA, D.; DAVISON, M.; BARRANGOU, R. CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. **Annual Review Genetics**, v.45, p. 273–97, 2011.

BRADLEY, A.; RAMIRES-SOLIS, R.; ZHEHG, H.; HASTY, P.; DAVIS, A. Genetic manipulation of the mouse genome via gene targeting in embryonic stem cells. **Ciba Foundation Symposium**, v. 165, p. 256-69, 1992.

CANUGOVI, C.; MAYNARD, S.; BAYNE, A. C.; SYKORA, P.; TIAN, J.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; CROTEAU, D. L.; BOHR, V.A. The mitochondrial transcription factor A functions in mitochondrial base excision repair. **DNA Repair**, v. 9, n. 10, p. 1080-9, 2010.

CARLSON, D.F.; TAN, W.; LILICO, S. G.; STVERAKOVA, D.; PROUDFOOT, C.; CHRISTIAN, M.; VOYTAS, D. F.; LONG, C. L.; WHITELAW, C. B. A.; FALRENKRUG, S. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 43, p.17382-7, 2012.

CHIARATTI, M. R.; MEIRELLES, F. V. Increase in mitochondrial DNA quantity and impairment of oxidative phosphorylation in bovine fibroblast cells treated with ethidium bromide for 15 passages in culture. **Genetic and Molecular Research**, v. 5, n. 1, p. 55-62, 2006.

CHIARATTI, M. R.; FERREIRA, C. R.; MEIRELLES, F. V.; MÉO, S. C.; PERECIN, F.; SMITH, L. C.; FERRAZ, M. L.; FILHO, M. F. S.; GIMENES, L. U.; BARUSELLI, P. S.; GASPARRINI, B.; GARCIA, J. M. Xenoplasmic Transfer between Buffalo and Bovine Enables Development of Homoplasmic Offspring. **Cellular Reprogramming**, v. 12, n. 3, p. 231-36, 2010.

- CHRISTOPHER, T. C.; KOLESAR, J. E.; KAUFMAN, B. A. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, p. 921- 29, 2012.
- CHOI, Y. S.; KIM, S.; PAK, Y. K. Mitochondrial transcription factor A (mtTFA) and diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practices**, v. 54, n. 2, p. 3-9, 2011.
- CHOI, W.; YUM, S. Y.; LEE, S. L.; LEE, W. W.; LEE, J.; KIM, S. J.; KOO, O. Disruption of exogenous eGFP gene using RNA- guided endonuclease in bovine transgenic somatic cells. **Zygote**, v. 23, n. 6, p. 916-23, 2015.
- CYRANOSKI, D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. **Nature**, v.539, n.7630, p. 479, 2016.
- EKSTRAND, M. I.; FALKENBERG, M.; RANTANEN, A.; PARK, C. B.; GASPARI, M.; HULTENBY, K.; RUSTIN, P.; GUSTAFSSON, C. M.; LARSSON, N. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 9, p. 935-944, 2004.
- ELSIK, C. G.; TELLAM, R. L.; WORLEY, K. C. The genome sequence of Taurine cattle: A window to ruminant biology and evolution. **Science**, v. 324, n. 5926, p. 522-27, 2009.
- ESVEL, T. K. M.; MALI, P.; BRAFF, J. L.; MOOSBURNER, M.; YAUNG, S. J.; CHURCH, G. M. Orthogonal Cas 9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. **Nature Methods**, v. 10, n. 11, p. 1116-1121, 2013.
- EXOCOFFIER, L.; YANG, Z. Substitution rate variation among sites in mitochondrial hypervariable region i of humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 10, p. 1357-68, 1999.
- FALKENBERG, M.; GASPARI, M.; RANTANEN, A.; TRIFUNOVIC, A.; LARSSON, N.; GUSTAFSSON, C. M. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. **Nature genetics**, v.31, n.3, p. 289-294, 2002.
- FERREIRA, C. R.; BURGSTALLER, J. P.; PERECIN, F.; GARCIA, J. M.; CHIARATTI, M.R.; MÉO, S. C.; MULLER, M.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V.; STEINBORN, R. Pronounced segregation of donor mitochondria introduced by bovine oplasmic transfer to the female germ-line. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 3, p. 563-571, 2010.
- FINERAN, P. C.; RON, L. D. Gene regulation by engineered CRISPR-Cas systems. **Current Opinion in Microbiology**, v.18, p. 83–89, 2014.
- GARSTKA, H. L.; FACKE, M.; ESCRIBANO, J. R.; WIESNER, R. J. Stoichiometry of mitochondrial transcripts and regulation of gene expression by mitochondrial transcription factor A. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 200, n. 1, p. 619-626, 1994.

GOTO, Y.; NONAKA, I.; HONAI, S. A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 1097, n. 3, p. 238-40, 1991.

GUNTHER, C.; VON HADELNA.; THOMSEN, A.; BINETTI, G.; HOCK, C.; NITSCH, R.M.; STOPPE, G.; REISSD, J.; GALA, A.; FINCKHA, U. Possible association of mitochondrial transcription factor A (TFAM) genotype with sporadic Alzheimer disease. **Neuroscience Letters**, v. 369, n. 3, p. 219–23, 2004.

HAEUSASSLER, M.; CONCORDET, J. P. Genome Editing with CRISPR-Cas 9: Can It ,Get Any Better? **Journal of Genetics and Genomics**, v. 43, n. 5, p. 239-50, 2016.

HALLBERG, B. M. H .; LARSSON, N. G. TFAM forces mtDNA to make a U-turn. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 18, n. 11, p. 1179-81, 2011.

HAMM, A.; KROTT, N.; BREIBACH, I.; BLINDT, R.; ROSSERHOFF, A. K. Efficient transfection method for primary cells. **Tissue Engineering**, v. 8, n. 2, p. 235-45, 2002.

HAN, H.; MA, Y.;WANG, T.; LIAN, L.; TIAN, X.; HU, R.; DENG, S.; LI,K.; WANG, F.; LI, N.; LIU, G.; ZHAO, Y.;LIAN, Z. One-step generation of myostatin gene knockout sheep via the CRISPR/Cas9 System. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**, v. 1, n. 1, p. 2-5, 2014.

HEO, Y.; QUAN, X.; XU, Y.; BAEK, S.; CHOI, H.; KIM, N.; KIM, J. CRISPR/Cas9 nuclease-mediated gene knock-in in bovine pluripotent stem cells and embryos. **Stem Cells Development**, v. 24, n. 3, p. 393-402, 2014.

HSU, P. D.; LANDER, E.S.; ZHANG, F. Development and Applications of CRISPR Cas9 for Genome Engineering. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1262-78, 2014.

HUA, S.; ZHANG, Y.; LI, X. C.; MA, L. B.; CAO, J. W.; DAI, J. P.; LI, R. Effects of granulosa cell mitochondria transfer on the early development of bovine embryos in vitro. **Cloning Stem Cells**, v. 9, n. 2, p. 237-246, 2007.

JIANG, W.; BIKARD, D.; COX, D.; ZHANG,F.; MARRAFFINI, L. A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 233-9, 2013.

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, n. 6096, p. 816-21, 2012.

KANG, D.; HAMASAKI, N. Mitochondrial Transcription Factor A in the Maintenance of Mitochondrial DNA Overview of Its Multiple Roles. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1042, p. 101-108, 2005.

KANG, D.; KIM, S. H.; HAMASAKI, N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): Roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. **Mitochondrion**, v. 7, p. 39-44, 2007.

KIM, Y. G.; CHA, J.; CHANDRASEGARAN, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 3, p. 1156-60, 1996.

KIM, S.; KIM, D.; WOO CHO, S.; KIM, J.; KIM, S. J. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. **Genome Research**, v. 24, n. 6, p. 1012-9, 2014.

KING, M. P.; ATTARDI, G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. **Methods Enzymology**, v. 264, p. 304-313, 1996.

KING, M. P.; ATTARDI, G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. **Science**, v. 246, n. 4929, p. 500-503, 1989.

KUKAT, C.; LARSSON, N. mtDNA makes a U-turn for the mitochondrial nucleoid. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 9, p. 457- 63 2013.

LARSSON, N. G.; CLAYTON, D. A. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. **Annual Review Genetics**, v. 29, p. 151-78, 1995.

LARSSON, N. G.; WANG, J.; WILHELMSSON, H.; OLDFORS, A.; RUSTIN, P.; LEWANDOSKI, M.; BARSH, G. S.; CLAYTON, D. A. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. **Nature Genetics**, v. 18, n. 3, p. 231-36, 1998.

LENZ, P.; BACOT, S.M.; FRAZIER-JESSIEN, M.R.; FELDMAN, G. M. Nucleoporation of dendritic cells: efficient gene transfer by eletroporation into human monocyte-derived dendritic cells. **Febs Letters**, v. 538, p. 149-54, 2003.

LI, T.; HUANG, S.; JIANG, W. Z.; WRIGHT, D.; SPALDING, M. H.; WEEKS, D. P.; YANG, B. TAL nucleases (TALENs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 1, p. 359–72, 2011.

LIU, H. S.; AGARWAL, S.; KMIEC, E.; DAVIS, B. R. Target beta-globin gene conversion in human hematopoietic CD34(+) and Lin(-)CD38(-)cells, **Gene Therapy**, v. 9, n. 2, p. 118-126, 2002.

LIU, X.; WANG, Y.; TIAN, Y.; YU, Y.; GAO, M.; HU, G.; SU, F.; PAN, S.; LUO, Y.; GUO, Z.; QUAN, F.; ZHANG, Y. Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to beta-casein locus using zinc-finger nucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 281, n. 1780, p. 20133368, 2014.

LU, B.; LEE, J.; NIE, X.; LI, M.; MOROZOV, Y. I.; VENKATESH, S.; BOGENHAGEN, D. F.; TEMIAKOV, D.; SUZUKI, C. K. Phosphorylation of human TFAM in mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA+ Lon Protease. **Molecular Cell**, v. 49, n. 1, p. 121-132, 2013.

MARIN-GARCIA, J. Mitochondrial DNA repair: a novel therapeutic target for heart failure. **Heart Failure Reviews**, v. 21, p. 475-487, 2016.

MAY-PANLOUP, P.; VIGNON, X.; CHRETIEN, M. F.; HEYMAN, Y.; TAMASSIA, M.; MALTHIERY, Y.; REYNIER, P. Increase of mitochondrial DNA content and transcripts in early bovine embryogenesis associated with upregulation of mtTFA and NRF1 transcription factors. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 65, 2005.

MCPHERRON, A. C.; LEE, S. J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 12457–61, 1997.

MEIRELLES, F. V.; ROSA, A. J. M.; LOBO, R. B.; GARCIA, J. M.; SMITH, L. C.; DUARTE, F. A. M. Is the American zebu really *Bos indicus*?. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 4, p. 543-546, 1999.

MITTENDORF, R.; WILLIAMS, M. A.; BERKEY, C. S.; COTTER, P. F. The length of uncomplicated Human Gestation, **Obstetrics & Gynecology**, v. 75, p. 929-932, 1990.

NAKAYAMA, A.; SATO, M.; SHINOHARA, M.; MATSUBARA, S.; YOKOMINE, T.; AKASAKA, E.; YOSHIDA, M.; TAKAO, S. Efficient transfection of primary culture porcine embryonic fibroblasts using the nucleofection system. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, n. 4, p. 523-34, 2007.

NISHIYAMA, S.; SHITARA, H.; NAKADA, K.; ONO, T.; SATO, A.; SUZUKI, H.; OGAWA, T.; MASAKI, H.; HAYASHI, J.; YONEKAMA, H. Over-expression of Tfam improves the mitochondrial disease phenotypes in a mouse model system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 401, n. 1, p. 26-31, 2010.

NAMBIAR, M. P.; FISHER, C. U.; WARKE, V. G.; KRISHNAN, S.; MITCHELL, J. P.; DELANEY, N.; TSOKOS, G. C. Reconstruction of deficient T cell receptor zeta chain restores T cell signaling and augments T cell receptor/CD3- induced interleukin-2 production of patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheumatology**, v. 48, n. 7, p. 1948-55, 2003.

NASSEH, I. E.; TENGAN, C. H.; KIYOMOTO, B. H.; GABBAI, A. A. Doenças Mitocondriais. **Revista Neurociências**, v. 9, n. 2, p. 60-69, 2001.

NICHOLLS, T. J.; MINCZUK, M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. **Experimental Gerontology**, v. 56, p. 175-81, 2014.

PATTANAYAK, V.; RAMIREZ, C. L.; JOUNG, J. K.; LIU, D. R. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. **Nature Methods**, v. 8, n. 9, p. 765–770, 2011.

PENG, R.; GUIGAO, L.; JINMING, L. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9- mediated genome editing. **FEBS Journal**, v. 283, p. 1218-1231, 2015.

PESSOA, L.V.F.; BRESSAN, F.F.; CHIARATTI, M.R.; PIRES, P.R.L.; PERECIN, F.; SMITH, L.; MEIRELLES, F.V. Mitochondrial DNA dynamics during in vitro culture and pluripotency induction of a bovine Rho 0 cell line. **Genetics and Molecular Research**, v.14, p.14093-14104, 2015.

PORTEUS, M. H.; BALTIMORE, D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. **Science**, v. 300, p. 763, 2003.

ROBERTS, R. M. Prevention of human mitochondrial (mtDNA) disease by nucleus transplantation into an enucleated donor oocyte. **American Journal Medicine Genetics**, v. 87, n. 3, p. 265-6, 1999.

RUBIO-COSIALS, A.; SIDOW, J. F.; JIMENEZ-MENENDEZ, N.; FERNANDEZ-MILLAN, P.; MONTOYA, J.; JACOBS, H. T.; COLL, M.; BERNADO, P.; SOLA, M. Human mitochondrial transcription factor a induces a U-turn structure in the light strand promoter. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 18, n. 11, p. 1281-1289, 2011.

SANDER, J. F.; CADE, L.; KHAYTER, C.; REYON, D.; PETERSON, R. T.; JOUNG, J. K.; YEH, J. R. J. Target gene disruption in somatic zebrafish cells used engineered TALENS. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 697-698, 2011.

SANDER, J. D.; JOUNG, K. K. CRISPR Cas9 systems for editing , regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 347-55, 2014

SCARPULLA, R.C. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1576, p. 1–14, 2002.

SHADEL, G. S.; CLAYTON, D. A. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. **Annual Review Biochemistry**, v. 66, p. 409-435, 1997.

SHUBERT, S.; HELLER, S.; LOFFER, B.; SHAFER, I.; SEIVEL, M.; VILLANI, G.; SEIBEL, P. Generation of Rho zero cells, visualization and quantification of the mtdna depletion process. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 9850-9865, 2015.

SILVA, E. C. B. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: produção e efeitos sobre a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides. **Ciência Veterinária**, v. 13, n. 1/2/3, p. 9-16, 2010.

SMITH, J.; BIBIKOVA, M.; WHITBY, F. G.; REDDY, A. R.; CHANDRASEGARAN, S.; CARROLL, D. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 3361-3369, 2000.

SOUZA, A. F. M .; GIUGLIANI, R. Doenças mitocondriais. In: CARAKUSHANSKI, E. **Doenças genéticas em pediatria**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 189-195.

STERNBERG, N.; SAUER, B.; HOESS, R.; ABREMSKI, K. Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. **Journal of Molecular Biology**, v. 187, n. 2, p. 197–212, 1986.

SUN, N.; ZHAO, H. Transcription activator- like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 7, p. 1811-1821, 2013

SUTOVSKY, P.; MORENO, R. D.; RAMALHO-SANTOS, J.; DOMINK, T.; SIMERLY, C.; SCHATTEN, G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. **Biology Reproduction**, v. 63, n. 2, p. 582-590, 2000.

TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. **Cardiovascular Research**, v. 81, p. 449-456, 2009.

YU, S.; LUO, J.; SONG, Z.; DING, F.; DAI, Y.; LI, N. Highly eficiente modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zincfinger nucleases in cattle. **Cell Research**, v. 21, p. 1638–40, 2011.

ZEVIANE, N.; BERTAGNOLIO, B.; UZIEL, G. Neurological presentations of mitochondrial diseases. **Journal of Inherited Metabolic Diseases**, v. 19, p. 504-20, 1996.

WALLACE, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 359-407, 2005.

WALLACE, D. C.; LOTT, M. T.; HODGE, J. A.; SCHUR, T. G.; LEZZA, A. M. S.; ELSAS, I. I. L. J.; NIKOSKELAINEN, E. K. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. **Science**, v. 242, p. 1427-30, 1988.

WANG, Z. Genome engineering in cattle: recente techonological advancements. **Chromosome Research**, v. 23, p. 17-29, 2015.

WOODING, P.; BURTON, G. **Comparative placentation structures, functions and evolution**. Berlin: Springer, 2008. 301 p.