

FELIPE EDUARDO LUEDKE

Inserção de gene repórter fluorescente em região gênica de SOX2 para estudo da diferenciação celular no desenvolvimento embrionário inicial bovino

São Paulo

2021

FELIPE EDUARDO LUEDKE

Inserção de gene repórter fluorescente em região gênica de *SOX2* para estudo da diferenciação celular no desenvolvimento embrionário inicial bovino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal - VRA

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Demarchi Goissis

São Paulo

2021

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. 4128
FMVZ

Luedke, Felipe Eduardo
Inserção de gene repórter fluorescente em região gênica de SOX2 para estudo da diferenciação celular no desenvolvimento embrionário inicial bovino / Felipe Eduardo Luedke. – 2021.
87 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Demarchi Goíssis.

1. Edição gênica. 2. CRISPR/Cas9. 3. Recombinação homóloga. 4. Blastocisto I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Inserção de gene repórter fluorescente em região gênica de Sox2 para estudo da diferenciação celular no desenvolvimento embrionário inicial bovino", protocolada sob o CEUA nº 9997230419 (se ~~sexus~~), sob a responsabilidade de **Marcelo Demarchi Goissis** e equipe; Felipe Eduardo Luedke - 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 **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 02/07/2019.

We certify that the proposal "Insertion of fluorescent reporter gene in Sox2 gene region to study cell differentiation in early bovine embryo development", utilizing 0 Bovines (0), protocol number CEUA 9997230419 (se ~~sexus~~), under the responsibility of **Marcelo Demarchi Goissis** and team; Felipe Eduardo Luedke - 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 School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 07/02/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 06/2019 a 05/2021

Área: **Reprodução Animal**

Origem:	Amostras biológicas estocadas			
Espécie:	Bovinos	sexo:	Fêmeas	idade: 2 a 10 anos
Linhagem:	SRD			Peso: 400 a 600 kg
N:	0			
Origem:	Amostras biológicas estocadas			
Espécie:	Bovinos	sexo:	Machos	idade: 2 a 10 anos
Linhagem:	Bos taurus indicus			Peso: 400 a 800 kg
N:	0			
Origem:	Amostras biológicas estocadas			
Espécie:	Bovinos	sexo:	Fêmeas	idade: 10 a 12 anos
Linhagem:	Bos taurus indicus			Peso: 400 a 500 kg
N:	0			

Local do experimento: Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, São Paulo/SP

São Paulo, 03 de julho de 2019

Profa. Dra. Annelise de Souza Traidi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LUEDKE, Felipe Eduardo

Título: Inserção de gene repórter fluorescente em região gênica de SOX2 para estudo da diferenciação celular no desenvolvimento embrionário inicial bovino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: 03.11.2021

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai e ao meu avô, meus amigos de todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, por ser meu apoio de bases fortes. Ao meu pai e ao meu avô vão os agradecimentos pelo companheirismo, pelos ensinamentos da vida, pelos conselhos e pelos telefonemas de todos os dias, fizeram eu me sentir mais próximo de casa.

Ao meu pai eu agradeço por ter me ensinado a ser forte, a ter coragem para enfrentar qualquer problema, por ter me ensinado que “se não está bem feito, ainda não está pronto” e “se o resultado ainda não apareceu, seu trabalho ainda não terminou”, uso essas frases, todos os dias.

Ao meu avô eu agradeço por me ensinar as coisas simples, e talvez as mais bonitas, ao me regalar o gosto pelas coisas do campo, mesmo que sem pensar, definiu o rumo da minha vida e muito do que hoje sou.

À minha mãe por ser minha rocha, por telefonar sempre que algo não está bem, ainda não descobri como ela adivinha isso. Por tentar até hoje me proteger de tudo o que possa ser perigo, se existe algo que eu posso me orgulhar é que tive uma mãe zelosa, carinhosa e amorosa.

À minha Julinha às minhas desculpas, quando eu percebi, você já havia crescido, na minha cabeça você ainda tem 5 anos. Queria ter aproveitado mais, só isso...

Agradeço ao meu orientador Prof. Marcelo Goissis por tudo! Pela paciência de ensinar muitas vezes a mesma coisa, pela oportunidade que tive de ser seu aluno. Tens o dom de ensinar, de forma simples e objetiva, faz as coisas parecerem menos complicadas e sabe responder qualquer pergunta, sobre absolutamente qualquer coisa. Ensina como se fosse um irmão! Aqui respondo ao questionamento que me fizeste na minha entrevista, - “O que você acha sobre ser orientado por um professor que está em início de carreira? ”, - Lhe digo que foi a melhor escolha que eu poderia ter feito, sem nenhuma dúvida. Que orgulho de ser orientado do Dr. Goissis.

Vou sentir saudade das viagens da Prof^a Mayra pois sempre chegavam muitos chocolates na bagagem! Apesar de estar sempre muito atarefada, SEMPRE encontrava tempo para ouvir seus orientados, e até os emprestados, como eu, possuí o dom de ensinar, de ser assertiva, de perceber, com precisão cirúrgica, se

alguém está com problema. Sabe intervir e sabe estender a mão, só mães fazem isso. Obrigado por ser nossa grande fortaleza.

À Camilla eu agradeço por fazer os nossos dias mais afáveis, por ensinar tanto, com tanta clareza e com tanta humildade. Obrigado por me tirar das enrascadas com os PCRs e por me mostrar o benefício das coisas bem feitas, hoje vejo os BSAs nas balanças dos laboratórios – acho que fui um bom aluno, e me orgulho disso. Obrigado pelos bolos de milho, pelas idas ao Vanessa, pelos churrascos, obrigado pelo carinho e obrigado pela amizade. Essa Universidade poderia ter 10 por cento de funcionários, se todos trabalhassem como você. Vou sentir muita saudade, e espero que um dia eu seja um profissional e um ser humano igual a você! Foste um grande exemplo para mim, todos os dias!

Ao nosso grande chefe Prof. Visintin eu agradeço por estar sempre conosco, mesmo que de longe, sabemos que estamos sempre bem amparados. Obrigado por nos abrir as portas do mundo com as suas credenciais. Temos muito orgulho do senhor professor!

Aos meus amigos da vida Julinha e João, os dias não são os mesmos sem vocês, fizeram eu ter um lar, uma grande família! Obrigado Julia, por me fazer refletir as coisas, seu jeito de menina bruta caipirona foi feito sob medida só para você, obrigado por me ensinar a rodar o sêmen, a sacudir o percoll e a contar a fluorescência do zinco. Tens uma maneira simples e cativante de ensinar, lembro do dia que me disse a senha da porta "dezenove dezenove estrelinha"! Um jeito fofo e mimoso, que contrasta tão bem com o Julião goleiro do nosso time! De bota surrada, que joga cerveja nas pessoas, que tem uma força igual um toouro nelore, mas com jeitinho de princesa. Obrigado por tudo, alegrou a minha vida "dum taaaanto", com teu sorriso, com o teu jeitinho "trapaiado-quarta-fera" e com a tua leveza das pessoas boas.

Ao João, Jão ou João Luis, obrigado por cuidar de nós, por nos impor limites e por ser o ser pensante daquela casa. Desculpa pelas vezes que destruímos a casa e pelas vezes que mendigamos que você fizesse comida. Obrigado por ser a nossa luz de sabedoria e de confiança. Nosso grande criador de Gir, que nos orgulha e nos mostra que sempre é possível. Você tem a capacidade de brilhar, mesmo quando as pessoas muitas vezes tentam apagar esse brilho, voa João!

Eriquinho, Éguik, do camagão! Obrigado por não desistir de nós, mesmo com tanta importunação, obrigado por ensinar o que são as coisas do Japão, por ser

amigo, daqueles de verdade. Nosso gurizinho, quando a gente viu, já tava grande, e agora faz sucesso na Cirú. Obrigado pela parceria de todos os dias, pelas pescarias, pelas idas ao Nakato e por simplesmente topor qualquer parada com um simples – “Bora!”. Tenho orgulho de ser seu amigo.

No nosso 105b, fomos muito felizes, tivemos tudo o que uma família tem, inclusive uma mãe, que buscava pizza nas sextas-feiras, que topava qualquer maluquice que a gente inventasse, que conversáááava de tudo que a gente quisesse, que saudade de conversar com a senhora Dona Mônica. Obrigado por ser nosso apoio e nossa morada, fez eu me sentir em casa, perto da minha mãe. Sinto saudade.

À Vivian Maria o meu agradecimento por me ensinar a ser resiliente, a enfrentar os desafios de forma equilibrada e tranquila. É a rainha da sensatez e da sabedoria. Me desculpa por tantas vezes que te importunamos.

Ao nosso grande irmão Adriano obrigado pelos conselhos, pelos ensinamentos e pelas dicas de absolutamente tudo, faz tudo parecer tão fácil e tão divertido. Já sinto saudade das risadas, dos karaokês e do quanto aprendi contigo.

Às minhas colegas de bancada Carol e Letícia eu agradeço pelos ensinamentos, Carol me mostrou como iniciar no laboratório, fez comigo as primeiras FIVs e os primeiros PCRs enquanto a Letícia alegrava o ambiente, com o jeito particular de quem faz as coisas um tanto no desespero. Vou sentir saudade do CARÁÁÁÁÁCA, XOOOOU e dos cafezinhos com biscoito.

Thais obrigado por nos ensinar a ter persistência, por me acompanhar tantas vezes enquanto eu rodava o Percoll olhando no caderno. Obrigado por estar disponível sempre que surgia uma dúvida e por ser a grande moça da estatística.

Paco obrigado pelos ensinamentos de espanhol, pelos rolês aleatórios e pelas cervejas geladas, desculpa por avacalhar a tua mesa todos os dias e por fazer tiro-ao-alvo no teu leãozinho. Quero deixar registrado aqui: - Quando vai sair o almoço peruano?

Aos nossos guris de laboratório Matheus, Larissa, Yuki e Gabriel eu agradeço por compreenderem que eu precisava trabalhar escutando modão. Obrigado por me ensinarem tanta coisa, quando eu crescer quero ser igual a vocês.

Aos meus professores de graduação eu agradeço pelos primeiros passos na vida acadêmica, pelos ensinamentos básicos da graduação, e principalmente pela amizade que construímos. Não posso jamais deixar de mencionar a professora

Etiane Skrebsky como minha grande orientadora, obrigado por cada ensinamento, se não fosse a senhora, não estaria aqui.

À professora Adriana Neves obrigado por me fazer ir mais longe, a não ter medo, a enfrentar! Obrigado por me orientar na graduação, e na profissão.

À professora Larissa Brum eu agradeço pela amizade, pela cumplicidade de um irmão, pelas viagens e por cada orientação, levo seus ensinamentos para todos os lugares que vou.

À todos que aqui mencionei o meu agradecimento e a certeza de que sentirei saudades.

Agradeço à Universidade Federal do Pampa pela minha profissão, à Universidade de São Paulo e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ pela oportunidade de realizar o Mestrado.

Agradeço ao Departamento de Reprodução Animal e principalmente ao Laboratório de Fertilização *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal e ao Laboratório de Biologia do Espermatozoide pela oportunidade de aprender e de errar.

Agradeço também à professora Fabiana Bressan e ao Dr Ramón Botigelli pelo auxílio com as bESCs, por abrirem as portas do seu laboratório na FZEA/USP.

E por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao CNPQ e à CAPES pelo apoio financeiro aos experimentos, em especial à FAPESP pela bolsa de mestrado (processo 2019/03014-9).

“De nada adianta ser luz, se não iluminar o caminho dos demais”

Walt Disney

RESUMO

LUEDKE, F.E. **Inserção de gene repórter fluorescente em região gênica de SOX2 para estudo da diferenciação celular no desenvolvimento embrionário inicial bovino.** 2021. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A separação entre massa interna celular (MCI) e trofotoderma (TE) é o primeiro evento de diferenciação celular que ocorre no embrião mamífero, seguida pela diferenciação na MCI do epiblasto (EPI) e endoderma primitivo (PE). Falhas nestes processos de desenvolvimento inicial podem ocasionar perdas embrionárias e conseqüentemente econômicas. A influência do sistema de produção embrionária nos primeiros eventos de diferenciação celular precisa ser mais elucidada, refletindo em índices que ainda podem ser melhorados na produção de embriões bovinos *in vitro*. O soro fetal bovino (SFB), apesar de seus efeitos deletérios sobre fatores epigenéticos, ainda é usado em sistemas de produção *in vitro* e pode influenciar esta diferenciação. Ainda, as técnicas para estudo dos embriões normalmente envolvem a destruição dos mesmos e não permitem acompanhar em tempo real a dinâmica de expressão dos genes relacionados à diferenciação em MCI e TE. Novas técnicas como CRISPR/Cas9 permitem alteração direcionada da sequência de DNA genômico, assim, a introdução direcionada de proteínas fluorescentes repórteres permitiria a visualização em tempo real da expressão de genes de interesse nos embriões. Diante disso, nossos objetivos foram: testar a influência do soro fetal bovino nas primeiras diferenciações e, realizar a inserção dirigida de uma proteína repórter fluorescente na região do gene SOX2 por recombinação homóloga. Ainda, comparamos a eficiência da inserção gênica com uso do sistema CRISPR em diferentes momentos do desenvolvimento embrionário, com diferentes horários pós inseminação e com diferentes concentrações de material injetado. No primeiro experimento observamos que a retirada do SFB do cultivo embrionário não causa alterações na alocação de células na MCI ou TE, quando se alia esta remoção à renovação de uma parte do meio de cultivo às 90 horas pós inseminação (hpi). A ausência de suplementação de SFB ou de meio de cultivo levou à diminuição das células do TE, entretanto não alterou o número de células do PE. No segundo experimento, nenhum embrião produzido apresentou fluorescência, portanto todos os blastocistos tiveram seu DNA extraído para genotipagem. Foi realizada uma amostragem, e de 34 embriões verificados, um apresentou banda correspondente ao local do inserto e também banda correspondente ao embrião controle (*wild type*), sugerindo mosaicismo. Ao final, observamos que as melhores probabilidades de inserção gênica nos embriões bovinos aconteceram quando a injeção dos componentes do sistema CRISPR foi realizada após 8 horas de FIV e com maiores concentrações. Em conclusão, pudemos remover o SFB do

nosso sistema de produção de embriões e surpreendentemente o SFB não influenciou a diferenciação em PE. Ainda, são necessários maiores estudos a fim de se otimizar a ferramenta para a obtenção de *knock-in* em embriões bovinos, principalmente para que se obtenha taxas de maior sucesso e redução da probabilidade de ocorrência de mosaicismos nestes embriões.

Palavras-chave: Edição gênica. CRISPR/Cas9. Recombinação Homóloga. Blastocisto

ABSTRACT

LUEDKE, F. E. **Insertion of fluorescent reporter gene into SOX2 gene region to study cell differentiation in early bovine embryo development.** 2021. 87p. Master of Science. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, São Paulo, 2021.

The separation between inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) is the first cell differentiation event that occurs in the mammalian embryo, followed by differentiation into the epiblast MCI (EPI) and primitive endoderm (PE). Failures in these early development processes can lead to embryonic and subsequent economic losses. The influence of the embryo production system on the first cell differentiation events needs to be further elucidated, reflecting in rates that can still be improved in the production of *in vitro* bovine embryos. Fetal bovine serum (FBS), despite its deleterious effects on epigenetic factors, is still used in *in vitro* production systems and may influence this differentiation. Furthermore, the techniques for studying embryos usually involve their destruction and do not allow real-time monitoring of the expression dynamics of genes related to differentiation in ICM and TE. New techniques such as CRISPR/Cas9 allow targeted alteration of genomic DNA sequence, thus targeted introduction of fluorescent reporter proteins would allow real-time visualization of the expression of genes of interest in embryos. Therefore, our objectives were: to test the influence of fetal bovine serum in the first differentiations and to carry out the targeted insertion of a fluorescent reporter protein in the region of the SOX2 gene by homologous recombination. Furthermore, we compared the efficiency of gene insertion using the CRISPR system at different moments of embryonic development, with different times after insemination and with different concentrations of injected material. In the first experiment, we observed that FBS removal from the embryonic culture does not cause changes in cell allocation in the ICM or TE, when this removal is combined with the renewal of a part of the culture medium at 90 hours after insemination (hpi). The absence of FBS or culture medium supplementation led to a decrease in TE cells, however it did not change the number of PE cells. In the second experiment, no embryo showed a fluorescent signal, so all blastocysts had their DNA extracted for genotyping. We sampled 34 embryos and one presented a band corresponding to the insertion site and also a band corresponding to the control embryo (wild type), suggesting mosaicism. We

observed that best chances of gene insertion occurred when the injection of components of the CRISPR system was performed after 8 hours of IVF and with higher concentrations. In conclusion, we were able to remove SFB from our embryo production system and surprisingly SFB did not influence differentiation into PE. Still, further studies are needed in order to optimize the tool for obtaining knock-in in bovine embryos, mainly to obtain higher success rates and reduce the probability of occurrence of mosaicism in these embryos.

Keywords: Gene editing. CRISPR/Cas9. Homologous Recombination. Blastocyst

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Embriões bovinos produzidos in vitro, colhidos às 186 hpi e submetidos à imunofluorescência com anticorpo primário anti-CDX2 nos diferentes grupos (A) Embriões bovinos produzidos in vitro, colhidos às 210 hpi e submetidos à técnica de imunofluorescência com anticorpo anti-SOX17 (B)37
- Figura 2 - Modelo hipotético gráfico representando a introdução dirigida da proteína *mCherry* na região 3' do gene *SOX2* em embriões bovinos.....43
- Figura 3 - Amplificação de fragmento correspondente a 225 pb nas amostras gRNA1 e 226 pb nas amostras de gRNA2.....48
- Figura 4 - Representação gráfica do plasmídeo construído pX330_Cas9_gRNA1_SOX2.....49
- Figura 5 - Eletroforese realizada com os produtos da Digestão dos plasmídeos “pBS_mCherry_SOX2_3’ em quatro amostras diferentes.....51
- Figura 6 - Digestão enzimática demonstrando a liberação dos fragmentos correspondentes ao fragmento 5’ (780 pb) do gene *SOX2* e do plasmídeo juntamente com o fragmento 3’ do gene *SOX2* (4890pb)52
- Figura 7 - Representação gráfica do plasmídeo construído, com a sequência do gene *SOX2*.....52
- Figura 8 - Eletroforese da detecção de mutação em células lipofectadas.....54
- Figura 9 - Representação gráfica da sequência da região do gene *SOX2* em bovinos.....60
- Figura 10 - Representação gráfica do produto de PCR da sequência *wild-type*61

Figura 11 - Representação gráfica do produto de PCR da sequência esperada com inserção de <i>mCherry</i>	62
Figura 12 - Embriões produzidos in vitro e distribuídos em grupos controle e injetado.....	65
Figura 13 - Embriões produzidos in vitro com FIV de 08 ou 16 horas, com diferentes concentrações de material injetado e submetidos à eletroforese	69
Figura 14 - Embrião produzido in vitro e submetido à imunofluorescência com anticorpo primário <i>goat</i> anti-SOX17 (A). Embrião submetido à imunofluorescência com anticorpo primário <i>rabbit</i> anti-CDX2 em concentração 1:50 (B).	70
Figura 15 - Imagem de microscopia de epifluorescência demonstrando célula com possível inserção de <i>mCherry</i>	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Contagem de células positivas para CDX2 (TE), células negativas para CDX2 (MCI) e células totais após imunocoloração de blastocistos de 186hpi.....	36
Tabela 2 - Contagem de células positivas para SOX17 e células totais após imunomarcação de blastocistos de 210hpi	37
Tabela 3 - Diferentes concentrações de material injetado e diferentes horários de microinjeção	58
Tabela 4 - Descrição das concentrações de material transfectado nas células-tronco embrionárias bovinas (bESC)	64
Tabela 5 - Média das taxas de Clivagem, Blastocisto e Desenvolvimento com 75ng/µl de mRNA para Cas9-mas, 50ng/µl de gRNA e 20ng/µl de sequência doadora microinjetada por embrião, obtidas nas replicatas 1, 2 e 3	66
Tabela 6 - Média das taxas de Clivagem, Blastocisto e Desenvolvimento com 75ng/µl de mRNA para Cas9-mas, 50ng/µl de gRNA e 50ng/µl de sequência doadora microinjetados por embrião, obtidas nas replicatas 4 e 6 (16hpi) e 5 e 7 (8hpi).....	67
Tabela 7 - Média das taxas de Clivagem, Blastocisto e Desenvolvimento com 75ng/µl de mRNA para Cas9-mas, 50ng/µl de gRNA e 100ng/µl de sequência doadora microinjetada por embrião, obtidas nas replicatas 8, 9 e 10 (8hpi) e 11 (16hpi)	68
Tabela 8 - Média das taxas de Clivagem, Blastocisto e Desenvolvimento com 100ng/µl de mRNA para Cas9-mas, 100ng/µl de gRNA e 100ng/µl de sequência doadora microinjetada por embrião, obtidas nas replicatas 12, 13 e 14 (8hpi) e 15 e 16 (16hpi)	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Taxas de produção de blastocistos (blastocisto/estruturas totais) produzidos *in vitro* dos três diferentes grupos avaliados às 210 hpi (A). Taxa de desenvolvimento (blastocisto/clivados) avaliada entre os três diferentes grupos às 210 hpi (B).....35

Gráfico 2 - Avaliação de características relacionadas ao metabolismo energético..36

LISTA DE ABREVIATURAS

µg - micrograma

µl – microlitro

µM – micro Molar

µm - micrômetro

ANOVA – Análise de Variância

ApE – A Plasmid Editor, *software*

APOBEC3 - Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 3

ATP – Adenina Trifosfato

bESC – Célula-Tronco Embrionária Bovina

BSA – Albumina Sérica Bovina

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

Cas9 – Enzima de corte associada ao sistema CRISPR para edição gênica

Cas9-mSA – Enzima Cas9 conjugada com estreptavidina

CDX2 - Caudal type homeobox 2

CEUA – Conselho de ética de uso de animais

CIV – Cultivo *in vitro*

CO₂ – Dióxido de Carbono

CRISPR - Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas

D7 – Sétimo dia de cultivo embrionário

D8 – Oitavo dia de cultivo embrionário

DMEM – *Dulbecco's modified eagle media*

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

DNTP - Desoxirribonucleotídeo Fosfatado

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPI – Epiblasto

ERK – Extracellular Signal-Regulated Kinase

FAD⁺ - Flavina Adenina Dinucleotídeo

FGF4 – Fator de crescimento de fibroblasto 4

FIV – Fertilização *in vitro*

FSH – Hormônio folículo-estimulante

FWD – *Forward*

gRNA1 e gRNA2 – RNAs guia de regiões alvo do gene SOX2

HCG – Gonadotrofina coriônica humana

HF – Alta Fidelidade, do inglês *high fidelity*

HH – Hamster Embryo Culture Media-HEPES

Hpi – Horas pós-inseminação

HR – Recombinação Homóloga

IETS – Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões

Knock – out – Deleção gênica

Knock-in – Inserção gênica

KSOM – potassium simplex optimized medium

LB – Meio Luria Bertani

LiCl – Cloreto de Lítio

MCI – Massa celular interna

MIV – Maturação *in vitro*

mL - Mililitro

mM – Mili Molar

mTOR – Alvo mecanístico da Rapamicina

NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NHEJ – Junção de Extremidades não-Homólogas

nm – nanômetro

O₂ – Oxigênio

°C – Grau *Celsius*

Pb – Pares de bases

PBS – Solução Salina Tamponada Fosfatada

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PE – Endoderma primitivo, do inglês *primitive endoderm*

PIB – Produto Interno Bruto

PIV – Produção *in vitro*

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

POU5F1 (OCT4) – POU Class 5 Homeobox 1

PVP – Polivinilpirrolidona

Px330-Cas9 – Plasmídeo Px330 associado à Cas9

REV – *Reverse*

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA_m – Ácido Ribonucleico mensageiro

RS -1 - (3-N-benzilsulfamoil) – 4 - 97 bromo – N – (4 – bromofenil) benzamida)

SDS – *sodium dodecyl sulfate*

SFB – Soro Fetal Bovino

SOF – Fluido de Oviduto Sintético, do inglês *synthetic oviduct fluid*

SOX17 – SRY-box transcription factor 17

SOX2 – SRY-box transcription factor 2

SP6 – promotor procariótico SP6

Taq – *Thermus aquaticus*

TE – Trofectoderma

TN – Transferência de Núcleo

TRIS – tris hidroximetil aminometano

UI – Unidade Internacional

Nomenclaturas para Bovinos e Humanos:

Gene – Maiúsculo e itálico

Proteína – Maiúsculo

Nomenclaturas para camundongos:

Gene – Minúsculo e itálico

Proteína - Maiúsculo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	CAPÍTULO I – Efeitos da remoção de Soro Fetal Bovino na alocação de células de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i>	27
2.1	Introdução	28
2.2	Material e Métodos	30
2.2.1	Declaração ética	30
2.2.2	Delineamento Experimental	30
2.2.3	Maturação e Fertilização <i>in vitro</i>	31
2.2.4	Cultivo <i>in vitro</i>	32
2.2.5	Tratamentos visando a remoção de Soro Fetal Bovino.....	32
2.2.6	Análises de características metabólicas dos embriões	33
2.2.7	Imunofluorescência e Contagem de células	33
2.2.8	Análise estatística.....	34
2.3	Resultados	34
2.3.1	Análise das taxas de formação de blastocisto e desenvolvimento	34
2.3.2	Análise da atividade metabólica	35
2.3.3	Contagem diferencial de células	36
2.4	Discussão	38
2.5	Conclusão.....	40
3	CAPÍTULO II – Inserção de gene repórter fluorescente em região gênica de <i>SOX2</i>	41
3.1	Introdução	41
3.2	Hipótese	43
3.3	Objetivos	44
3.4	Material e Métodos	44
3.4.1	Local do Experimento	44
3.4.2	Delineamento experimental	44
3.4.3	Construção do RNA guia para <i>SOX2</i>	45
3.4.4	Digestão enzimática de plasmídeo.....	46
3.4.5	Reação de Anelamento	46
3.4.6	Reação de Fosforilação.....	46

3.4.7	Reação de Ligação	47
3.4.8	Transformação de Bactérias Competentes	47
3.4.9	Construção de Sequência para Recombinação Homóloga	49
3.4.10	Lipofecção de plasmídeo em fibroblasto.....	53
3.4.11	Detecção da mutação.....	53
3.4.12	Amplificação do Vetor com Biotina	Erro! Indicador não definido. 55
3.4.13	Transcrição do RNA guia para o gene SOX2.....	55
3.4.14	Preparação da enzima Cas9 conjugada com estreptavidina	56
3.4.15	Microinjeções Embrionárias.....	57
3.4.16	Microscopia de Epifluorescência e Confocal	58
3.4.17	Extração de DNA	59
3.4.18	Genotipagem	59
3.4.19	Imunofluorescência	62
3.4.20	Transfecção de DNA em Células-Tronco Embrionárias.....	63
3.5	RESULTADOS	65
3.5.1	Microinjeção embrionária com 75ng/μl de mRNA para Cas9-mSA, 50ng/μl de gRNA e 20ng/μl de sequência doadora	65
3.5.2	Microinjeção embrionária com 75ng/μl de mRNA para Cas9-mSA, 50ng/μl de gRNA e 50ng/μl de sequência doadora.....	66
3.5.3	Microinjeção embrionária com 75ng/μl de mRNA para Cas9-mSA, 50ng/μl de gRNA e 100ng/μl de sequência doadora.....	67
3.5.4	Microinjeção embrionária com 100ng/μl de mRNA para Cas9-mSA, 100ng/μl de gRNA e 100ng/μl de sequência doadora.....	68
3.5.5	Genotipagem	69
3.5.6	Imunofluorescência	70
3.5.7	Transfecção de DNA em Células-Tronco Embrionárias	71
3.6	DISCUSSÃO	71
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
5	REFERÊNCIAS	77
	ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira tem evoluído de forma constante, demonstrando o importante papel do país na produção de alimentos. Por isso, pesquisadores têm buscado desenvolver e aprimorar tecnologias relacionadas à produção e reprodução animal, visando alavancar de forma sólida este segmento que gera renda, divisas e riquezas ao país. O setor agropecuário representou 26,6% do PIB brasileiro em 2020, ano marcado pela grave pandemia que assolou o mundo, demonstrando a estabilidade desta cadeia (Cepea, 2021).

Grande parte destes avanços são fruto da difusão das diferentes biotécnicas da reprodução que contribuem em grande parte para o desenvolvimento da cadeia pecuária nacional. O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores de embriões *in vitro* do mundo, pelo domínio da técnica e também pela qualidade genética do seu rebanho (da Silva, 2015). Segundo Viana (2021), é o segundo país que mais transfere embriões produzidos *in vitro* (PIV) no mundo, com mais de 300.000 transferências realizadas no ano de 2019. No entanto, ainda assim, a taxa de prenhez de embriões PIVE é reportada como menos eficiente que a taxa de embriões colhidos *in vivo*, (de Sousa et al., 2017; Pontes et al., 2009).

Um dos aspectos que pode influenciar esses resultados discrepantes é a alocação das células nos diferentes tipos celulares do embrião: células da massa interna celular (MCI), que em sua maioria se tornam o indivíduo, e células do trofotoderma (TE), que se tornam a placenta (Cockburn e Rossant, 2010). Sabe-se que embriões produzidos *in vitro* por diferentes técnicas tem diferentes números de células da MCI, TE e inclusive células totais (Koo et al. 2002, Ushijima et al. 2008). Isto sugere influência do sistema de produção na diferenciação celular embrionária.

Novas ferramentas como a edição gênica permitem o estudo de mecanismos biológicos relacionados a sequências genéticas específicas, e podem ser empregadas visando o incremento dos índices zootécnicos e o melhoramento genético de rebanhos (Filho et al., 2002). Foi neste cenário que, nos últimos anos, o sistema CRISPR/Cas9 surgiu como uma importante ferramenta de edição gênica (Cong et al., 2013) e conforme os estudos a respeito do uso e do aprimoramento da

técnicas vão sendo realizados, mais aplicações vão surgindo, trazendo novos conceitos e possibilidades para o melhoramento genético animal (Costa et al., 2021).

No entanto, em sua maioria os estudos que abordam as modificações no genoma ficam restritos ao modelo murino, deixando a pesquisa da produção agropecuária desprovida de modelos de deleção genética do tipo *knock-out* ou de inserção genética do tipo *knock-in* para o estudo aprofundado de diferentes processos envolvidos na produção animal (Lamas-Toranzo et al., 2018). Além disso, sabe-se que o modelo bovino possui semelhança com a espécie humana e isso reforça a ideia de que o embrião bovino possa ser um excelente modelo para o desenvolvimento humano inicial (Berg et al. 2011).

Neste contexto, a utilização de modelos *knock-in* permitiria compreensão dos aspectos básicos da formação do embrião bovino e poderia inclusive prover informações para a melhoria dos sistemas de produção de embriões in vitro (PIVE), como entender a primeira diferenciação celular entre a MCI e o TE. Ainda, modelos *knock-in* poderiam ser uma boa alternativa para a limitação da avaliação da dinâmica da diferenciação celular, que ainda necessita da inviabilização dos embriões para análises de expressão gênica ou detecção de proteínas por imunofluorescência.

Sendo assim, esta dissertação teve como objetivo geral aprimorar técnicas para o estudo da diferenciação celular em embriões bovinos produzidos in vitro. Como objetivos específicos, buscamos testar a influência da adição de soro fetal bovino no meio de cultivo embrionário na alocação das células da MCI e do TE, além da criação de um modelo *knock-in* em embrião bovino através da combinação da maquinaria do sistema CRISPR/Cas9 com o mecanismo de reparo de DNA através de recombinação homóloga (HR).

2. Capítulo I – Efeitos da remoção de soro fetal bovino na alocação de células de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Felipe Eduardo Luedke, Caroline Pereira da Costa, Camilla Mota Mendes, Thais Rose dos Santos Hamilton, Marcella Pecora Milazzotto, Mayra E. O. A. Assumpção, Marcelo Demarchi Goissis

Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP; Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André -SP

Resumo

A suplementação de meios de cultivo embrionários com soro fetal bovino (SFB) torna esses meios indefinidos. Isso pode mascarar resultados de estudos de diferenciação celular que são influenciados pelo metabolismo de glicose, assim como por fatores de crescimento presentes no SFB. Neste estudo a hipótese testada foi que a remoção do SFB durante o cultivo *in vitro* (CIV) não reduz as taxas de desenvolvimento, porém altera a diferenciação celular no desenvolvimento embrionário inicial bovino. Foram produzidos embriões bovinos *in vitro* e distribuídos, 90 horas pós-inseminação (90hpi), aleatoriamente nos seguintes grupos: grupo KSOM-SFB, no qual foram suplementados com 5% (v/v) de SFB (ThermoFisher), Grupo KSOM-33, renovação de 33% do volume de meio, e grupo KSOM-Zero, no qual não houve suplementação com SFB e nem renovação do meio de cultivo. Os resultados evidenciaram que a taxa de blastocisto (blastocisto/oócitos) às 210hpi do grupo KSOM-SFB ($33.61 \pm 2,85\%$) foi maior ($p=0.02$) que do grupo KSOM-Zero ($21.57 \pm 2.85\%$), no entanto não foi diferente do grupo KSOM-33. Não houve mudanças significativas nos aspectos relacionados ao metabolismo, como intensidades de fluorescência de CellROX Green e MitoTracker Red ou NADH e FAD +. A análise de imunofluorescência de CDX2 revelou que a ausência de qualquer suplementação reduziu o número de células do trofotoderma (TE) e de células totais. A análise de imunofluorescência de SOX17 não revelou quaisquer diferenças no número de células do endoderma primitivo. Assim, conclui-se que a ausência de SFB reduziu as taxas de blastocisto, porém isso não foi observado

quando houve uma renovação do volume de 33% do meio em 90hpi. Conclui-se também que a remoção de SFB alterou a alocação de células TE durante o desenvolvimento inicial do embrião bovino, embora não tenha influenciado o número de células PE.

2.1. Introdução

Dados recentes apresentados pelo IETS revelam que mais de 700 000 embriões produzidos in vitro (PIV) foram transferidos em todo o mundo anualmente. A combinação de PIV com seleção genômica e sêmen sexado tem se mostrado bem-sucedida no campo comercial em diversos países, ajudando profissionais e produtores de gado a melhorar o desempenho reprodutivo, a eficiência e o ganho genético de seus rebanhos (Ferré et al., 2020).

No entanto, apenas entre 40 e 50% dos oócitos maturados e fertilizados in vitro atingem o estágio de blastocisto (Rizos et al., 2002) e a taxa de prenhez pode ser menor do que a de embriões produzidos in vivo (de Sousa et al., 2017). A suplementação com Soro Bovino Fetal (SFB) é eficaz na manutenção e desenvolvimento de embriões bovinos (Gordon, 2003; Saeki et al., 1991). No entanto, está relacionado a efeitos embrionários deletérios (Farin et al., 2004), como alterações na compactação e blastulação, aumento da incidência de natimortos e mortalidade após o nascimento (Abe et al., 1999), aumento da incidência de síndrome do bezerro gigante (Farin et al., 2004; Jacobsen et al., 2000; van Wagtenonk-de Leeuw et al., 2000), baixa repetibilidade devido às variações entre os lotes (Stringfellow et al., 2004) e menores taxas de recuperação de embriões criopreservados após o descongelamento (Gómez et al., 2008).

O Cultivo in vitro de zigotos sem a adição de SFB resultou em embriões de desenvolvimento mais lento, que por sua vez apresentaram mórulas de qualidade superior e os bezerros tiveram peso ao nascer significativamente menor e um processo de parto significativamente mais fácil em comparação com bezerros derivados de PIV com a adição de SFB (van Wagtenonk de Leeuw et al., 2000).

Esses estudos levaram à busca de alternativas para substituir o SFB por compostos que não interferissem negativamente na qualidade embrionária (Mesalam et al., 2017). Sabe-se que diferentes meios de cultivo influenciam no metabolismo e produção de blastocistos (Krisner et al., 1999) e que o SFB possui

glicose, que é um fator limitante de crescimento quando em baixa concentração, que já é adicionado ao meio de cultivo de diferentes espécies de mamíferos (Barnett e Bavister, 1996).

Nos estágios iniciais de desenvolvimento, o consumo e o metabolismo da glicose são baixos, embora alguma glicose seja necessária para fins de sinalização intracelular (Martin e Leese, 1995), mas esse consumo aumenta nos estágios de mórula e blastocisto (Thompson, 2000). Após a formação de blastocele, o embrião muda de uma célula relativamente inativa metabolicamente na ovulação, para um tecido de metabolização rápida na implantação (Leese, 2012).

Duas linhagens celulares distintas constituem o blastocisto, em que cerca de dois terços das células constituem o trofotoderma (TE) e o restante compreende a massa celular interna (MCI). A MCI é responsável por dar origem ao próprio embrião, enquanto as células TE darão origem a linhagens extraembrionárias, incluindo a placenta (Frankenberg et al., 2016). Foi demonstrado que a redução do número de células TE pode levar à placentação insuficiente e, conseqüentemente, a perdas embrionárias (Koo et al., 2002).

Em blastocistos murinos, as células TE são identificadas como mais ativas metabolicamente do que as da MCI no que se refere ao consumo de oxigênio, produção de lactato e ATP (Houghton, 2006). No entanto em bovinos há um contraste, as células isoladas de TE consumiram níveis mais elevados de piruvato e produziram lactato, enquanto as células isoladas da MCI consumiram mais glicose (Gopichandran e Leese, 2003). Recentemente, foi demonstrado que a glicose desempenha um papel decisivo na especificação do trofotoderma em embriões murinos por meio da ativação de *Cdx2*, contribuindo para a diferenciação durante a transição de mórula para blastocisto (Chi et al., 2020). Além disso, sabe-se que o fator de crescimento de fibroblasto 4 (FGF4) é o sinal de especificação principal durante a segunda diferenciação celular entre o endoderma primitivo (PE) e o epiblasto (EPI) no blastocisto murino (Frankenberg et al., 2011; Kang et al., 2013; Néstor Saiz et al., 2016; Yamanaka et al., 2010). Como o SFB não é um suplemento definido, pode conter fatores de crescimento como o FGF4, atuando na diferenciação do PE.

Assim, SFB poderia causar distorções e resultados de viés em estudos sobre diferenciação celular precoce. Para verificar os impactos do SFB na diferenciação celular durante o desenvolvimento de embriões bovinos, hipotetizamos que a

suplementação com SFB durante o cultivo in vitro interfere na diferenciação celular no desenvolvimento inicial do embrião bovino, aumentando o número de células TE e PE. Portanto, o objetivo principal deste estudo foi avaliar o efeito do soro fetal bovino no desenvolvimento embrionário in vitro, nos aspectos metabólicos que podem influenciar na diferenciação celular e no número de células de blastocistos bovinos, utilizando marcadores específicos de linhagens celulares.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Declaração ética

Este estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética para Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o protocolo nº 7375181217.

2.2.2. Delineamento experimental

Embriões bovinos produzidos in vitro foram distribuídos aleatoriamente em três grupos durante o cultivo in vitro (CIV) para verificar os efeitos da remoção do soro fetal bovino. Todos os grupos foram cultivados em meio KSOM suplementado com 3 mg/ml de albumina sérica bovino (BSA) até 90 horas pós-inseminação (90hpi). Neste momento, o primeiro grupo (denominado KSOM-SFB) foi suplementado com 5% (v/v) de SFB a 90hpi, o segundo grupo (denominado KSOM-33) não foi suplementado com SFB, mas teve 33% do volume do meio removido e renovado. E no terceiro grupo experimental (denominado KSOM-Zero) não houve suplementação com SFB ou renovação do meio de cultivo. As taxas de blastocisto (blastocistos/oócitos totais) e o desenvolvimento embrionário (blastocistos/número de estruturas clivadas) foram avaliadas ao final do CIV (210hpi) em 8 repetições. Em duas repetições, alguns embriões foram coletados a 186hpi para análise da diferenciação de TE. Os embriões foram corados com CellROX (ThermoFisher) ou MitoTracker Red (ThermoFisher) ou submetidos à medição de NADH e FAD + (n = 8 embriões por grupo). Além disso, os embriões foram fixados para realizar imunofluorescência de proteínas relacionadas à diferenciação embrionária inicial como CDX2, um marcador de células trofotoderma (n = 13, 10 e 8 embriões de

186hpi para os grupos KSOM-SFB, KSOM33 e KSOM-Zero, respectivamente) e SOX17, um marcador de células do PE (n = 9, 12 e 15 embriões de 210hpi para os grupos KSOM-SFB, KSOM33 e KSOM-Zero, respectivamente).

2.2.3. *Maturação e fertilização in vitro*

Os complexos *cumulus-oophorus* foram obtidos por aspiração folicular de ovários oriundos de abatedouro comercial. Oócitos grau I foram selecionados com base no número de células circundantes e homogeneidade citoplasmática. As estruturas foram lavadas em meio HECM-Hepes (HH) (Bavister et al., 1983) e a maturação foi realizada em meio MIV composto por meio 199 (Gibco, Thermo-Fisher, Waltham, MA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco), 22 µg/ml de piruvato de sódio, 50 µg/ml de gentamicina, 0,5 µg/ml de FSH Folltropin-V (Vetrepharm, Inc. Belleville, ON, Canadá), 50 µg/ml de hCG (Vetecor Laboratories, Callier, Espanha) e 1 µg/ml de estradiol. Os oócitos foram colocados em gotas de 90 µl de meio MIV que foram mantidas em óleo mineral filtrado por 22 horas a 38,5° C, em 5% de CO₂ e alta umidade. Após a maturação, os oócitos foram lavados em HH e transferidos para gotas de 90 µl de meio FIV (Fert-TALP - PARRISH et al., 1988) contendo 20 µg/ml de heparina sob óleo. A fertilização ocorreu com espermatozoides descongelados por 30 segundos a 37°C e separados em um gradiente de Percoll 90/45% (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), diluído em meio FIV, após centrifugação a 6600 x g por 5 minutos. O sedimento de espermatozoides formado no fundo do tubo foi então lavado em meio FIV por centrifugação a 1100 x g 3 min. Antes da inseminação, a motilidade foi avaliada por microscopia óptica e a concentração de espermatozoides em hematocítmetro. A concentração foi ajustada para a obtenção de uma concentração final de 1x10⁶ espermatozoides por ml nas gotículas de FIV. As gotas foram inseminadas e os gametas co-incubados por 18 horas a 38,5°C, em 5% de CO₂ e alta umidade. Foram utilizadas palhetas de sêmen do mesmo touro e mesmo lote durante todo o experimento.

2.2.4. Cultivo *in vitro*

Após 18 horas de FIV, os presumíveis zigotos foram removidos da placa de FIV, lavados em meio HH, agitados em vórtex por três minutos para remover o excesso de células do *cumulus* e distribuídos aleatoriamente em grupos de 20 em gotas de 90 µl de meio de cultivo. O meio de cultivo utilizado foi KSOM (Behringer et al., 2003) suplementado com 3mg/ml de albumina sérica bovina (BSA), 1% (v/v) de aminoácidos essenciais, 2% (v/v) de aminoácidos não essenciais e 1µl de gentamicina. Os embriões foram cultivados em incubadora a 38,5° C, com 5% de CO₂, 5% de O₂ e alta umidade.

2.2.5. Tratamentos visando a remoção de SFB

Os embriões foram alocados nos diferentes grupos experimentais 90 horas após a inseminação (90hpi), o grupo KSOM-SFB foi então suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (ThermoFisher). No grupo KSOM-33, 33% do o volume do meio foi removido e, em seguida, este volume foi substituído por meio fresco e o grupo KSOM-Zero permaneceu sem manipulação durante todo o cultivo. Os embriões foram coletados em 186hpi para a coloração das células do trofotodermas ou 210hpi para todas as outras análises, incluindo taxas de blastocisto (blastocistos/oócitos totais) e desenvolvimento embrionário (blastocistos /número de estruturas clivadas).

2.2.6. Análises de características metabólicas dos embriões

Às 210hpi os embriões foram colhidos para avaliação do estresse oxidativo intracelular usando a sonda fluorescente CellRox (Thermo Fisher) e o potencial de membrana mitocondrial foi observado usando MitoTracker Red (Thermo Fisher). Os blastocistos foram corados com 2,5 mM CellROX Green (ThermoFisher) e 1 mM MitoTracker Red (ThermoFisher) por 30 minutos em meio KSOM em incubadora a 38,5°C, 5% CO₂, 5% O₂ e alta umidade (n = 8 blastocistos por grupo). Os blastocistos foram então fixados em paraformaldeído 4% por 20 minutos e visualizados em microscópio de epifluorescência.

A atividade dos agentes oxidantes NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) e FAD⁺ (Flavina Adenina Dinucleotídeo) foi medida (n = 8 embriões por grupo) em um microscópio de epifluorescência por excitação com 360 nm e 488 nm, respectivamente (Dumollard et al., 2007). As imagens foram obtidas com o software CellSens Dimension (Olympus Corporation, Tóquio, Japão) usando a função Z-stack, obtendo imagens a cada 10µm. A intensidade da fluorescência foi medida usando o software Image J (NIH) em imagens com projeção de intensidade máxima gerada pelo CellSens Dimension. A intensidade da fluorescência foi corrigida por uma abordagem de duas etapas em que subtraímos a média de dois valores de fundo e ajustamos o decaimento da fluorescência ao longo do eixo Z, conforme descrito anteriormente (Nestor Saiz et al., 2016).

2.2.7. Imunofluorescência e contagem de células

Protocolos de imunofluorescência foram realizados em embriões dos diferentes grupos, a fim de verificar se a remoção de SFB alterou a alocação celular relacionada à diferenciação celular precoce. Os embriões tiveram sua zona pelúcida removida por incubação por 2 minutos em 0,5% de protease em PBS (p/v) e foram fixados com paraformaldeído 4% por 20 minutos em temperatura ambiente, seguido por três lavagens em solução salina tamponada com fosfato com 1 mg/ml de polivinilpirrolidona (PBS-PVP) e armazenado a 4°C até o momento do uso.

Os embriões foram permeabilizados usando solução de 0,5% Triton X-100 em PBS-PVP por 15 min e então colocados por uma hora em temperatura ambiente em solução de bloqueio contendo 0,1% Triton X-100, 1% de albumina sérica bovina (BSA) e 10% soro fetal de jumento em PBS-PVP. A incubação com o anticorpo primário ocorreu sob agitação suave a 4°C por 16h. Os anticorpos primários usados foram anti-Cdx2 de coelho (1:50, ab88129, Abcam, Cambridge, MA, EUA) e anti-SOX17 de cabra (1: 100, AF1924, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA) diluído em uma solução de 0,1% Triton X-100 e 1% BSA em PBS/ PVP. Os embriões foram então lavados três vezes por 15 minutos em uma solução de lavagem contendo 0,1% de Triton X-100 em PBS-PVP e incubados por 1 hora em temperatura ambiente no escuro com anticorpo secundário *donkey anti-rabbit* NL493 (1:100, NL006, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) ou NL557 *donkey anti-goat* (1:100, NL001, R&D Systems) diluído em uma solução de 0,1% Triton X-100 e 1% BSA em

PBS/PVP. Após esta incubação com o anticorpo secundário, os embriões foram lavados em solução de lavagem três vezes por 15 minutos em um ambiente escuro, incubados com Hoescht 33342 por 10 minutos e montados em lâminas. Os embriões foram então analisados com um microscópio de fluorescência e as imagens foram obtidas com o software CellSens Dimension (Olympus Corporation, Tóquio, Japão). Usando o mesmo software, células do trofotoderma, marcadas com anticorpo anti-CDX2, ou células PE, marcadas com anticorpo anti-SOX17, e células embrionárias totais marcadas com Hoescht, foram contadas.

2.2.8. Análise Estatística

Os dados foram analisados por ANOVA, considerando a replicata como uma variável aleatória, tratamento como variável independente e taxas, intensidade de fluorescência e número de células como variáveis dependentes usando PROC GLM do SAS 9.4. A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram testadas usando PROC UNIVARIATE e Guided Data Analysis do SAS. Os dados foram transformados quando necessário e transformados de volta para apresentação. A comparação das médias foi realizada pelo teste de *Tukey*. O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

2.3. Resultados

2.3.1. Análise das Taxas de formação de Blastocisto e Desenvolvimento

Entre os três grupos, o grupo KSOM-SFB ($33,61 \pm 2,85\%$) apresentou a maior taxa de formação de blastocisto ($n = 8$ repetições), mas não diferiu estatisticamente ($P = 0.85$) do grupo KSOM-33 ($31,48 \pm 2,85\%$). Os resultados mostraram que a taxa de blastocisto no grupo KSOM-SFB foi maior ($p = 0.02$) do que no grupo KSOM-Zero ($21,57 \pm 2,85\%$), a qual não diferiu estatisticamente ($p = 0.06$) do grupo KSOM-33 (Gráfico1A).

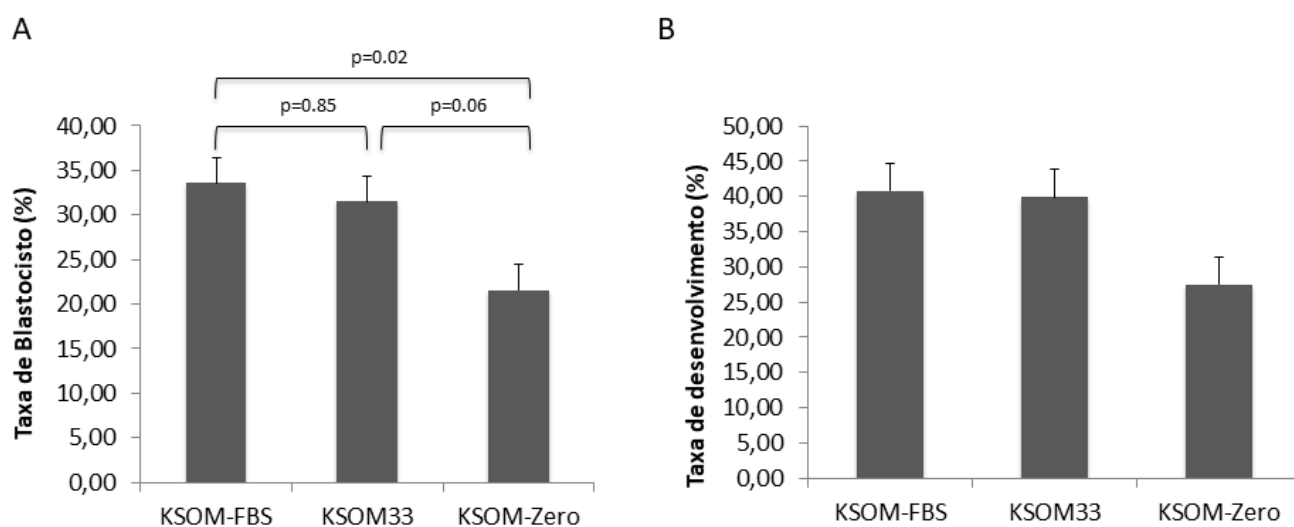


Gráfico 1. **A.** Taxas de produção de blastocistos (blastocisto/estruturas totais) produzidos in vitro dos três diferentes grupos avaliados às 210 hpi. **B.** Taxa de desenvolvimento (blastocisto/clivados) avaliada entre os três diferentes grupos às 210 hpi.

A taxa de desenvolvimento ($n = 8$ repetições) não foi diferente quando os grupos KSOM-SFB ($40,79 \pm 3,94\%$, $p = 0,07$) ou KSOM-33 ($39,93 \pm 3,94\%$, $p = 0,09$) foram comparados ao grupo KSOM-Zero ($27,45 \pm 3,94\%$). Da mesma forma, não houve diferença estatística significativa entre o grupo KSOM-SFB e o grupo KSOM-33 ($P = 0,98$, Gráfico 1B).

2.3.2. Análise da atividade metabólica

Não houve diferença significativa na produção de espécies reativas de oxigênio EROs e também não houve diferença estatística em relação à atividade mitocondrial dos embriões analisados dos diferentes grupos ($n = 8$ embriões por grupo), conforme verificado com as intensidades de fluorescência de CellROX Green e MitoTracker Red, respectivamente (Gráfico 2A).

Os resultados também não mostraram diferenças estatísticas na produção de energia celular nos 3 diferentes grupos ($n = 8$ embriões por grupo), demonstrado pela ausência de diferença estatística da autofluorescência para NADH e FAD+ nos grupos testados (Gráfico 2B).

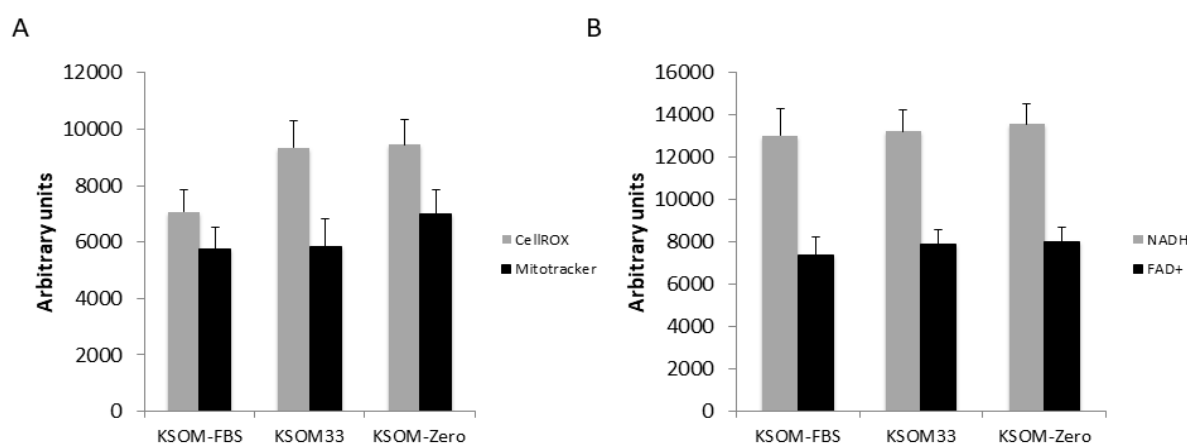


Gráfico 2. Avaliação de características relacionadas ao metabolismo energético **A.** Avaliação do estresse oxidativo com CellROX Green e do potencial de membrana mitocondrial com Mitotracker RED. **B.** Avaliação da atividade dos agentes oxidantes NADH e FADH.

2.3.3. Contagem diferencial de células

Os embriões foram coletados às 186hpi e corados para CDX2 (figura 1A) para determinar TE, MCI e número total de células. Os grupos KSOM-SFB e KSOM-33 apresentaram maior número de células TE e número total de células do que o grupo KSOM-Zero (Tabela 1). Não foram observadas diferenças no número de células da MCI ou na proporção de células TE/total (Tabela 1).

Tabela 1 - Contagem de células positivas para CDX2 (TE), células negativas para CDX2 (ICM), células totais após imunocoloração de blastocistos de 186hpi.

	Células CDX2-positivas (TE)	Células CDX2-negativas (ICM)	Células totais	Taxa (TE/total células)
KSOM-SFB	133.77 ± 10.85 ^b	75.08 ± 9.56 ^a	208.85 ± 18.90 ^b	0.66 ± 0.02 ^a
KSOM33	131.91 ± 11.79 ^b	84.91 ± 10.39 ^a	216.82 ± 20.54 ^b	0.60 ± 0.02 ^a
KSOM-Zero	77.63 ± 13.83 ^a	50.88 ± 12.19 ^a	128.50 ± 24.09 ^a	0.61 ± 0.02 ^a

Legenda. Letras sobrescritas diferentes dentro das colunas indicam diferença estatística significativa (P < 0,05). n = 13, 10 e 8 para os grupos KSOM-SFB, KSOM33 e KSOM-Zero, respectivamente.

Em seguida, analisamos a diferenciação de PE por meio da imunomarcção de SOX17 em blastocistos às 210hpi (figura 1B). Surpreendentemente, não foram observadas diferenças em relação ao número de células positivas para SOX17, células totais ou a proporção entre células SOX17-positivas e células totais (Tabela 2).

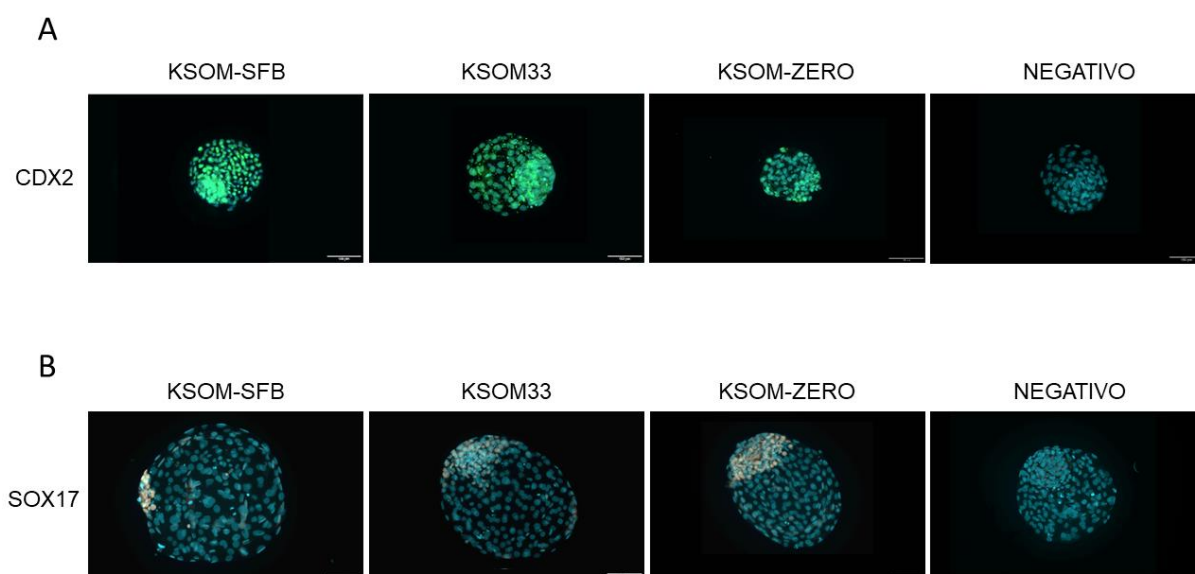


Figura 1. **A.** Embriões bovinos produzidos in vitro, colhidos às 186 hpi e submetidos à imunofluorescência com anticorpo primário anti-CDX2 nos diferentes grupos, nota-se marcação evidentes nas células do trofocotoderma. **B.** Embriões bovinos produzidos in vitro, colhidos às 210 hpi e submetidos à técnica de imunofluorescência com anticorpo anti-SOX17, nos três grupos há a presença de marcação evidente nas células do Endoderma primitivo.

Tabela 2 - Contagem de células positivas para SOX17 e células totais após imunomarcção de blastocistos de 210 hpi.

	Células SOX17-positivas (PE)	Total células	Taxa (SOX17/total células)
KSOM-SFB	13.64 ± 7.38	205.66 ± 29.82	0.08 ± 0.02
KSOM33	31.13 ± 6.39	272.00 ± 25.82	0.12 ± 0.02
KSOM-Zero	27.72 ± 5.73	289.46 ± 23.10	0.14 ± 0.02

Legenda. Contagem diferencial de células imunomarcadas para SOX17. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos nas variáveis observadas. n = 9, 12 e 15 para os grupos KSOM-SFB, KSOM33 e KSOM-Zero, respectivamente.

2.4. Discussão

Este estudo avaliou o desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* com suplementação ou ausência de SFB durante o cultivo embrionário. O primeiro objetivo foi verificar se a ausência de SFB reduziria as taxas de blastocisto e de desenvolvimento em nossas condições. O objetivo principal deste estudo foi avaliar se o SFB adicionado ao meio de cultivo teria consequências na diferenciação celular devido a alterações no metabolismo energético ou pela presença de fatores de crescimento presentes no soro.

Foram definidos três grupos experimentais: suplementação de 5% (v/v) com SFB (grupo KSOM-SFB), remoção e renovação de 33% do volume do meio (KSOM-33) ou sem suplementação (KSOM-Zero) às 90hpi. Os valores observados para a taxa de blastocisto mostraram que a remoção do SFB reduziu as taxas de blastocisto e de desenvolvimento, porém isso não foi observado quando houve uma renovação de 33% do meio às 90hpi. Semelhante aos nossos resultados, embriões cultivados em fluido de oviduto sintético (SOF) na ausência de SFB apresentaram formação reduzida de blastocisto (Van Langendonck et al., 1997). Curiosamente, o uso de duas suplementações de meio em 66hpi e 138hpi do CIV usando SOF sem SFB reduziu as taxas de blastocisto (Gómez et al., 2008). A possível razão para essa discrepância em comparação com nossos resultados usando 33% de suplementação de KSOM é a falta de glicose no meio SOF (Takahashi e First, 1992).

A adição de SFB ou reposição de KSOM não teve impacto nas variáveis metabólicas observadas, o que poderia ser reflexo de uma concentração de glicose semelhante entre essas duas condições, uma vez que a concentração de glicose em KSOM é 0,2mM (Behringer et al., 2003) e em 5% de SFB é 0,6 mM (de Lima et al., 2020). Curiosamente, foi recentemente demonstrado em embriões de camundongos que a glicose não é necessária para a produção de energia mitocondrial e seria direcionada para a via biossintética da hexosamina ou via da pentose fosfato (Chi et al., 2020), o que também poderia explicar os resultados observados.

Os resultados da contagem de células mostraram que a suplementação às 90hpi com SFB ou meio aumentou o número total de células quando comparada à falta de suplementação. Corroborando nossos achados, uma maior quantidade de

células totais foi encontrada nos blastocistos D7 quando estes foram cultivados com soro ou BSA quando comparados aos meios não suplementados (Lazzari et al., 2002). O maior número total de células nesses grupos pode estar relacionado ao aumento da atividade da via da pentose fosfato, que gera a ribose para a síntese de DNA. Este aumento no número total de células também pode estar refletindo o aumento observado no número de células TE dentro desses mesmos grupos. O aumento da proliferação dessas células pode ser devido à renovação de glicose e aminoácidos no meio, uma vez que foi demonstrado que glicose e aminoácidos aumentam a proliferação de trofoblastos suínos e ovinos in vitro por meio da ativação da via mTOR (Kim et al., 2011, 2012) que mostrou ser ativada pela glicose em embriões de camundongo (Chi et al., 2020).

No entanto, é importante afirmar que o metabolismo de TE e MCI são quase opostos quando se comparam embriões de camundongo e bovinos. Células do TE isoladas de blastocistos de camundongos apresentaram menor consumo de glicose e piruvato, bem como produção de lactato, quando comparadas às células da MCI (Hewitson e Leese, 1993). Por outro lado, quando o TE foi comparado à MCI em bovinos, foi possível identificar o maior consumo de piruvato e produção de lactato, sugerindo uma maior atividade das vias oxidativa e glicolítica (Gopichandran e Leese, 2003). Assim, este último pode ter sido substancialmente prejudicado pela menor disponibilidade de glicose no meio de cultivo do grupo KSOM-Zero, com impacto mais evidente nas células TE.

Curiosamente, embora as células TE estivessem aumentadas e o número de células MCI não fosse estatisticamente diferente, a razão de TE: células totais não foi diferente. Isso é semelhante ao que foi observado em um estudo recente que comparou meios sequenciais com concentrações reduzidas de glicose e aminoácidos (Santos et al., 2021). Curiosamente, neste referido estudo, os meios que continham menores concentrações de glicose apresentaram mais células totais e TE.

Inesperadamente, a suplementação de SFB não aumentou o número de células PE conforme observado pela coloração de SOX17. No camundongo, a sinalização de FGF4 através da via ERK é a principal responsável pela especificação de PE (Kang et al., 2013; Yamanaka et al., 2010) e resultados semelhantes foram observados em bovinos (Canizo et al., 2019; Kuijk et al., 2012). Como o SFB pode conter fatores de crescimento, o FGF4 pode ser um desses

fatores e pode ter influenciado a diferenciação de PE. No entanto, o FGF4 requer sulfato de heparana endógeno para a sinalização adequada (Lanner et al., 2010), e a heparina é frequentemente suplementada junto com FGF4 em tratamentos exógenos (Kang et al., 2013; Yamanaka et al., 2010). Portanto, se um excesso de FGF estava presente após a suplementação de SFB, a falta de um excesso de sulfato de heparana ou heparina pode não ter levado a sinalização de FGF4.

2.5. Conclusão

Os resultados deste estudo confirmam que é possível produzir blastocistos bovinos em meio KSOM sem o uso de SFB, desde que seja realizada a retirada e posterior renovação de 33% do volume do meio de cultivo às 90hpi. Observou-se também que a retirada do SFB não alterou as variáveis metabólicas estudadas, mas o número total e o número de células TE foram reduzidos quando nenhuma suplementação foi adicionada às 96hpi. Em conclusão, o SFB não aumentou o número de células TE ou PE conforme a hipótese, mas a ausência de suplementação aos embriões influenciou negativamente o número total de células ou células alocadas para o TE.

3. CAPÍTULO II – INSERÇÃO DE GENE REPÓRTER FLUORESCENTE EM REGIÃO GÊNICA DE SOX2

3.1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo país que mais transfere embriões produzidos *in vitro* (PIV) no mundo, com mais de 300.000 transferências em 2019 (Viana, 2021). Entretanto, a taxa de prenhez de embriões PIV é reportada como menos eficiente que a taxa de embriões coletados *in vivo*, variando respectivamente entre 22-33% *versus* 41-55% (de Sousa et al., 2017; Pontes et al., 2009). Desde 2006, vem sendo registrado um crescimento médio de 28% no número de embriões PIV produzidos no Brasil e uma diminuição de 73% na produção de embriões *in vivo*, o que corrobora com os estudos realizados para o aprimoramento das etapas realizadas no processo de PIV (Lustosa et al., 2018).

Expressivas variações no número de células do trofotoderma e da massa celular interna foram encontradas em embriões produzidos através de transferência de núcleo de células somáticas (TN), produzidos através de fertilização *in vitro* (FIV) e produzidos *in vivo*. Em geral, a razão média entre células da MCI e células totais para blastocistos bovinos produzidos *in vitro* ou *in vivo* variam de 20% a 40%, enquanto que nas células do TE essa relação fica próxima dos 60%. Incoerências nestes percentuais podem levar à anormalidades no desenvolvimento do embrião e à placentação insuficiente, podendo resultar em perdas embrionárias e fetais (Koo et al., 2002). O estudo e o entendimento dos processos de formação iniciais do embrião podem elucidar os diferentes eventos que ocorrem no momento da diferenciação entre massa celular interna (MCI) e trofotoderma (TE) e consequentemente podem contribuir para a melhoria dos protocolos utilizados na produção *in vitro* de embriões (PIVE).

O gene *POU5F1* (*OCT4*) é um marcador da MCI em camundongos, é um fator de transcrição e um regulador da pluripotência celular (Pesce and Scholer, 2000). A deleção de *POU5F1* em embriões bovinos com a utilização de CRISPR/Cas9 não impediu a formação de blastocistos, mas reduziu sua expansão (Daigneault et al., 2018). Ainda, a ausência de *POU5F1* não alterou a expressão do gene *SOX2* mas interferiu com a expressão de *CDX2* (Daigneault et al., 2018), respectivamente fatores de transcrição característicos da MCI (Goissis e Cibelli,

2014a) e do TE (Goissis e Cibelli, 2014b) em embriões bovinos. Isto ocorre de maneira similar à deleção de *OCT4* em embriões humanos, no qual houve redução na expansão dos blastocistos e redução na expressão de genes ligados ao TE como *GATA2*. Curiosamente, em células-tronco humanas não houve alteração na expressão de *SOX2* com a deleção de *OCT4* (Fogarty et al. 2017). Essa semelhança entre bovinos e humanos reforça a ideia de que o embrião bovino possa ser um excelente modelo para o desenvolvimento humano inicial (Berg et al. 2011).

O gene *SOX2* faz parte da família das proteínas SOX (Rex et al.,1994), essas proteínas apresentam propriedades de fatores clássicos de transcrição e componentes que desempenham papéis-chave nas decisões de destino celular durante diversos processos de desenvolvimento (Pevny and Lovell-Badge, 1997). Foi demonstrado que o *SOX2* é necessário para dois tipos de células-tronco no embrião inicial e também pode ser usado como marcador de populações destas células (Avilion et al., 2003).

Goissis e Cibelli, (2014a) pesquisaram o a função de *SOX2* no desenvolvimento inicial em bovinos. Do estágio de zigoto até o estágio embrionário de oito células não foi identificada a expressão de *SOX2*, no entanto, no estágio de 16 células e de mórula, a proteína foi detectada em todas as células da maioria do número de embriões. Após essa visualização da expressão nos estágios iniciais, quando se atingiu o estágio de blastocisto, as células positivas para *SOX2* ficaram restritas à MCI tornando *SOX2* o primeiro marcador proteico específico da MCI bovina.

Uma limitação para a avaliação da dinâmica da diferenciação celular em bovinos é a necessidade da inviabilização dos embriões para análises de expressão gênica ou detecção de proteínas por imunofluorescência. Recentemente a técnica de CRISPR/Cas9 foi utilizada para a introdução de diversas proteínas repórteres em embriões murinos por recombinação homóloga, conferindo à técnica o status de método robusto para a inserção de fragmentos grandes de uma maneira específica e segura superando efeitos posicionais que acompanham a transgenia padrão (Gu et al., 2018). Partindo-se deste princípio, esta técnica permitiria a avaliação em tempo real da dinâmica de moléculas associadas à primeira diferenciação celular entre a MCI e o TE em embriões bovinos.

3.2. HIPÓTESE

Testou-se a hipótese de que a introdução de proteína repórter fluorescente permitiria a visualização indireta da expressão de SOX2 na MCI durante o desenvolvimento embrionário e também que a introdução de CRISPR/Cas9 em diferentes momentos do desenvolvimento pudesse apresentar diferentes eficiências. Um modelo hipotético gráfico esquematizando a inserção da proteína fluorescente mCherry na região gênica de SOX2 está representado na figura 2.

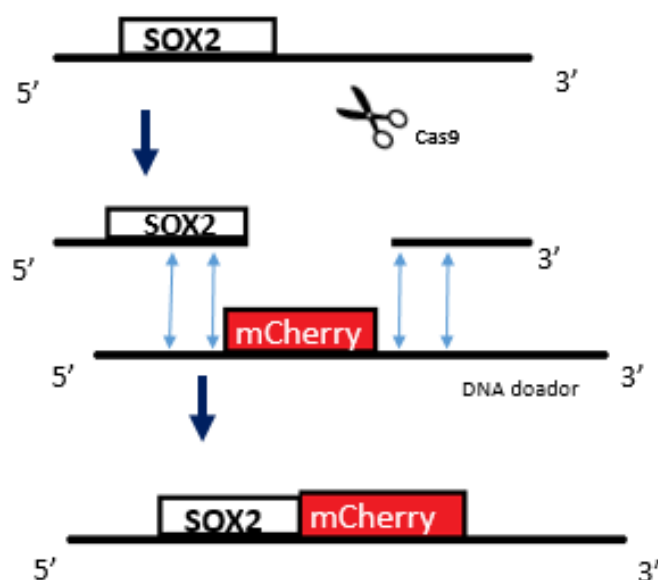


Figura 2 - Modelo hipotético gráfico representando a introdução dirigida da proteína *mCherry* na região 3' do gene *SOX2* em embriões bovinos. A enzima Cas9 irá promover a ruptura das fitas de DNA genômico, que será reparado seguindo-se o molde do DNA doador, e incorporando a proteína repórter fluorescente ao genoma. Este processo permite que a proteína SOX2 seja visualizada na MCI de blastocistos bovinos em tempo real, sem a necessidade de inviabilização do embrião.

3.3. OBJETIVOS

1. Introdução direcionada de sequência de DNA (*knock-in*) que codifica proteína repórter fluorescente vermelha (*mCherry*) na região gênica de *Sox2*.
2. Comparar a eficiência de *knock-in* com uso de microinjeções em diferentes momentos do desenvolvimento embrionário.

Espera-se com estes objetivos específicos criar um modelo embrionário bovino para ajudar na compreensão da segregação da massa interna celular (MCI) e do trofotoderma (TE), sendo possível a observação em tempo real do desenvolvimento embrionário *in vivo*.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Fertilização *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal, localizado no departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo na cidade de São Paulo – SP.

3.4.2 Delineamento experimental

Visando a inserção gênica (*Knock-in*) de sequência que codifica proteína repórter fluorescente *mCherry* na região gênica de *SOX2*, os componentes do sistema CRISPR/Cas9 foram microinjetados em zigotos bovinos produzidos *in vitro*, com adição de sequência de estreptoavidina à enzima Cas9, juntamente com uma sequência de DNA biotinilada com finalidade de induzir a recombinação homóloga (Gu et al., 2018). Essa sequência de DNA biotinilada foi denominada DNA doador e continha braços de homologia da região gênica próxima ao *stop codon* do gene *SOX2* e entre eles a sequência de *mCherry*. As microinjeções foram realizadas em

embriões bovinos produzidos *in vitro* em diferentes momentos: 8 ou 16 horas pós inseminação (hpi) e com diferentes concentrações dos componentes do sistema CRISPR/Cas9: RNA guia (50ng a 100ng), Cas9 RNAm (75 ng a 100ng) e DNA doador biotinizado (20ng a 100ng). Os embriões foram cultivados *in vitro* até o dia 8 (D8) e foram cultivados também embriões não injetados que serviram como controles. No D8 foram avaliadas taxas de formação de blastocistos e os embriões foram fotografados em microscópio de epifluorescência ou microscópio confocal para a avaliação da fluorescência. Todos os embriões, após a visualização em microscópio, foram armazenados em paraformaldeído 3,8% para posterior extração de DNA e genotipagem. Ao final, foi realizada a verificação de uma amostragem dos embriões produzidos nas diferentes condições.

3.4.3. Construção do RNA guia para o gene Sox2

Com a utilização da ferramenta *online* CAS-Designer (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>), foram selecionadas as sequências de RNA guia (gRNA) para o gene SOX2, cuja sequência está disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/784383>. Vale ressaltar que as sequências escolhidas se localizam próximo ao *stop códon* transcricional, visando a inserção de proteína repórter na porção 3' do gene, conseqüente porção C-terminal do peptídeo resultante. As sequências de oligonucleotídeos *Forward* (Fwd) (5' para 3') e *Reverse* (Rev) (3' para 5') são complementares e foram sintetizadas comercialmente (anexo 1). Foram selecionados dois pares de gRNA para início dos trabalhos, de modo que um seria selecionado de acordo com o progresso dos experimentos relatados a seguir.

Após a produção dos oligos de gRNAs para o gene SOX2, foram realizadas as reações de: Anelamento das fitas Fwd e Rev; Digestão enzimática do plasmídeo, possibilitando a sua linearização; Fosforilação - adição de fosfato aos oligos anelados; Ligação dos oligonucleotídeos anelados e fosforilados ao plasmídeo digerido anteriormente e a Reação de Transformação - inserção desse material em bactérias competentes para crescimento e multiplicação. Estas cinco reações estão descritas em detalhes abaixo.

3.4.4. Digestão enzimática de plasmídeo

O plasmídeo pX330-U6-Chimeric_BBCBh-hSpCas9-msa (pX330-Cas9), gentilmente doado por Bin Gu, do laboratório de Janet Rossant, Toronto, Canadá, foi digerido com a utilização da enzima de restrição BbsI-HF (New England Biolabs). A reação de digestão foi realizada com 5 µg plasmídeo, 5 µl de *buffer Cut smart* 10x, 20 UI de enzima BbsI-HF em volume final de 50 µl completado com água ultrapura. A reação foi montada em tubo de microcentrífuga de 1,5ml que foi acondicionado em bloco aquecedor pelo período de 3 horas a 37°C.

Este plasmídeo digerido foi então submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, que confirmou a formação de banda linear com tamanho compatível que foi purificada com o kit (Pure Link, Quick gel extraction, Invitrogen). Após a purificação, realizou-se a quantificação do material com uso de espectrofotômetro Nanodrop.

3.4.5. Reação de Anelamento

O anelamento dos oligonucleotídeos dos gRNA (Fwd e Rev) foi realizado em um termociclador da marca *ependorf*, em um tubo de PCR foram adicionados os seguintes componentes: 2 µM de cada oligonucleotídeo, calculados segundo a reação $C_i * V_i = C_f * V_f$ ($20 * 5 = x * 50$), 35 µl de água ultra pura e 05 µl de tampão Cut Smart (New England Biolabs), totalizando uma reação de 50 µl que foi submetida ao seguinte programa: (95°C – 10 min.; 95°C para 85°C em - 2°C/seg.; 85°C – 1 min.; 85°C para 75°C em - 0,3°C/seg.; 75°C – 1 min.; 75°C para 65°C -0,3°C/seg.; 65°C – 1 min.; 65°C para 55°C – 0,3°C/seg.; 55°C – 1 min.; 55°C para 45°C – 0,3°C/seg.; 45°C – 1 min.; 45°C para 35°C – 0,3°C/seg.; 35°C – 1 min.; 35°C para 25°C – 0,3°C/seg.; 25°C – 1 min.; 4°C Hold). Estes oligonucleotídeos anelados foram então submetidos à reação de fosforilação.

3.4.6. Reação de Fosforilação

Na reação de fosforilação foram adicionados a um tubo de PCR: 16 µl de oligonucleotídeo anelado (gRNA SOX2 1 ou gRNA SOX2 2), 1 µl de enzima T4 PNK, 1 µl de adenosina trifosfato (ATP), e 2 µl de tampão 10X PNK *buffer* (New England Biolabs), totalizando reações de 20 µl. Estes tubos foram incubados em

termociclador à 37°C por 30 minutos seguidos por 10 min à 75°C para término da reação. Com os oligonucleotídeos anelados e fosforilados, a próxima reação realizada foi a de ligação deste material com o plasmídeo que havia sido digerido anteriormente.

3.4.7. Reação de Ligação

A ligação entre o plasmídeo pX330-Cas9 digerido e o oligonucleotídeo fosforilado foi realizada com a adição dos componentes em um tubo de PCR com os seguintes volumes: 50ng de plasmídeo, 1µl de oligonucleotídeos fosforilados (gRNA 1 ou gRNA2), 350 UI (1µl) enzima T4 DNA Ligase (Takara Bio Inc), 2 µl Buffer 10X T4 DNA (Takara Bio Inc) e 15µl de água ultrapura para um volume final de 20µl. A ligação ocorreu em termociclador pelo período de 12 horas a 16°C e assim que o processo de ligação foi finalizado o produto da ligação foi introduzido em bactérias competentes em uma reação chamada de “Transformação” que será detalhada abaixo.

3.4.8. Transformação de bactérias competentes

A reação de transformação é necessária para que o plasmídeo ligado com a sequência de gRNA seja incorporado por bactérias competentes para ser multiplicado. A reação de transformação ocorreu da seguinte maneira: Bactérias competentes produzidas *in house* com CaCl₂, armazenadas em freezer a -80°C foram retiradas e colocadas em gelo durante 5 minutos para descongelamento. Após este tempo, foram adicionados 2µl do produto da ligação descrita acima ao tubo, que foi novamente colocado no gelo por mais 20 minutos. Após esse período, realizou-se o choque térmico com incubação em banho seco a 42°C durante 90 segundos seguido por incubação em gelo por 5 minutos. Em seguida ressuspendeu-se o material do tubo em 100µl de meio LB e então estas bactérias transformadas foram distribuídas em placas com LB-Ágar contendo 100ug/ml de ampicilina e cultivadas por aproximadamente 16h a 37°C. As colônias que cresceram (devido a sequência de resistência ao antibiótico que o plasmídeo contém) foram retiradas e semeadas em tubos cônicos de 50ml contendo 5ml de meio LB para expansão. Após este crescimento em meio líquido foi realizada a extração do DNA plasmidial com auxílio

do kit “Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), que foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop. Foi então realizado um PCR com amostras de colônias das placas dos presumíveis pX330_Cas9_gRNA1_SOX2 quanto do pX330_Cas9_gRNA2_SOX2. Essas amostras de colônias foram pinçadas das suas respectivas placas e mergulhadas dentro do tubo de PCR após a adição de todos os componentes da reação. Os componentes de cada reação foram os seguintes: 0,2 µl de DNTP mix, 1 µl de *buffer* 10x, 0,4 do oligo U6 seq (oligonucleotídeo para amplificação de sequência já contida no plasmídeo) (anexo 1), 0,4 µl do oligo “SOX2 gRNA Rev” (versão 1 ou versão 2), 0,1 µl da enzima Taq Polimerase e 7,9 µl de água ultrapura. Os tubos com as amostras foram distribuídos em termociclador com a programação detalhada a seguir: 95°C – 10 min.; 40 ciclos de (95°C – 15 seg; 60°C – 15 seg; 72°C – 1,5 min); 72°C – 2 min; 4°C Hold. Essas amostras foram verificadas em eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 3).

As amostras com resultado positivo no PCR foram então sequenciadas no Centro de Estudos do Genoma Humano para verificação de inserção correta da sequência nos plasmídeos, doravante nomeado “pX330_Cas9_gRNA_SOX2” versão 1 (figura 4) ou 2 de acordo com o gRNA clonado.

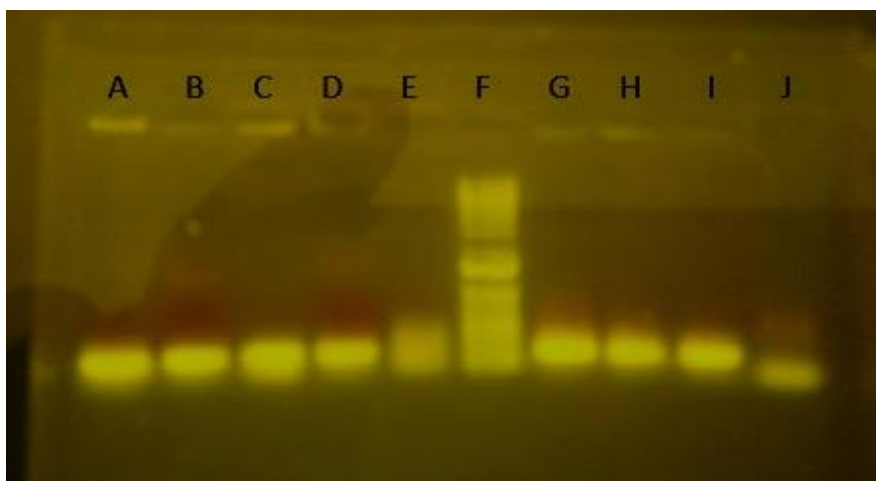


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a amplificação de fragmento correspondente a 225 pb nas amostras gRNA1 e 226 pb nas amostras de gRNA2. Poços A, B, C e D correspondem à amplificação correta de fragmento de 225 pb a partir de colônias distintas de bactérias transformadas com plasmídeo pX330_Cas9_gRNA1_SOX2. Poço E corresponde ao controle negativo do oligo de gRNA1. Poço F - DNA *Ladder* (Invitrogen, by Thermo Fischer Scientific). Poços G, H e I correspondem à correta amplificação de fragmento de 226 pb a partir de colônias distintas de bactérias transformadas com plasmídeo pX330_Cas9_gRNA2_SOX2. Poço J corresponde ao controle negativo do oligo de gRNA2,

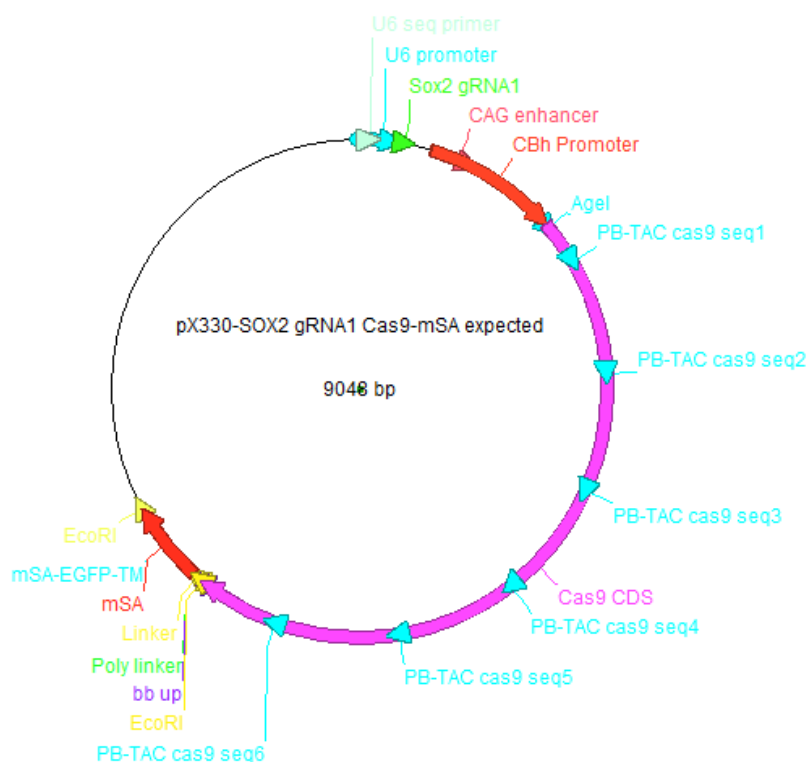


Figura 4. Representação gráfica do plasmídeo construído pX330_Cas9_gRNA1_SOX2. Acima na figura, em verde, pode ser visualizado o local de inserção do gRNA1.

3.4.9. Construção da sequência para recombinação homóloga

Fibroblastos extraídos de mucosa oral bovina foram descongelados e cultivados em meio de cultivo DMEM suplementado com 10% v/v soro fetal bovino (DMEM+SFB). O cultivo celular foi realizado em garrafas com 2-3 mL de DMEM+SFB em estufa a 38,5°C com 5% CO₂ e alta umidade.

O DNA genômico foi extraído conforme o seguinte protocolo: foram cultivadas duas garrafas com o intuito de se extrair o DNA genômico. Após a terceira passagem o meio destas garrafas foi removido e as células retiradas com a utilização de Tripsina. Centrifugou-se então o conteúdo a 200 x g por 5 minutos e ressuspendeu-se as células com 1 ml de PBS gelado. Novamente foram centrifugadas e o líquido foi descartado. As células então foram ressuspendidas em 300µl de solução de digestão (100mM de NaCl, 10mM TrisCl pH 8,0, 25mM EDTA pH 8,0, 0,5% SDS e 0,1 mg/mL de proteinase K adicionada no momento do uso.) e incubadas 14 horas em estufa a 50°C em tubos cônicos de 1,5 ml. Após isso os

tubos foram retirados da estufa e foi adicionado em cada um deles 300 µl de solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico 25:24:1. Centrifugou-se pelo período de 10 minutos a 1700 x g.

Para a purificação foi utilizada uma solução de acetato de sódio 3 M adicionado em volume 1/10 e 2 volumes de etanol absoluto, neste momento o DNA formou um precipitado. Centrifugou-se novamente durante 2 minutos 1700 x g e realizou-se uma lavagem do sedimento com etanol 70% que foi logo retirado. Por fim o DNA foi ressuspendido em tampão Tris-EDTA para eluição e foi armazenado a 4°C. O DNA de duas amostras foi extraído e quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop*.

As sequências genômicas para recombinação homóloga foram amplificadas por PCR com a utilização de oligonucleotídeos desenhados para esta finalidade “*SOX2_GEN_AMP_FWD* e *SOX2_GEN_AMP_REV*” (Anexo 1) e com polimerase de alta fidelidade (CloneAmp HiFi PCR Premix, Takara Bio, USA). Foram utilizados os oligos com a utilização da seguinte condição de PCR: 98°C – 2 min.; 35 ciclos de (98°C – 10 seg; 60°C – 15 seg; 72°C – 30 seg) e 4°C Hold. As sequências amplificadas foram submetidas à eletroforese para verificar o tamanho e então purificadas com o kit Pure Link Quick Gel Extraction kit (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific). As sequências purificadas foram denominadas SOX2 5' e SOX2 3'.

Estas sequências amplificadas foram clonadas em plasmídeo contendo sequência que codifica *mCherry* (*pBS-mCherry*, gentilmente cedido por Bin Gu, do laboratório de Janet Rossant, Toronto, Canadá). Estas clonagens foram realizadas em duas etapas, primeiramente foi possível a inserção do fragmento 3' ao plasmídeo, com a utilização de 20 UI da enzima de restrição BamHI-HF (New England Biolabs) para linearização do plasmídeo seguido do uso de In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio, USA) para a ligação. Esta etapa de ligação foi realizada em termociclador pelo período de 15 minutos a uma temperatura de 50°C, segundo instruções do fabricante. Deste modo foi obtido um plasmídeo intermediário denominado “*pBS_mCherry_SOX2_3'* BamHI. Para confirmação da clonagem foi realizada uma digestão enzimática de 5µg de plasmídeo com a utilização da enzima BamHI a 37°C durante 1 hora. A eletroforese permitiu a visualização de bandas nos locais esperados (1200 e 3600 pares de bases) e pode ser verificada na Figura 5. Os plasmídeos foram sequenciados para verificação da sequência clonada.

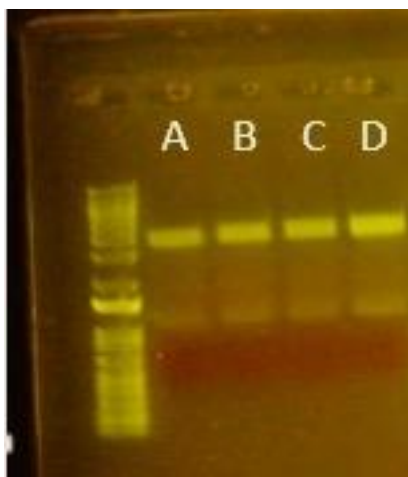


Figura 05. Eletroforese realizada com os produtos da Digestão realizada nos plasmídeos “pBS_mCherry_SOX2_3’ em quatro amostras diferentes, identificados na figura como A, B, C e D evidenciando a correta ação da enzima BamHI nos locais esperados, demonstrando que a ligação das sequências com o plasmídeo realizada anteriormente ocorreu de forma satisfatória. Em todas as quatro amostras ocorreu a digestão esperada.

Em seguida, o fragmento 5’ foi clonado no plasmídeo pBS_mcherry_SOX2_3’. Ambos, fragmento e plasmídeo, foram digeridos a 37°C durante 3 horas com 20 UI de EcoRI-HF e 20 de HindIII-HF (New England Biolabs), purificados após eletroforese e ligados com a enzima T4 Ligase (Takara). O material ligado foi transformado em bactérias competentes, distribuído em placas de LB Ágar e levado estufa a temperatura de 37°C por 16 horas.

As colônias resultantes foram semeadas em meio LB líquido e submetidas à extração de DNA plasmidial que foi realizada com a utilização de kit comercial (QIAprep spin Miniprep kit, Qiagen) e a quantificação realizada pelo espectrofotômetro Nanodrop. As amostras foram denominadas como “pBS_mCherry_Sox2_5’_3’.

Para a verificação da inserção do fragmento 5’ no plasmídeo foi realizada uma digestão do plasmídeo com as enzimas HindIII e EcoRI. Um total de 1ug do produto da digestão foi submetido a eletroforese (Figura 6), permitindo a visualização das bandas correspondentes aos fragmentos de 4890 pb (plasmídeo original + fragmento 3’) e de 780 pb (fragmento 5’), demonstrando que as etapas anteriores de digestão, ligação e transformação haviam sido realizadas com êxito.

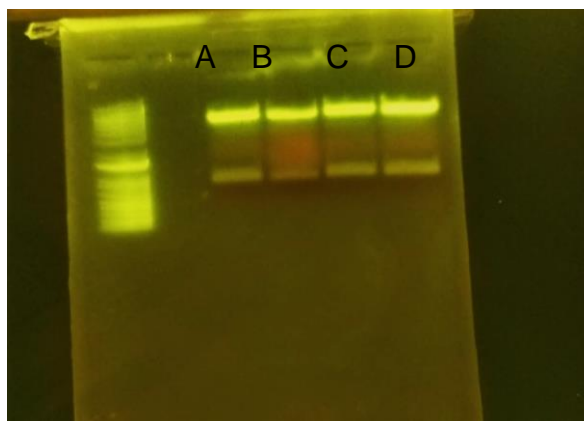


Figura 6. Digestão enzimática demonstrando a liberação dos fragmentos correspondentes ao fragmento 5' (780 pb) do gene *SOX2* e do plasmídeo juntamente com o fragmento 3' do gene *SOX2* (4890 pb). As letras A, B, C e D correspondem a 4 amostras distintas do mesmo material, demonstrando que todos eles foram positivos.

O plasmídeo, juntamente com os dois fragmentos do gene *SOX2* clonados, foi sequenciado pelo método de Sanger no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB – USP). O sequenciamento do DNA demonstrou que as clonagens foram realizadas com sucesso. Na figura 7, pode ser verificada uma representação do plasmídeo com os dois fragmentos do gene clonados e a sequência da proteína fluorescente entre estes fragmentos.

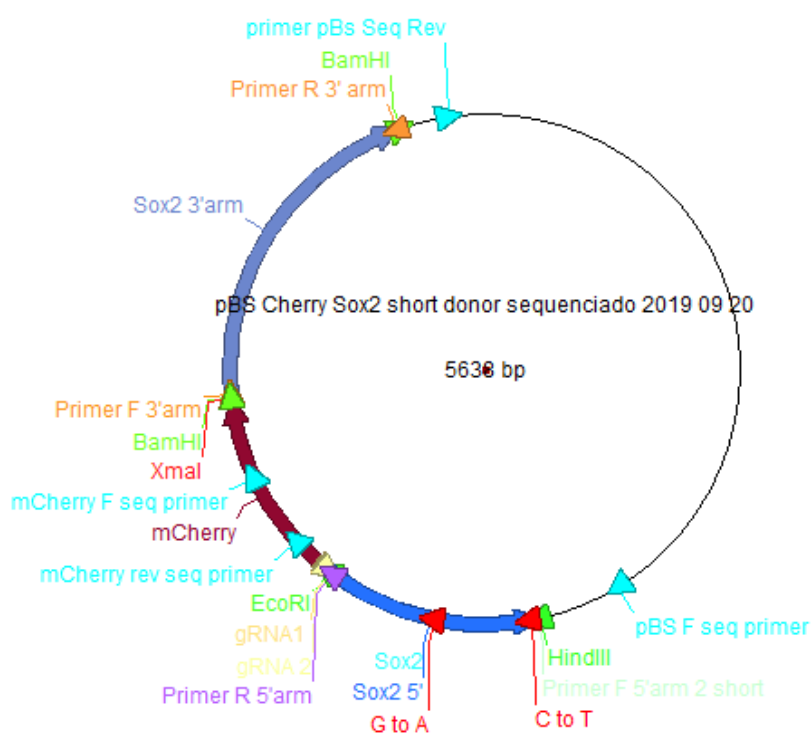


Figura 7. Representação gráfica do plasmídeo construído, em azul os fragmentos do gene SOX2, entre os fragmentos do gene encontra-se a proteína fluorescente (mCherry). Podem ser observados ainda os sítios de restrição das enzimas utilizadas para as clivagens no DNA plasmidial.

3.4.10. Lipofecção de plasmídeo em fibroblastos

Os plasmídeos que foram construídos “px330_Cas9_gRNA_SOX2_1” e “px330_Cas9_gRNA_SOX2_2” foram utilizados para testes de eficiência de quebra do DNA em fibroblastos cultivados. Foram realizadas duas passagens de células para garrafas novas com meio-base, equilibrado em estufa, até que se atingisse a confluência celular necessária para a distribuição em placas de 24 poços.

Dois dias após a segunda passagem das células para garrafas novas, os fibroblastos foram então distribuídos para a placa de 24 poços em uma concentração de $1,5 \times 10^5$ e submetidos à reação de lipofecção.

Foi utilizado o protocolo de lipofecção Lipofectamine 2000, (ThermoFisher). Os plasmídeos “px330_Cas9_gRNA_SOX2_1”, “px330_Cas9_gRNA_SOX2_2” e pcDNA 3.1 (contendo cassete de seleção para neomicina, gentilmente cedido por Irene Yan, do Instituto de Ciências Biomédicas, USP) foram ajustados para a concentração de 1000 ng/ μ L e adicionados ao meio OPTIMEM (ThermoFisher) adicionado com lipofectamina segundo recomendação do fabricante, em cada poço de cultivo foram adicionados 200 μ l desse meio. Após 24 horas realizou-se a alteração do meio para DMEM+SFB e no terceiro dia o meio foi alterado para DMEM+SFB suplementado com 02 μ g/ml G418. No quinto dia de cultivo as células foram removidas e centrifugadas, o meio líquido foi descartado e o sedimento celular foi armazenado em tubos cônicos de 15ml à temperatura de -20°C.

3.4.11. Detecção da mutação

Para a detecção da mutação, foi utilizado o protocolo “GeneArt® Genomic Cleavage Detection Kit” e as reações foram realizadas em conformidade com as diretrizes sugeridas pelo fabricante.

Foram confeccionadas três sequências de oligonucleotídeos (anexo 1) para detecção de mutação (*SOX2 detection mutation FWD*, *SOX2 detection mutation Rev*

1 e *SOX2 detection mutation Rev 2*, descritas no anexo 1). Esses oligos foram diluídos para a concentração de 20 μ M e testados em uma amplificação por PCR com DNA genômico e enzima Taq Polimerase. A reação foi realizada com temperatura de ativação e denaturação de 98°C, de anelamento de 59°C e 35 ciclos. Foram amplificados fragmentos de 400 pb (*SOX2 detection mutation Fwd* e *SOX2 detection mutation Rev 1*) e 500 pb (*SOX2 detection mutation Fwd* e *SOX2 detection mutation Rev 2*) conforme esperado.

Duas amostras de células lipofectadas com plasmídeo “px330_Cas9_gRNA_SOX2_1” e duas de células lipofectadas com o plasmídeo “px330_Cas9_gRNA_SOX2_2” foram submetidas ao protocolo. Na etapa de digestão do kit GeneArt® Genomic Cleavage Detection Kit o DNA é clivado pela enzima de detecção no local onde ocorreu a mutação permitindo a análise em eletroforese pela visualização de duas bandas lineares (Figura 8).

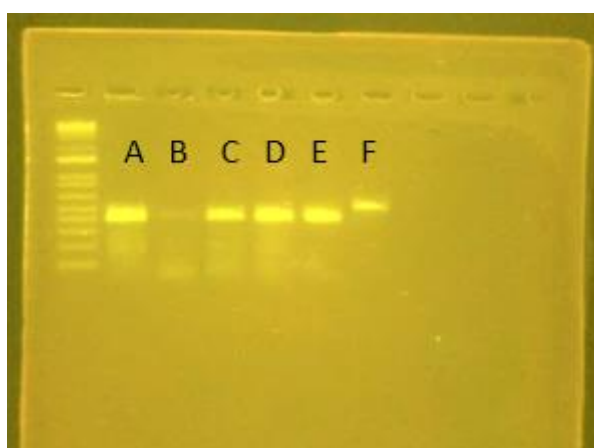


Figura 8. Eletroforese demonstrando a detecção de mutação em 4 amostras de células lipofectadas. Na figura, o poço A demonstra a detecção de mutação em fibroblastos lipofectados com gRNA 1, observa-se formação de duas bandas lineares de 400 e 200 pb confirmando que houve a mutação no local pretendido. B corresponde a segunda amostra de lipofecção com gRNA1, nesta amostra não aconteceu a mutação no local esperado. Poços C e D correspondem às amostras lipofectadas com gRNA 2, em ambas ocorreu a formação de duas bandas lineares, confirmando o sucesso da clivagem e posterior detecção da mutação. Poço E corresponde ao controle positivo, fibroblastos que não foram lipofectados e que foram submetidos ao teste de detecção, nota-se a formação de uma única banda, ou seja, não houve clivagem de DNA. Poço F corresponde ao controle do protocolo, também se observa a formação de uma única banda linear, confirmando o objetivo principal do protocolo.

3.4.12. Amplificação do vetor doador com biotina

Foram confeccionados oligonucleotídeos (*SOX2 BIOTIN FWD* e *SOX2 BIOTIN REV*, anexo 1) marcados com biotina para amplificação da sequência do vetor doador (*SOX2 3' + mCherry + SOX2 5'*) A amplificação do vetor doador foi realizada com a enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) em um gradiente de (58, 60 e 62°C). Bandas fortes e precisas na altura dos 3800pb foram visualizadas em eletroforese. A mesma reação foi realizada, desta vez com polimerase de alta fidelidade (CloneAmp HiFi PCR Premix, Takara Bio, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Duas amostras foram submetidas à amplificação com os mesmos oligonucleotídeos utilizados acima. As reações estão descritas abaixo: 12,5µl da mistura enzimática CloneAmp HiFi; 0,5µl do oligonucleotídeo biotilado *forward*; 0,5µl do oligonucleotídeo biotilado *reverse*; 1,0µl do vetor doador "*SOX2 3'_mCherry_SOX2 5'*" e 10,5µl de água ultra-pura, quantidade suficiente para que se alcançasse o volume de 25 µl da reação.

As reações ocorreram em termociclador *Eppendorf* e as condições foram as seguintes: 98°C – 2 minutos; 98°C – 10 segundos, 60°C – 15 segundos e 72°C – 10 segundos (40 ciclos) e 72°C – 10 segundos. O produto foi analisado em gel de agarose 1% o que confirmou bandas com o tamanho correspondente a 2700 pares de base, confirmando o sucesso de todas as amostras submetidas à reação. As quatro amostras foram purificadas com kit comercial da marca Quiagen (QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit) e armazenadas em geladeira a 4°C até o momento da microinjeção.

3.4.13. Transcrição do RNA guia para o gene *SOX2*

Os plasmídeos construídos e sequenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), já testados quanto à função de ação no genoma bovino e denominados "*pX330_Cas9_gRNA1_SOX2*" e "*pX330_Cas9_gRNA2_SOX2*" foram submetidos às reações de transcrição realizadas com kit comercial "*MEGAscript™ T7 Transcription Kit*" (Thermo Fisher Scientific).

Sequências de oligonucleotídeos foram confeccionadas para a amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) do fragmento a ser transcrito (*SOX2 IVT*

GRNA1 FWD, *SOX2 IVT GRNA2 FWD* e *PX330 IVT GRNA REV*, Anexo 1) e as reações foram realizadas com a polimerase de alta fidelidade ClonAmp HiFi PCR Premix (Takara Bio, USA) nas seguintes condições: 98°C – 2 minutos; 98°C – 10 segundos, 60°C – 15 segundos e 72°C – 10 segundos (40 ciclos) e 72°C – 10 segundos.

O produto desta reação de PCR foi então submetido ao protocolo de transcrição, todas as etapas foram realizadas em conformidade com as diretrizes do fabricante para uma reação de 20 µL. Os componentes foram os seguintes: 2 µL de tampão de reação T7 10X; 2 µL de solução T7 ATP (75 mM); 2 µL solução T7 CTP (75 mM); 2 µL solução T7 GTP (75 mM); 2 µL solução T7 UTP (75 mM); 08 µL DNA modelo (amplificado na reação de PCR acima) e 2 µL da mistura enzimática. A reação foi montada em temperatura ambiente e a mistura enzimática foi adicionada ao final da montagem, após a montagem foi realizada uma incubação de 4 horas a 37°C e em seguida foi adicionado 1 µL de TURBO DNase e incubado novamente a 37°C pelo período de 15 minutos para que fosse removido o modelo de DNA.

A purificação deste material ocorreu como na descrição do protocolo do fabricante e foi realizada com etanol. Ao final, o sedimento foi eluído com 100 µL de água ultra-pura e quantificado no espectrofotômetro Nanodrop, foi obtida a concentração de 1375 ng/µL de RNA que foi dividido em alíquotas de 20 µL e armazenado em freezer a -80°C para ser microinjetado nos embriões.

3.4.14. Preparação da enzima Cas9 conjugada com estreptavidina

A síntese de RNA da enzima Cas9 foi realizada a partir de plasmídeo contendo sequência promotora SP6 seguida da sequência da enzima Cas9 fusionada à sequência de estreptavidina (Cas9-mSA, gentilmente doado por Bin Gu, do laboratório de Janet Rossant, Toronto, Canadá) usando kit comercial de transcrição (mMESSAGE mMACHINE™ SP6 Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific).

Primeiramente, 5 µg de plasmídeo contendo a sequência Cas9-mSA, foi linearizado com a enzima NotI em digestão de 4 horas a 37°C e em seguida, este plasmídeo linearizado foi submetido ao protocolo de transcrição. A reação foi a seguinte: 10µl de 2xNTP/CAP; 2µl do tampão de reação 10x; 6µl do plasmídeo linearizado e 2µl do mix enzimático, totalizando uma reação de 20µl. Esta reação foi

incubada a 37°C pelo período de 2 horas em termociclador e após este período foi realizada a etapa de “turbo dnase” na qual 1µl do reagente de mesmo nome foi adicionado à amostra que foi novamente incubada a 37°C, desta vez por 15 minutos, com a finalidade de remoção do modelo de DNA usado na reação.

A purificação foi realizada segundo recomendações do fabricante com Cloreto de Lítio (LiCl), ao final do processo o RNA para Cas9-mSA foi eluído com 100µl de água ultra-pura e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop. Foi obtida uma concentração de 195ng/ul e o conteúdo foi dividido em 20 alíquotas de 5µl que foram armazenadas em freezer -80°C até o momento das microinjeções embrionárias.

3.4.15. Microinjeções embrionárias

Oócitos bovinos foram obtidos após aspiração de ovários coletados em abatedouro comercial. Os complexos *cumulus*-oócito foram selecionados de acordo com sua qualidade e colocados em meio de maturação, após 22h a 38,5 °C em atmosfera controlada com 5% CO₂, os oócitos foram submetidos à fecundação in vitro (FIV), que ocorreu por um período de 08 ou 16h. Os presumíveis zigotos, no caso de FIV de 08 horas, foram submetidos à incubação em hialuronidase (1mg/ml em HH) por 2 minutos seguidos por 3 minutos de vórtex para remoção das células do cumulus e em seguida microinjetados, e no caso de FIV de 16 horas foram submetidos apenas à remoção de células com vórtex pelo período de 3 minutos e microinjetados em seguida. Quando incubados em hialuronidase (FIV de 08 horas), após a etapa de vórtex, os embriões foram lavados em 5 gotas de HH.

Além da variação do período de FIV (08 ou 16 horas), foram realizadas microinjeções embrionárias com concentrações crescentes de material injetado. As microinjeções foram realizadas conforme descrito anteriormente (Goissis e Cibelli, 2014). De modo sucinto, os embriões foram injetados em micromanipulador equipado com microinjetora *Eppendorf Cell Tram Vario*. A membrana foi rompida por sucção e 5 a 7 pl de solução foi injetado por zigoto. Os embriões foram cultivados em KSOM por 186 hpi a 38,5 °C em atmosfera controlada até o momento da avaliação. A relação de todas as diferentes concentrações de material injetado está descrita na tabela 3.

Tabela 3 – Diferentes concentrações de material injetado e diferentes horários de microinjeção.

Replicata	Zigotos	Horário Pós-FIV	Concentração de Material Injetado (ng/µl)		
			mRNA Cas9	gRNA	Vetor Doador
1 ^a	60	16	75	50	20
2 ^a	60	16	75	50	20
3 ^a	56	16	75	50	20
4 ^a	80	16	75	50	50
5 ^a	80	08	75	50	50
6 ^a	80	16	75	50	50
7 ^a	80	08	75	50	50
8 ^a	60	08	75	50	100
9 ^a	60	08	75	50	100
10 ^a	60	08	75	50	100
11 ^a	60	16	75	50	100
12 ^a	60	08	100	100	100
13 ^a	80	16	100	100	100
14 ^a	60	08	100	100	100
15 ^a	80	08	100	100	100
16 ^a	80	16	100	100	100

Legenda. Demonstração das concentrações de mRNA para Cas9-mSA, gRNA para SOX2 e Vetor doador em cada replicata de microinjeção embrionária.

3.4.16. Microscopia de epifluorescência e microscopia confocal.

Todos os embriões produzidos durante o experimento foram fotografados no em 186hpi em microscópio invertido de epifluorescência (Olympus IX-81) equipado com filtro de excitação 550nm e emissão de 590nm. Os embriões foram fotografados em gotas de HH e posteriormente foram fixados em paraformaldeído 3.8.

Uma amostragem dos embriões produzidos (n=10) foi visualizada em microscópio confocal Olympus Fluo View 1000 (Centro Avançado de Diagnóstico por Imagem - FMVZ/USP) equipado com filtro de excitação de 568nm e emissão de 610nm.

3.4.17. Extração de DNA

Todos os blastocistos produzidos nas diferentes replicatas foram coletados para extração de material genético com kit comercial Extract-N-Amp (Sigma-Aldrich), as reações foram realizadas em menor volume do que o recomendado, isso foi realizado pensando-se em adequar o protocolo para extração de DNA de embriões, conforme descrito a seguir.

Cada embrião foi acondicionado individualmente em um tubo de 1,5 ml que continha 4,4µl de tampão de extração misturado com 1,1 µl de tampão de preparação de tecido, estas reações foram incubadas pelo período de 10 minutos à 55°C e logo após foram submetidas a uma temperatura de 95°C pelo período de 3 minutos, após o esfriamento as amostras foram neutralizadas com 4,4 µl de tampão de neutralização específico e puderam então ser armazenadas a 4°C, o que foi realizado. Embriões não injetados, produzidos nas mesmas condições de cada replicata de microinjeção, foram submetidos ao mesmo protocolo, sendo considerados como controles.

3.4.18. Genotipagem

Após a extração de DNA dos embriões, foram realizadas reações de PCR com o intuito de identificar a inserção de 708 pb correspondente ao inserto (*mCherry*). Para a PCR foi utilizado o mix enzimático “PCR *Ready mix*” disponibilizado pelo kit de extração (Extract-N-Amp, Sigma-Aldrich). Cada reação utilizou os seguintes componentes: 2µl de DNA extraído, 5µl de PCR *Ready mix*, 0,5µl de oligonucleotídeo *forward*, 0,5 µl de oligonucleotídeo *reverse* (oligonucleotídeos ajustados para a concentração de 5 µM) e 2µl de água ultra-pura.

A condição de PCR foi a seguinte: 94°C – 10 minutos; 94°C – 40 segundos, 63°C – 30 segundos e 72°C – 3 minutos (40 ciclos) e 72°C – 10 minutos.

Após diversas tentativas de obter produtos de PCR com oligos que não estivessem contidos no DNA doador, não foi possível padronizar uma reação que permitisse amplificação com repetibilidade. Portanto foi utilizado um par de oligos que estava contido no DNA doador: *SOX2 detec mutation Fwd* e *SOX2 detec mutation Rev 1* (Anexo 1). A demonstração da sequência correspondente ao exon *SOX2* e dos oligonucleotídeos utilizados para verificação da inserção está representada na figura 9, obtida através do programa A Plasmid Editor (ApE).

Feature	Direction	Type	Location ↓
Sox2	<<<	misc_feature	1..2660
Sox2 exon	<<<	misc_feature	601..2060
Start codon	<<<	misc_feature	996..998
Primer início braco 5'	>>>	misc_feature	1174..1194
SOX2 detec mutation Fwd	>>>	misc_feature	1631..1652
gRNA 2	<<<	misc_feature	1947..1966
gRNA 1	<<<	misc_feature	1955..1974
Stop codon	<<<	misc_feature	1956..1958
SOX2 detec mutation Rev 1	>>>	misc_feature	2010..2030
Primer Final braco 3'	<<<	misc_feature	3130..3151
Gen amp Rev 2 clon	>>>	misc_feature	3584..3604


```

1 AGCGAGCCGGGCGAGCGGAGAAGCCAGCTTAGGGAGAAGCGCTGGAGCGCTGGAGTTGGGGGAAGTGTGCGGAGGAGCGGGAGAACAATGACACACCAACTCCAGCAGCGGTGGTTCCCGAAATATAGTGGACAGTC
142 TCACTGAGCCACCTTCTCTGCCCTACCCACCCACCTCAGCTTCTCGCGCCCGCTCCATTTTCAGCAGTCCGCACCAAAAGAGTAAATCAAGATTAAGTTTAAAGAAGAAAATATCGTAGTCTTAGGGCTGTTT
283 ACCCACTTCTCCGAAAAGCGTGTGGTGTGACCTGTGTGTCGAGAGGGGATACAAAGTTTCTCAGTGGCTGGCAGGCAGCGTGTGGAGCGCCTCCCGCTCCCGCCCGCGCTTCTCCCGCCCGCTCCCGC
424 GCGCGGTGGCGGCGCGCAGGCCCGCCCTTTCATGCAAAACCCCGCGCAAGCTGGGCTCGAGTGGAGGAGCGCGCGCGCTGATTGGTGGTGGAAACCCATTTATCCCTGACAGCCCGCTCACATGGATGG
565 TTGTCTATTAAGTGTTCAAAAAAGTATCAGGAGTGTCAAGGCGAGAGAAGAGAGTGTTCGAAAAGGGGAAAGTGTGTCTGCCTTTAAGACTAGGACTGAGAGAAAGAAAGAGAGAGAAAGAAAGGGAGAGAA
706 GTTTGAGCCCCAGGCTTAAGCCTTTCCAAAAAATAATAAACAATCATCGCGCGCGCTGGATCGGCCAGAAGAGGAGGAAAGCGCTTTTGTATCCTGATTCAGTTTGGCTCTTTCTTTTCTCCCGAAATATCTCT
847 TCGCTGATTTTCTCGCGGAGCCCTCGCTCCCGACACCCCGCCCGCTCCCTCTCTCTCCCGCCACCGCGGGCCCGCCAAAGTCCCGCGCGGCCGAGGGTCCGCGCGCCCGCGCGCGCGCGCGCGCACA
988 GCGCCCGCATGACAACATGATGGAGACGGAGCTGAAGCCCGCGGGCCCGCAGCAAACTTCGGGGGGCGCGCGCGCGCGCGCAACTCCACCGCGCGCGCGCGCGCGCAACCAAGAAAGAACAGCCCGGACCGAGTCA
1129 AGCCCGCCATGAACGCTTTCATGGTGTGGTCCCGCGGCGAGCGCGCAAGATGGCCAAAGAAACCTTAAGATGCACAACCTGGAGATCAGCAAGCGCTTGGGCGCGGAGTGGAAACTTTGTCCGAGACCGGAGACGGCG
1270 CGTTTCATCGACGAGCCACGCGGTGGCGAGCTGCACATGAAGGAACACCGGATTAATAATACCGCCCGCGGCAAAACCAAGACGCTCATGAAGAAGGATAAGTACACACTGCCGGGAGGCGCTCGCGCCCGCGG
1411 GCAACAGCATGGCGAGCGGGGTGGGGTGGCGCGCGCTCGCGCGGGCGTGAACAGCGCATGGACAGCTACCGCGACATGAACGGCTGGAGCAACGGCAGCTACAGCATGATGCAGGACCGAGCTGGGCTACCGCAAC
1552 ACCCGGGCTCAACGCGCACGGCGCGCTCAGATGCAGCCATGCACCGCTACGACGTGAGCGCCCTGCGAGTACAACCTATGACCAGCTCGCAGACCTACATGAACGGCTCGCGCCACCTACAGCATGTCTTATCTCAGC
1693 AGGGCACCCCTGGCATGGCGCTTGGCTCCATGGGCTCGGTGGTGAAGTCCGAGGCCAGCTCCAGCCCGCCCGTGGTTACCTCTTCTCCCACTCCAGGGCGCCCTGCCAAGCCGGGAGCCTCCGGGACATGATCAGCATGT
1834 ACCTCCCGGGCCGAGGTTGCCGGAGCCCGCCCGCCAGCAGACTTCACATGTCCAGCACTACCCAGAGCGCGCGGTGCCCGCCAGCGCCATTAACGGCACACTGCCCGCTCGCACATGCGCGCGGAGCGGTGAAC
1975 TGGAGGGGGCGGGGAGACATTTCAAAGAAAAGAGGGAAATGGAGGACAGCAAAACAGCATGGAGAAAACCCGGTACGCTCAAAAAAATAAAAAAATCATTCCAGCAAAATGACAGCTCAAAAAGAAAACGCCA
2116 ATCCATCCCACTCAGCAAAAACCGCATGCCGCAAGAAAATTTATGAGAGATCCTGGACTCTTTCGGGGGACTATTTTGTACAGAAAACCTGGGGTGGCAGGTGGGGAGGCGGAGGAAATGGACCTGT
2257 ATAGATCTGGAGAAAAGAAAACCTACGCAAACTTTTAAAGTCTAGTGATACGGTAGGAGCTTGCAGAAAGTTTGCAAAAGCTTTTACCAATAATATTTAGAGCTAGTCTCAAGCGACGAAAAAATGTTTAAATAT
2398 TTGCAAGCAACTTTGTACAGTATTTATCGAGATAAACATGGCAATCAAAATGTCCATTGTTTATAAGCTGAGAATTTGCCAATATTTTCAAGGAGAGGCTTCTGTGTAATTTTGTATCTGCAGCTGAAATTTAGGACA
2539 GTTGCAAAACGTGCAAAAGAAAAGTAAATCAGATTTGGCATTTTAAATTTGTTAAAAAATGTACAAGAAAAGAAAATTAGAATAAGTACTGGCAAAACCATCTCCGTTGGTCTTAAAGGGGCAAAAGTTTATGATTTACTA
2680 AATTTTTTAACTTAAGTAAAGCAAAAATGGCCATGCAGTTGACATCGTTGGTAAATTTATAATAGCTTTTTGTTTCCCAACTTTCCATTTTGTTCAGATGAAAACCAACATGAAATTTACTGTGTTGAAATAT
2821 TTTCTATGTTTGTAAATTTCTGTAATTTATGTGATATTTAAGTTTCCACATTTAGTTTCCGTAGTTGATTTTAAAGATTCGGCTCTGATATTTGAATCAGTCTCCCGAGAAATCCATGATATTTGAAT
2962 AATACCATCTTTAACAAGGTACATTTCAACTTAAGTTTACTCCATTTATGCACAGTTTGGATAAATAAATTTTGAATAATGGACACTGAAATTTAGCTTGAATTTTATTTGGATAACATTTGATTTATAA
3103 CCCAGCTCTCGGGAAATATACTGTGCTCAGCCAAAGACCGCAGAGTACCATAAACCTTAGTATTTAGTCCAGTAGCATGTGCTAATGTTAACAGCAACAAATAAATGGCTGGATGATTAATTAAGTATTTCTCGAAA
3244 AAATGGGAATGCTTATGCTATTTCCAAAATAGAAAATAGGGACATATATGTAACCCACCCCTCTTTTCTAAGCAGATGAATAAGCATGATGGGACTTAAACTGATTTATGCCACTTGTGCCAGAAAGGAGTCAA
3385 TTTCTGAAAATTTTCATGTAGCTTAGCAGATGGGTATTGAGCCAAATCAGAACCAGTTGGCTGTTTTGTTTTGTTTTTCTCACAGCAATGGCCCTTTGAAAACGTGGTTATAGGGGAAATGATGCTTCTTGTATA
3526 GGAATAATGCAACTAGACAAGCAAGTGTCTATGCTGGTGGTGTTAGATTACTTGGCCCTGCTATTGTCTGAGAGAAAACAAGTGGTTGTCTTCTTGTTCATCACTTCATAAACTTTCTCTACATTTT
3677 CCTGTTTAGGGACAAAGGAAAGCAGAGAG

```

Figura 9. Representação gráfica da sequência da região do gene *SOX2* em bovinos. Nesta imagem obtida do programa A Plasmid Editor – Ape, é possível observar em azul claro a sequência do gene *SOX2* e em azul escuro a parte correspondente ao éxon do gene *SOX2*. A sequência ATG correspondente ao start códon está representada em verde, e na cor rosa está representado o stop códon (TGA). As sequências marcadas em cinza escuro correspondem aos oligos *forward* e *reverse* que delimitam a sequência utilizada no vetor doador.

A eletroforese das amostras submetidas à genotipagem deveria evidenciar uma banda de 400 pares de base para a sequência *wild-type* (Figura 10) e 1123 pares de base para a sequência com inserção de mCherry (Figura 11).

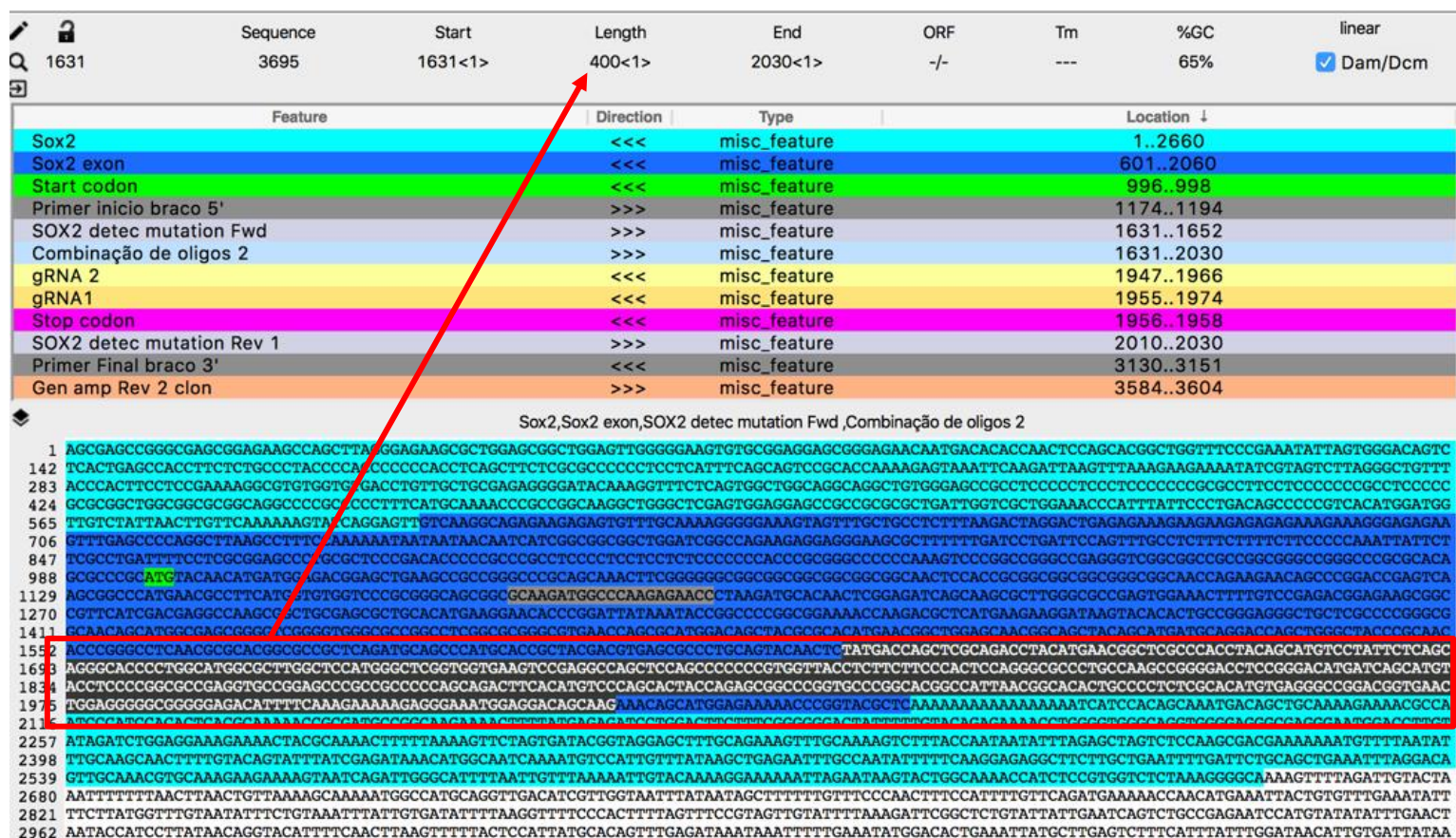


Figura 10. Representação gráfica do produto de PCR da sequência wild-type, sem inserção de *mCherry*, a partir dos oligonucleotídeos marcados em cinza claro (*SOX2 detec mutation Fwd e Rev1*). No destaque da imagem do programa ApE a sequência marcada em preto com letras brancas corresponde à sequência de 400pb que deverá ser amplificada nos embriões controle e nos embriões que não ocorreu a inserção.

protease pelo período de dois minutos antes da incubação em paraformaldeído 4% para a que tivessem a zona pelúcida removida.

Os embriões produzidos *in vitro* e coletados para estes testes foram permeabilizados usando 0,5% Triton X-100 solução por 15 minutos e posteriormente foram colocados por uma hora em temperatura ambiente em solução de bloqueio contendo 0,1% Triton X-100, 1% albumina sérica bovina (BSA), e 10% de soro fetal de jumento. Foram utilizadas reações de imunofluorescência para as proteínas SOX17 e CDX2 como forma de controle positivo, pois estavam padronizadas e não apresentavam variação de resultados. As incubações com anticorpo primário anti-SOX2 (1:100, *rabbit* anti-SOX2, ab97959, Abcam, MA, USA ou 1:200, *rabbit* anti-SOX2, PA1094, ThermoFisher, USA) com anticorpo primário goat anti-SOX17 (1:100, *goat* anti-SOX17, AF1924 Novus Biologicals, Littleton, EUA) ou com anticorpo primário rabbit anti-CDX2 (1:50, *rabbit* anti-CDX2 ab88129, Abcam) ocorreram à 4°C por 16h em rotação 80 em solução de 0,1% de Triton X-100 e 1% de BSA. Em seguida foram realizadas três lavagens de 15 minutos em solução de Triton X-100 a 0,1% e incubação por 1 hora em temperatura ambiente e com ausência de luminosidade com anticorpos secundários *donkey anti-rabbit* conjugado com Northern Lights 493 (NL006, R&D Systems, MN, US) ou *donkey anti-goat* conjugado com Northern Lights 557 (NL001, R&D Systems). Os embriões foram então lavados três vezes pelo período de 15 minutos em ambiente escuro, incubados com Hoescht por 20 minutos, lavados em PBS-PVP e montados em lâminas com 6 µl de glicerol. Após a realização de todas estas etapas os embriões foram então analisados com microscópio invertido de epifluorescência (Olympus IX-81) equipado com filtro de excitação 550nm e emissão de 590nm e as imagens foram obtidas no software Olympus CellSens Dimension (Olympus)

3.4.20 Transfecção de DNA em Células-Tronco Embrionárias

Células-tronco embrionárias bovinas (bESCs), linhagem RB1 foram cultivadas de acordo com o protocolo do Laboratório de Morfologia Molecular do Desenvolvimento (Botigelli, 2021) e transfectadas com o protocolo de lipofecção Lipofectamina 3000 (Thermo-Fischer). Os plasmídeos “px330_Cas9_gRNA_SOX2_1”, “px330_Cas9_gRNA_SOX2_2” e pcDNA 3.1 (contendo cassete de seleção para neomicina, gentilmente cedido por Irene Yan, do

Instituto de Ciências Biomédicas, USP) foram ajustados para a concentração de 750ng/ μ L e incubados juntamente com o vetor doador.

No dia 0 as bESCs foram plaqueadas em placas de 24 poços na seguinte concentração: 5×10^4 células por poço. Após 24 horas foi realizada a transfecção, conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4. Descrição das concentrações (ng/ μ l) de material transfectado nas células-tronco embrionárias bovinas (bESC)

	POÇO A		POÇO B		POÇO C		POÇO D		POÇO E	
Pcdna3.1	750	Pcdna3.1	750	Pcdna3.1	750	Pcdna3.1	750	Pcdna 3.1	750	
Doador I		Doador I	20	Doador II	20	Doador I	10	Doador II	10	
gRNA 1		gRNA 1	750	gRNA 2	750	gRNA 1	750	gRNA 2	750	
Meio E8 (μ l)	95,26	E8	68,52	E8	74,17	E8	80,52	E8	84,17	
TOTAL	100	TOTAL	100	TOTAL	100	TOTAL	100	TOTAL	100	

Legenda. Concentrações de plasmídeos "px330_Cas9_gRNA_SOX2_1", "px330_Cas9_gRNA_SOX2_2" e pcDNA 3.1 e diferentes concentrações de vetor doador (10 ou 20ng) transfectados nas bESCs em meio E8 com Lipofectamina 3000.

Foram utilizados 3 μ l de lipofectamina 3000 e 97 μ l de Meio E8, que foram misturados e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este período de incubação, foi combinado a solução de cada poço (A, B, C, D ou E) com a solução de Lipofectamina em Meio E8, resultando em um volume total de 200 μ l, que foi misturado suavemente e incubado pelo período de 20 minutos. As células tiveram seu meio removido e foi realizada uma lavagem com PBS e somente então foi adicionada a solução de lipofecção que permaneceu em incubação por 3 horas.

Nos dias 2, 3 e 4 o meio foi alterado para meio bES acrescido de 2 μ g/ml de G418, apenas nos poços B e D que havia sido realizada a incubação com plasmídeo PCDNA 3.1 e as imagens foram realizadas com 3, 48 e 72 horas. Cada poço foi congelado e armazenado em -150°C.

3.5. RESULTADOS

Foram realizadas 16 replicatas de microinjeções embrionárias com quatro diferentes concentrações de material injetado e também variou-se o tempo de FIV entre 08 e 16 horas (Tabela 3). Nessas 16 replicatas foram produzidos 102 blastocistos no grupo injetado e 156 blastocistos no grupo controle. Esses blastocistos produzidos foram coletados para genotipagem e verificação da possível inserção da sequência esperada por diferença de tamanho de bandas em eletroforese. Abaixo, nos tópicos subsequentes, estão demonstradas as taxas de Clivagem, Blastocisto e Desenvolvimento dos embriões produzidos de acordo com a concentração de material injetado por embrião, e logo após estão demonstrados os resultados da genotipagem.

3.5.1 Microinjeção embrionária com 75ng/ μ l de mRNA para Cas9-mSA, 50ng/ μ l de gRNA e 20ng/ μ l de sequência doadora

Dentre os embriões microinjetados com esta concentração, foram obtidos 07 blastocistos, porém desses blastocistos nenhum apresentou sinal fluorescente (Figura 12), estes embriões foram então armazenados para genotipagem com kit comercial Extract-N-Amp (Sigma – Aldrich).

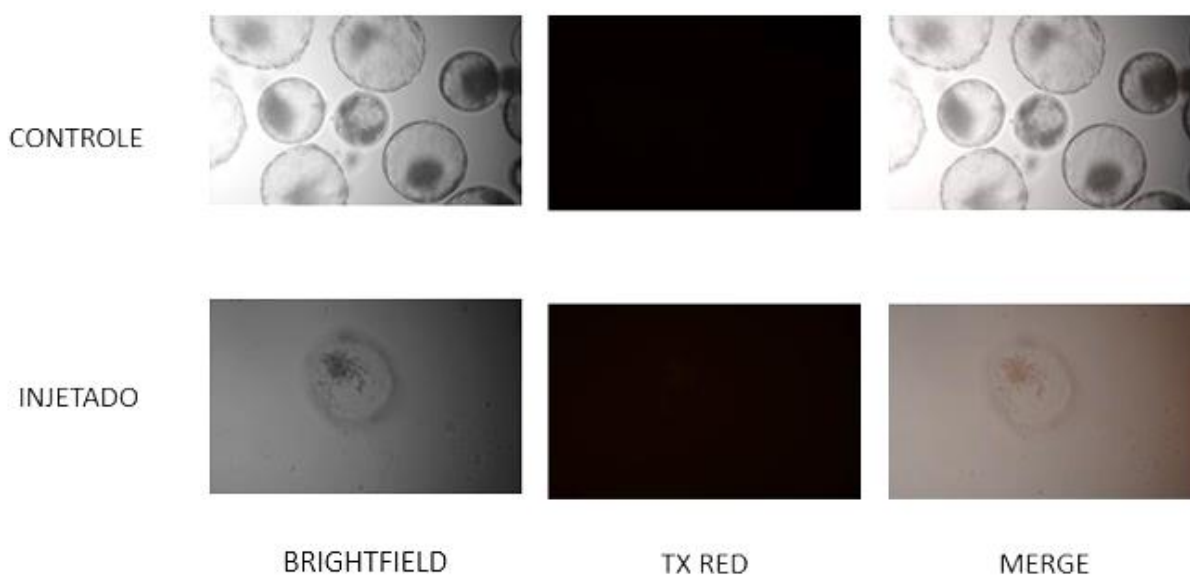


Figura 12. Embriões produzidos in vitro e distribuídos em grupos controle e injetado. A imagem do embrião injetado, retrata um dos embriões do grupo injetado 16 horas após inseminação com as concentrações de 75ng/μl de mRNA para Cas9-mSA, 50ng/μl de gRNA e 20ng/μl de sequências doadoras de DNA, nele é possível observar que não há a fluorescência emitida pela proteína fluorescente mCherry, o que deveria ocorrer caso a recombinação homóloga tivesse sido eficiente.

Na Tabela 5 estão descritas as médias das taxas de clivagem, blastocisto e desenvolvimento dos embriões dos grupos Controle e Injetado, com FIV de 16 horas

Tabela 5 – Média das taxas de Clivagem, Blastocisto e Desenvolvimento com 75ng/μl de mRNA para Cas9 mSA, 50ng/μl de gRNA e 20ng/μl de sequência doadora microinjetados por embrião, obtidas nas replicatas 1, 2 e 3.

Grupo	FIV	Zigotos	Taxas (%)		
			Clivagem	Blastocistos	Desenvolvimento
Controle	16 horas	137	53,7	8	14,8
Injetado	16 horas	176	66,8	4	6

Legenda: Embriões produzidos in vitro com FIV de 16 horas. As microinjeções ocorreram após a FIV em todos os embriões do grupo Injetado. Grupo Controle os embriões não foram injetados.

3.5.2. Microinjeção embrionária com 75ng/μl de mRNA para Cas9-mSA, 50ng/μl de gRNA e 50ng/μl de sequência doadora

Haja vista o insucesso das microinjeções embrionárias realizadas acima, alternativas foram buscadas, e uma delas foi a realização das microinjeções embrionárias oito horas após inseminação (08 hpi).

Os zigotos foram denudados conforme descrito no item 3.4.15 e foram injetadas as quantidades de 75ng/μl de mRNA para Cas9-mSA, 50ng/μl de gRNA e 50ng/μl de sequência doadora (n=320, em 4 replicatas, 2 com FIV de 08 horas e 2 com FIV de 16 horas), os zigotos foram então acondicionados em estufas nas mesmas condições de meio, temperatura e umidade que os embriões anteriores. Após o período de 186hpi estes embriões foram avaliados em microscópio de

epifluorescência para visualização do possível sinal fluorescente esperado caso o inserto (*mCherry*) tivesse sido devidamente incorporado. Todos os blastocistos que foram produzidos no grupo dos embriões injetados foram visualizados no microscópio de epifluorescência, no entanto nenhum apresentou sinal fluorescente.

As taxas de Clivagem, Blastocisto e Desenvolvimento de embriões produzidos com estas concentrações estão demonstradas na Tabela 6.

Tabela 6 – Média das taxas de Clivagem, Blastocisto e Desenvolvimento com 75ng/μl de mRNA para Cas9 mSA, 50ng/μl de gRNA e 50ng/μl de sequência doadora microinjetados por embrião obtidas nas replicatas 4 e 6 (16hpi), e 5 e 7 (8hpi).

Grupo	FIV	Zigotos	Taxas (%)		
			Clivagem	Blastocistos	Desenvolvimento
Controle	16 horas	120	56,5	21,8	38,6
Injetado	16 horas	160	65	8,65	13,3
Controle	08 horas	120	85,3	32,1	37,63
Injetado	08 horas	160	50,8	11,6	22,8

Legenda: Embriões produzidos in vitro com FIV de 08 ou 16 horas. As microinjeções ocorreram após a FIV em todos os embriões do grupo Injetado. Grupo Controle os embriões não foram injetados.

3.5.3. Microinjeção embrionária com 75ng/μl de mRNA para Cas9-mSA, 50ng/μl de gRNA e 100ng/μl de sequência doadora

Foram realizadas outras 4 replicatas de microinjeção embrionária, desta vez foram utilizadas as concentrações de 75ng/μl de mRNA para Cas9-mSA, 50ng/μl de gRNA e 100ng/μl de sequência doadora (n=220, sendo 160 com FIV de 08 horas e 60 com FIV de 16 horas) (Tabela 7). Na avaliação dos blastocistos produzidos no grupo dos embriões injetados em microscópio de epifluorescência, novamente não ocorreu a visualização de sinal fluorescente.

Tabela 7 – Média das taxas de Clivagem, Blastocisto e Desenvolvimento com 75ng/μl de mRNA para Cas9 mSA, 50ng/μl de gRNA e 100ng/μl de sequência doadora microinjetados por embrião obtidas nas replicatas 8, 9 e 10 (8hpi), e 11 (16hpi).

Grupo	FIV	Zigotos	Taxas (%)		
			<i>Clivagem</i>	<i>Blastocistos</i>	<i>Desenvolvimento</i>
Controle	16 horas	40	59,6	10,5	17,6
Injetado	16 horas	60	61,5	9,6	15,6
Controle	08 horas	120	69,6	22,6	32,5
Injetado	08 horas	160	57,4	12,1	21,1

Legenda: Embriões produzidos in vitro com FIV de 08 ou 16 horas. As microinjeções ocorreram após a FIV em todos os embriões do grupo Injetado. Grupo Controle os embriões não foram injetados.

3.5.4. Microinjeção embrionária com 100ng/μl de mRNA para Cas9-mSA, 100ng/μl de gRNA e 100ng/μl de sequência doadora

Em 05 replicatas foram microinjetados 360 zigotos com quantidades de 100ng/μl de mRNA para Cas9-mSA, 100ng/μl de gRNA e 100ng/μl de sequência doadora (200 com FIV de 08 horas e 160 com FIV de 16 horas). Foram produzidos 37 blastocistos e todos foram visualizados em microscópio de fluorescência porém não foi visualizado sinal fluorescente em nenhum deles. As médias das taxas de Clivagem, Blastocisto e Desenvolvimento das replicatas 12 à 16 estão na Tabela 8.

Tabela 8 – Média das taxas de Clivagem, Blastocisto e Desenvolvimento com 100ng/μl de mRNA para Cas9 mSA, 100ng/μl de gRNA e 100ng/μl de sequência doadora microinjetados por embrião obtidas nas replicatas 12, 13 e 14 (8hpi) e 15 e 16 (16hpi)

Grupo	FIV	Zigotos	Taxas (%)		
			<i>Clivagem</i>	<i>Blastocistos</i>	<i>Desenvolvimento</i>
Controle	16 horas	100	65,8	13,1	19,9
Injetado	16 horas	160	48,9	10	20,4
Controle	08 horas	140	78,8	25,5	32,3
Injetado	08 horas	200	57,6	10,4	18

Legenda: Embriões produzidos in vitro com FIV de 08 ou 16 horas. As microinjeções ocorreram após a FIV em todos os embriões do grupo Injetado. Grupo Controle os embriões não foram injetados.

3.5.5 Genotipagem

Foram submetidos à reação de PCR 22 embriões oriundos das replicatas 2, 3, 8, 11, 12 e 14 coletados em estágio de blastocisto em d8 e 12 embriões que não chegaram ao estágio de blastocisto, mas que foram coletados para que se verificasse a possibilidade de a inserção ter ocorrido, mas que a sua viabilidade tivesse ficado comprometida, esses embriões foram oriundos das replicatas 15 e 16.

A eletroforese das amostras deveria evidenciar uma banda de 400 pares de base para a sequência intacta e 1123 pares de base para a sequência com inserção de *mCherry*. Dos 34 embriões testados, 33 apresentaram apenas a banda correspondente ao fragmento de 400 pares de bases, demonstrando que não ocorreu a inserção no local esperado e um embrião apresentou as duas bandas, uma no local correspondente aos 400 pares de bases e outra correspondente ao fragmento de 1123 pares de bases (Figura 13).

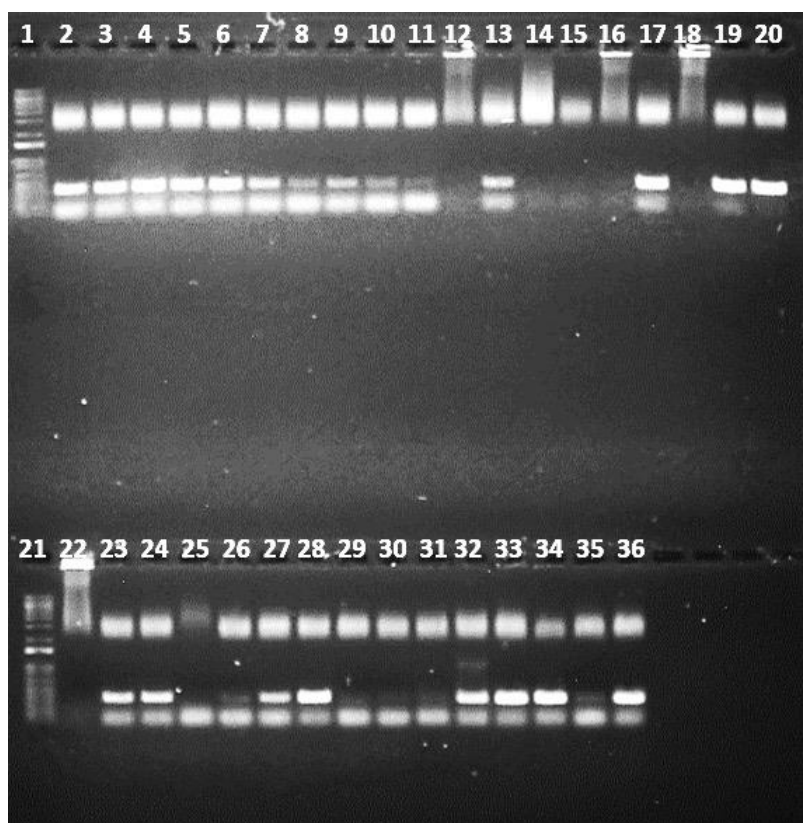


Figura 13. Embriões produzidos in vitro com FIV de 08 ou 16 horas, com diferentes concentrações de material injetado e submetidos à eletroforese em agarose 1%. Poços 1 e 21 correspondem ao marcador DNA Ladder (Invitrogen, by Thermo Fischer Scientific). Poços 2 a 6 correspondem à

replicata 14. Poços 7 a 11 correspondem à replicata 15. Poço 12 corresponde à replicata 02, poços 13 a 16 correspondem à replicata 11. Poços 17 a 20 e 22 são oriundos da replicata 08. Poços 23 a 29 representam embriões da replicata 16. Poço 30 corresponde à replicata 02 e poços 31 a 36 correspondem à replicata 12. Nota-se no poço 32 a formação de duas bandas, uma na altura de 400 pares de bases correspondente à amplificação da sequência sem edição e uma banda na altura correspondente a 1123 pb provavelmente correspondente à amplificação da sequência com inserção.

3.5.6 Imunofluorescência

Foram obtidas imagens de embriões marcados para SOX17 (Figura 14A) e CDX2 (Figura 14B), demonstrando que tanto o protocolo quanto a técnica foram conduzidos de maneira eficaz, no entanto, não foram obtidas marcações com os anticorpos primários anti-SOX2, mesmo após sucessivas tentativas com diferentes ajustes no protocolo.

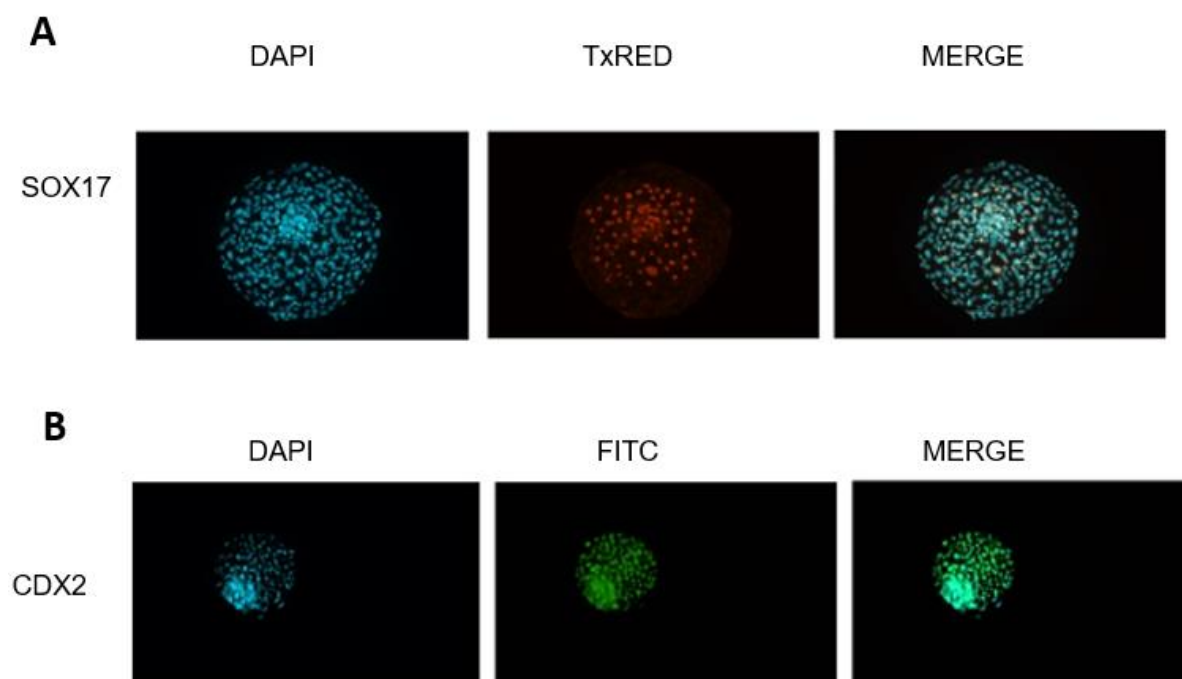


Figura 14. **A.** Embrião produzido in vitro e submetido à reação de imunofluorescência com anticorpo primário goat anti-SOX17 (Novus Biologicals, Littleton, USA, AF1924) em concentração 1:100. **B.** Embrião submetido à imunofluorescência com anticorpo primário rabbit anti-CDX2 (Abcam, ab88129, MA, USA) em concentração 1:50. Estes embriões foram usados como controle positivo da técnica.

3.5.7. Transfecção de DNA em Células-Tronco Embrionárias bovinas

As células com material transfectado foram visualizadas após 3, 48 e 72 horas. Apenas no poço B (Tabela 4) e nas imagens realizadas após 48 horas foi visualizada uma célula com sinal fluorescente (Figura 15). Nos demais poços de cultivo e nos demais horários não foi observado nenhum sinal fluorescente que pudesse indicar a inserção de *mCherry*.

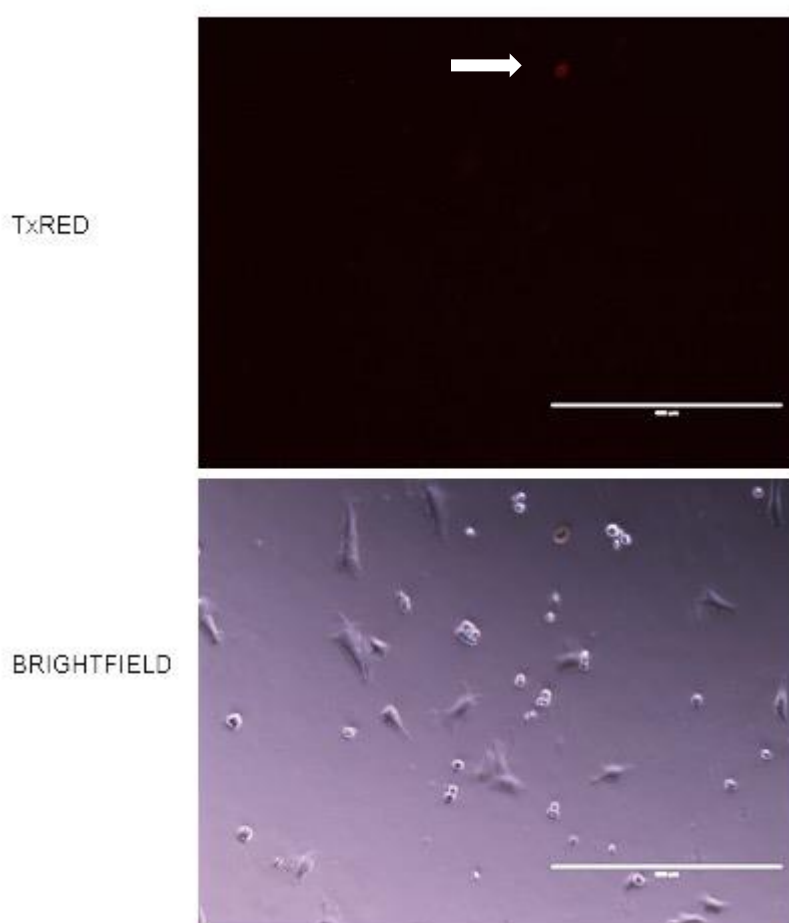


Figura 15. Imagem de microscopia de epifluorescência demonstrando célula com possível inserção de *mCherry*

3.6. DISCUSSÃO

Os objetivos do projeto incluíam inserir uma sequência de proteína fluorescente *mcherry* na região gênica de *SOX2* bovino e comparar a eficiência de

knock-in com uso de microinjeções em diferentes momentos do desenvolvimento embrionário. Em camundongos no estágio de 2 células, o sistema CRISPR/Cas9 tem a possibilidade de maior atuação, pois é justamente neste momento que a cromatina está aberta devido a ativação do genoma embrionário, aumentando a possibilidade de clivagem do DNA e da reparação desta quebra através da recombinação homóloga gerando o *knock-in* (Gu et al, 2018). No entanto, em bovinos a ativação do genoma embrionário acontece em estágios mais avançados, entre 8 e 16 células (Meirelles et al., 2004) e, portanto, a microinjeção em estágio de 2 células não teria a mesma eficiência tanto pelo fato de não ocorrer na janela de tempo que seria mais adequada, quanto pela necessidade de se realizar injeções em cada blastômero, aumentando a chance de morte celular.

Decidiu-se então, realizar as microinjeções embrionárias bovinas em estágio de zigoto, entre 16 e 18 horas após a inseminação das gotas, pois este momento pós-fecundação há maior probabilidade de os zigotos bovinos estarem na fase S do ciclo celular (Comizzoli et al. 2000), quando ocorre a síntese de DNA. Um recente experimento em camundongos realizou microinjeções embrionárias nesta fase e obteve bons resultados, com altas taxas de *knock-in*, utilizando proteína Cas9 associada a um método de recombinação homóloga (Abe et al., 2020).

Deve-se ressaltar, que em estudos mais recentes realizados na espécie bovina, ficou constatado que a replicação do DNA ocorre logo após a fertilização *in vitro*, onde, na ocasião, 40% dos zigotos observados estava replicando seu DNA até 10 hpi, em 20 hpi a maioria já havia replicado o seu DNA ou estava muito próximo de encerrar a fase S (Lamas-Toranzo et al., 2019). No entanto, ainda que tenham obtido altas taxas de *knock-in* direcionado, quando estes pesquisadores realizaram as microinjeções embrionárias em 16 hpi o percentual de mosaicismos ficou próximo de 100%, obtendo embriões mosaico tanto em grupos com a molécula RS-1 quanto em grupos sem esta molécula.

Portanto, decidiu-se realizar além das microinjeções embrionárias no período 16 hpi, realizar também microinjeções às 8 hpi, com o intuito de abranger uma janela de tempo mais adequada para a atuação do sistema CRISPR/Cas9, talvez possibilitando uma boa taxa de *knock-in* com redução do número de embriões mosaicos. No entanto, apesar destas tentativas de se evitar o mosaicismos o único embrião que apresentou a banda de 1123 pares de bases correspondente à inserção de *mCherry*, apresentou também uma banda de 400 pares de bases, que

deveria ser identificada apenas nos embriões controles. Esta visualização pode ser consequência de uma inserção em apenas um dos alelos, pois caso a edição tivesse ocorrido nos dois alelos, uma única banda de 1123 pares de bases deveria ser visualizada. A banda inferior, com 400 pares de base, demonstra um alelo que não foi modificado ou, até mesmo que o sistema CRISPR/Cas9 tenha editado apenas o genoma materno e não paterno ou somente o paterno e não o materno, como observado em humanos (Ma et al., 2017). Apesar da microinjeção neste embrião ter sido realizada às 8 hpi, existe a possibilidade de que a estrutura tenha iniciado a multiplicação do seu conteúdo genético para a primeira divisão celular, e que talvez a Cas9 tenha atingido apenas alguma cópia dos alelos, formando um mosaico.

Reduzir ainda mais o tempo de entrega do sistema CRISPR/Cas9 talvez pudesse ser uma alternativa, assim pensamos em realizar as microinjeções diretamente nos oócitos, no entanto, assim como foi relatado nos experimentos de Lamas-Toranzo et al. (2019), quando realizamos a denudação anterior à FIV e os oócitos foram fertilizados sem a presença das células do cumulus a taxa de clivagem foi muito afetada e o desenvolvimento destes embriões ocorreu de forma muito deficiente. Portanto, acreditamos que, apesar dos resultados descritos aqui não apresentarem uma taxa de knock-in eficiente, o horário de microinjeção as 8hpi seja considerado um bom horário para a entrega dos componentes CRISPR/Cas9 aos zigotos bovinos.

Como descrito, apenas um embrião injetado após FIV de 08 horas e com concentração de 100ng/μl de mRNA para Cas9-mSA, 100ng/μl de gRNA e 100ng/μl de sequência doadora apresentou uma banda referente à inserção de mCherry. No entanto esta verificação só foi possível após genotipagem e verificação da banda em eletroforese. Em visualização em microscópio de epifluorescência não foi encontrado sinal fluorescente, sendo que o esperado era que caso houvesse a inserção da sequência de DNA que codifica mCherry na região gênica de Sox2, no momento da tradução, a proteína fusionada SOX2-mCherry emitisse o sinal fluorescente que seria visualizado nos núcleos das células da MCI.

Uma justificativa encontrada para esta não visualização de sinal fluorescente seria justamente o mosaicismo, que, justificaria algumas ou poucas células alteradas. A visualização de sinal fluorescente poderia ter ocorrido caso a expressão de SOX2 fosse monoalélica e o *knock-in* tivesse ocorrido no alelo expresso, entretanto em células-tronco embrionárias de camundongo sabe-se que a expressão

é bialélica (Li et al. 2014), reforçando a possibilidade de que poucas células apresentaram o *knock-in*.

Outro ponto a ser discutido tem relação com as concentrações de material injetado utilizadas neste experimento. Inicialmente haviam sido propostas as concentrações de 75ng/μl de mRNA para Cas9-mSA, 50ng/μl de gRNA e 20ng/μl de sequências doadoras de DNA, conforme descrito na literatura (Gu et al. 2018). No entanto em estudos realizados com a espécie bovina, melhores resultados foram obtidos quando as concentrações de material injetado foram significativamente aumentadas, chegando a 300ng/μl de mRNA para Cas9, 100ng/μl de RNA guia e 100ng/μl de sequência para recombinação homóloga (Lamas-Toranzo et al., 2020). Estes pesquisadores ainda utilizaram uma molécula facilitadora da recombinação homóloga, a RS-1 (3-N-benzilsulfamoiil) – 4 - 97 bromo – N – (4 – bromofenil) benzamida) (RS-1) que no estudo em questão realizou função semelhante do que testamos neste experimento com o complexo biotina-estreptavidina (Gu et al., 2018). O uso de destes facilitadores de recombinação homóloga é um ponto que precisa ser levado em consideração quando pretende-se realizar a inserção de sequências grandes.

Em nosso trabalho, com o uso do complexo biotina-estreptavidina, visamos induzir a atração física do inserto ao local de corte do complexo Cas9, mas existem outras ferramentas que podem ser utilizadas para que este objetivo seja atingido. A utilização da molécula RS-1 por exemplo, visa o aumento da ativação da via da recombinação homóloga em desfavor da via de junção de extremidades não homólogas (NHEJ), essa modificação do equilíbrio natural das vias, realizado pela RS-1, objetiva favorecer a via da recombinação homóloga, pois na corrida pelo reparo da quebra gerada pelo CRISPR/Cas9, em condições normais, a via NHEJ supera a via da recombinação homóloga (Jayavaradhan et al., 2019; Lamas-Toranzo et al., 2020)

Com frequência a inserção direcionada de fragmentos baseada em recombinação homóloga é dita como desafiadora (Nakao et al, 2015; Yao et al., 2017; Gu et al., 2018; Lamas-Toranzo et al., 2019; Jayavarandhan et al., 2019; Pineault et al., 2019), portanto alternativas para a facilitação da atuação do sistema CRISPR/Cas9 no local certo (Gu et al., 2018) e no momento certo (Lamas-Toranzo et al., 2020) estão em constante estudo, assim como a utilização de moléculas ativadoras da via de recombinação homóloga, como RS-1 (Lamas-Toranzo et al.,

2020), como bloqueadores da via de NHEJ (Jayavarandhan et al., 2019), ou ainda com mecanismos que atrasem o reparo da quebra de fita dupla, aumentando a probabilidade de reparo pela via da HR, como no caso dos inibidores de polimerização de actina, citocalasina B ou D (Nakao et al., 2015).

De 34 embriões injetados e genotipados, apenas 1 embrião apresentou banda compatível com o local de inserção, e devido à falta de constância nas tentativas de amplificação de sequências com oligos que não estivessem contidos dentro do vetor doador, essa confirmação não foi possível. Dado este cenário, a única verificação possível deste resultado foi através da combinação de oligos contidos no vetor doador (Figura 9). Portanto, persiste a dúvida de que talvez a amplificação da banda referente a inserção pudesse estar atrelada ao próprio vetor injetado às 8 hpi.

No entanto foi demonstrado que em células humanas existem mecanismos que previnem a transmissão de DNA entre espécies, semelhante às endonucleases de restrição em bactérias (Stenglein et al., 2010). Estes pesquisadores verificaram que as proteínas APOBEC3 medeiam a degradação de DNA exógeno, sendo esta a sua importante função fisiológica. Por exemplo, APOBEC3A leva a degradação de DNA exógeno quando expressado em células em cultivo (Stenglein et al., 2010). Foi demonstrado que APOBEC3A é expresso em células tronco embrionárias (Tesar et al., 2007, Najm et al., 2011), e assim como em humanos, este sistema de restrição de DNA exógeno possivelmente atue em outros vertebrados (Stenglein et al., 2010), fazendo com que esta proteína seja capaz de estar presente nos embriões e levar a degradação de DNA exógeno durante o desenvolvimento, o que pode explicar detecção de inserção em apenas um dos embriões e sugerir que a banda amplificada esteja realmente inserida no DNA genômico.

Em conclusão, apesar do objetivo principal não ter sido alcançado, um passo importante foi dado, visto que um blastocisto bovino editado, ainda que de forma monoalélica e mosaico foi obtido. Isto sugere que as construções moleculares, a escolha e a utilização do complexo biotina-estreptavidina como facilitador de recombinação homóloga, bem como os ajustes de tempo de FIV e de concentração de materiais para a microinjeção podem ser ajustados para a obtenção de melhores resultados.

4. Considerações Finais

Os mecanismos relacionados à primeira diferenciação celular entre MCI e o TE seguidos pela diferenciação entre epiblasto e endoderma primitivo PE são intensamente estudados em camundongos, no entanto em bovinos estes mecanismos ainda carecem de informações mais precisas. Um maior entendimento acerca destes eventos pode fazer com que o processo de produção *in vitro* de embriões seja otimizado como um todo, aumentando as taxas de produção de embriões e diminuindo as perdas embrionárias tanto durante o cultivo e também as perdas gestacionais.

Alternativas como a remoção do SFB durante cultivo embrionário bovino *in vitro* podem auxiliar os pesquisadores a intensificarem os seus processos de produção de embriões, controlando melhor o seu ambiente de cultivo, resultando em resultados com maior robustez. Aqui verificou-se que não há diminuição de produção de blastocistos quando foram combinados a retirada do componente SFB da etapa de CIV com renovação do meio KSOM às 90hpi, gerando resultados mais confiáveis para nossas pesquisas sobre a diferenciação celular.

Ainda mais inovadoras, as ferramentas de edição gênica via CRISPR estão revolucionando a forma como os estudos moleculares são realizados. A inserção de proteínas repórteres fluorescentes abre caminho para possibilidades ainda pouco descritas, gerando conteúdo científico de alta qualidade e profundidade. A possibilidade de acompanhamento do desenvolvimento das linhagens celulares em tempo real é uma ferramenta importante, no entanto ainda é desafiadora e mais estudos são necessários para que a técnica de inserção gênica em embriões bovinos continue sendo aprimorada.

Por fim, uma melhor compreensão dos mecanismos de diferenciação celular poderá construir um sólido caminho acerca da otimização dos processos de PIVE e do aumento cada vez maior das taxas de produção. Aliado a isso, a construção de modelos *knock-in* e principalmente a possibilidade de inserções e deleções dirigidas abre um horizonte de grandes possibilidades para o futuro tanto para pesquisa básica, quanto para estudos aplicados, despontando como uma das mais importantes e promissoras ferramentas para o melhoramento genético do futuro.

5. REFERÊNCIAS

- ABE, H., YAMASHITA, S., ITOH, T., SATOH, T., HOSHI, H., 1999. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. **Mol. Reprod. Dev.** 53, 325–35. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199907\)53:3<325::AID-MRD8>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199907)53:3<325::AID-MRD8>3.0.CO;2-T)
- ABE, T; INOUE. K; FURUTA, Y; KIYONARI H. Pronuclear Microinjection during S-Phase Increases the Efficiency of CRISPR-Cas9-Assisted Knockin of Large DNA Donors in Mouse Zygotes. **Cell Reports**. Volume 31, Edição 7, 19 de maio de 2020, 107653.
- AVILION AA, NICOLIS SK, PEVNY LH, PEREZ L, VIVIAN N, LOVELL-BADGE R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. **Genes Dev.** 2003 Jan 1;17(1):126-40.
- BARNETT, D.K., BAVISTER, B.D., 1996. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? **Mol. Reprod. Dev.** 43, 105–33. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199601\)43:1<105::AID-MRD13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199601)43:1<105::AID-MRD13>3.0.CO;2-4)
- BAVISTER, B.D., LEIBFRIED, M.L., LIEBERMAN, G., 1983. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biol. Reprod.** 28, 235–247. <https://doi.org/10.1095/biolreprod28.1.235>
- BEHRINGER, R., GERTSENSTEIN, M., VINTERSTEN, K., NAGY, A., 2003. Manipulating the Mouse Embryo - **A laboratory manual**, Third edit. ed. Cold Spring Harbor (New York): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- BERG DK, SMITH CS, PEARTON DJ, WELLS DN, BROADHURST R, DONNISON M, PFEFFER PL. Trophectoderm lineage determination in cattle. **Dev Cell.** 2011 20(2):244-55.
- CANIZO, J.R., RIVOLTA, A.E.Y., ECHEGARAY, C.V., SUVÁ, M., ALBERIO, V., ALLER, J.F., GUBERMAN, A.S., SALAMONE, D.F., ALBERIO, R.H., ALBERIO, R., 2019. A dose-dependent response to MEK inhibition determines hypoblast fate in bovine embryos 9, 1–13.
- CHI, F., SHARPLEY, M.S., NAGARAJ, R., ROY, S. SEN, BANERJEE, U., 2020. Glycolysis-Independent Glucose Metabolism Distinguishes TE from ICM Fate during Mammalian Embryogenesis. **Dev. Cell** 53, 9-26.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.02.015>
- COCKBURN, K. & ROSSANT, J. Making the blastocyst: lessons from the mouse. **J. Clin. Invest.** 120, 995–1003 (2010).
- COMIZZOLI, P; MARQUANT-LE GUIENNE, B; HEYMAN, Y; and RENARD, J.P. Onset of the First S-Phase Is Determined by a Paternal Effect During the G1-Phase In Bovine Zygotes. **Biology of reproduction** 62, 1677–1684, 2000.

- CONG L, RAN FA, COX D, LIN S, BARRETTO R, HABIB N, HSU PD, WU X, JIANG W, MARRAFFINI LA, ZHANG F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**. 2013 Feb 15;339(6121):819-23. doi: 10.1126/science.1231143.
- COSTA CP da, ASSUMPÇÃO M. E. O A, GOISSIS MD. Sistema CRISPR/Cas9 e perspectivas de aplicações na cadeia produtiva animal. **Rev Bras Reprodução Anim** 2021;45:18–32. <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2021.003>.
- DA SILVA, J.S.; BORGES, L.S.; MARTINS, L.E.L.L.; LIMA, L.A.; BARBOSA, Y.G.S; SILVA, N.A.; PAIVA BRITO T.K. Aspectos comerciais da transferência de embriões e fertilização in vitro em bovinos – revisão. **Nutritime Revista Eletrônica**. Vol. 12, Nº 05, set/out de 2015 ISSN: 1983-9006. 2015.
- DAIGNEAULT BW, RAJPUT S, SMITH GW, ROSS PJ. Embryonic POU5F1 is Required for Expanded Bovine Blastocyst Formation. **Sci Rep**. 2018 May 17;8(1):7753.
- de LIMA, C.B., DOS SANTOS, É.C., ISPADA, J., FONTES, P.K., NOGUEIRA, M.F.G., DOS SANTOS, C.M.D., MILAZZOTTO, M.P., 2020. The dynamics between in vitro culture and metabolism: embryonic adaptation to environmental changes. **Sci. Rep**. 10, 15672. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72221-1>
- DE SOUSA RV, DA SILVA CARDOSO CR, BUTZKE G, DODE MA, RUMPF R, FRANCO MM. Biopsy of bovine embryos produced in vivo and in vitro does not affect pregnancy rates. **Theriogenology**. 2017 Mar 1;90:25-31.
- DUMOLLARD, R., WARD, Z., CARROLL, J., DUCHEN, M.R., 2007. Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. **Development**. 2007. doi.org/10.1242/dev.02744
- FARIN, C.E., FARIN, P.W., PIEDRAHITA, J.A., 2004. Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. **J. Anim. Sci**. 82 E-Suppl, E53-62. https://doi.org/10.2527/2004.8213_supplE53x
- FERRÉ, L.B., KJELLAND, M.E., TAIYEB, A.M., CAMPOS-CHILLON, F., ROSS, P.J., 2020. Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. **Reprod. Domest. Anim**. 55, 659–676. <https://doi.org/10.1111/rda.13667>
- FILHO, K. E.; ALENCAR, M. M.; CEZAR, I. M.; FÁVERO, J. A.; VASCONCELOS, V. R.; COLLARES, R. S. **Cadeias produtivas como plataformas para o desenvolvimento da ciência, da tecnologia e da inovação** / Kepler Euclides Filho [et al.]. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 133 p. 2002.
- FOGARTY NME, MCCARTHY A, SNIJDERS KE, POWELL BE, KUBIKOVA N, BLAKELEY P, LEA R, ELDER K, WAMAITHA SE, KIM D, MACIULYTE V, KLEINJUNG J, KIM JS, WELLS D, VALLIER L, BERTERO A, TURNER JMA, NIAKAN KK. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. **Nature**. 2017 Nov 9;551(7679):256.
- FRANKENBERG, S., GERBE, F., BESSONNARD, S., BELVILLE, C., POUCHIN, P., BARDOT, O., CHAZAUD, C., 2011. Primitive Endoderm Differentiates via a Three-Step Mechanism Involving Nanog and RTK Signaling. **Dev. Cell** 21, 1005–1013. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.019>

- FRANKENBERG, S.R., DE BARROS, F.R.O., ROSSANT, J., RENFREE, M.B., 2016. The mammalian blastocyst. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 5, 210–232. <https://doi.org/10.1002/wdev.220>
- GOISSIS MD, CIBELLI JB. Functional characterization of CDX2 during bovine preimplantation development in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2014b Oct;81(10):962-70.
- GOISSIS MD, CIBELLI JB. Functional characterization of SOX2 in bovine preimplantation embryos. *Biol Reprod.* 2014a Feb 13;90(2):30.
- GÓMEZ, E., RODRÍGUEZ, A., MUÑOZ, M., CAAMAÑO, J.N., HIDALGO, C.O., MORÁN, E., FACAL, N., DÍEZ, C., 2008. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology* 69, 1013–1021. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.015>
- GOPICHANDRAN, N., LEESE, H.J., 2003. Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophoctoderm and blastocoel fluid. *Reproduction.* 126, 299–308. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260299>
- GORDON, I., 2003. **Laboratory production of cattle embryos.** CABI, Wallingford. <https://doi.org/10.1079/9780851996660.0000>
- GU B, POSFAI E, ROSSANT J. Efficient generation of targeted large insertions by microinjection into two-cell-stage mouse embryos. *Nature Biotechnology.* 2018 Jun.10.1038/nbt.4166.
- HEWITSON, L.C., LEESE, H.J., 1993. Energy metabolism of the trophoctoderm and inner cell mass of the mouse blastocyst. *J. Exp. Zool.* 267, 337–343. <https://doi.org/10.1002/jez.1402670310>
- HOUGHTON, F.D., 2006. Energy metabolism of the inner cell mass and trophoctoderm of the mouse blastocyst. *Differentiation* 74, 11–18. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00052.x>
- JACOBSEN, H., SCHMIDT, M., HOLM, P., SANGILD, P.T., VAJTA, G., GREVE, T., CALLESEN, H., 2000. Body dimensions and birth and organ weights of calves derived from in vitro produced embryos cultured with or without serum and oviduct epithelium cells. *Theriogenology* 53, 1761–1769. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00312-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00312-5)
- JAYAVARADHAN, R., PILLIS, D.M., GOODMAN, M. *et al.* CRISPR-Cas9 fusion to dominant-negative 53BP1 enhances HDR and inhibits NHEJ specifically at Cas9 target sites. *Nat Commun*, 2866 (2019). doi.org/10.1038/s41467-019-10735-7
- KANG, M., PILISZEK, A., ARTUS, J., HADJANTONAKIS, A.-K., 2013. FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. *Development* 140, 267–279. <https://doi.org/10.1242/dev.084996>
- KIM, J., SONG, G., WU, G., BAZER, F.W., 2012. Functional roles of fructose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E1619–E1628. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204298109>
- KIM, J.-Y., BURGHARDT, R.C., WU, G., JOHNSON, G.A., SPENCER, T.E., BAZER, F.W., 2011. Select Nutrients in the Ovine Uterine Lumen. VII. Effects of Arginine, Leucine, Glutamine, and Glucose on Trophoctoderm Cell Signaling, Proliferation, and Migration1. *Biol. Reprod.* 84, 62–69. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.085738>

- KOO DB, KANG YK, CHOI YH, PARK JS, KIM HN, OH KB, SON DS, PARK H, LEE KK, HAN MH. Aberrant Allocations of Inner Cell Mass and Trophectoderm Cells in Bovine Nuclear Transfer Blastocysts. *BIO REPRODUCTION*. 2002 Feb.
- KRISHER, R.L., LANE, M., BAVISTER, B.D., 1999. Developmental Competence and Metabolism of Bovine Embryos Cultured in Semi-Defined and Defined Culture Media1. *Biol. Reprod.* 60, 1345–1352. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.6.1345>
- KUIJK, E.W., VAN TOL, L.T.A., VAN DE VELDE, H., WUBBOLTS, R., WELLING, M., GEIJSEN, N., ROELEN, B.A.J., 2012. The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Development* 139, 871–882. <https://doi.org/10.1242/dev.071688>
- LAMAS-TORANZO I, GALIANO-COGOLLUDO B, CORNUDELLA-ARDIACA F, COBOS-FIGUEROA J, OUSINDE O, BERMEJO-ÁLVAREZ P. Strategies to reduce genetic mosaicism following CRISPR-mediated genome edition in bovine embryos. *Sci Rep.* 2019 Oct 17;9(1):14900. doi: 10.1038/s41598-019-51366-8. PMID: 31624292; PMCID: PMC6797768.
- LAMAS-TORANZO, I., RAMOS-IBEAS, P., PERICUESTA, E., & BERMEJO-ÁLVAREZ, P. (2018). Directions and applications of CRISPR technology in livestock research. *Animal Reproduction*, 15(3), 292–300. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0075>
- LAMAS-TORANZO, L; MARTÍNEZ-MORO, A; O'CALLAGHAN, E; MILLÁN-BLANCA, G; SÁNCHEZ, J.M; LONERGAN, P; AND BERMEJO-ÁLVAREZ, P. RS-1 enhances CRISPR-mediated targeted knock-in in bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*. doi.org/10.1002/mrd.23341. 2020.
- LANNER, F., LEE, K.L., SOHL, M., HOLMBORN, K., YANG, H., WILBERTZ, J., POELLINGER, L., ROSSANT, J., FARNEBO, F., 2010. Heparan sulfation-dependent fibroblast growth factor signaling maintains embryonic stem cells primed for differentiation in a heterogeneous state. *Stem Cells* 28, 191–200. <https://doi.org/10.1002/stem.265>
- LAZZARI, G., WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., DUCHI, R., KRUIP, T., NIEMANN, H., GALLI, C., 2002. Cellular and Molecular Deviations in Bovine In Vitro-Produced Embryos Are Related to the Large Offspring Syndrome1. *Biol. Reprod.* 67, 767–775. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004481>
- LEESE, H.J., 2012. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 Years on. *Reproduction* 143, 417–427. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0484>
- LI, Y; RIVERA, C. M; ISHII, H; JIN, F; SELVARAJ, S; LEE, A. Y; DIXON, J. R; REN, B. *PLOS ONE*. 2014; 9(12): e114485. Published online 2014 Dec 8. doi: 10.1371/journal.pone.0114485
- LUSTOSA AA, BARBOZA NA, BARBOSA YGS, RODRIGUES PKO, MAGALHÃES NETO FCR. Aspectos relevantes na produção comercial de embriões bovinos por meio da técnica biotecnológica de fertilização *in vitro*: Revisão. *PubVet*, 2018 Mar. V12n3a51.1-6.
- MA, H., MARTI-GUTIERREZ, N., PARK, SW. *et al.* Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 548, 413–419(2017). <https://doi.org/10.1038/nature23305>

MARTIN, K.L., LEESE, H.J., 1995. Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. **Mol. Reprod. Dev.** 40, 436–443.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1080400407>

MEIRELLES, F. V.; CAETANO, A. R.; WATANABE, Y. F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S. F.; MERIGHE, G. K.; GARCIA, S. M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 13-20, 2004

MESALAM, A., KONG, R., KHAN, I., CHOWDHURY, M., CHOI, B.-H., KIM, S.W., CHO, K.-W., JIN, J.-I., KONG, I.-K., 2017. Effect of charcoal:dextran stripped fetal bovine serum on in vitro development of bovine embryos. **Reprod. Biol.** 17, 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.09.002>

NAJM F.J, CHENOWETH, J. G, ANDERSON P. D, NADEAU, J. H, REDLINE, R. W, MCKAY, R. D. G. TESAR P. Cell Stem Cell. Author manuscript; available in PMC 2012 Mar 4. Published in final edited form as: Cell **Stem Cell**. 2011 Mar 4; 8(3): 318–325. doi: 10.1016/j.stem.2011.01.016

NAKAO, H., HARADA, T., NAKAO, K., KIYONARI, H., INOUE, K., FURUTA, Y. AND AIBA, A. (2016), A possible aid in targeted insertion of large DNA elements by CRISPR/Cas in mouse zygotes. **genesis**, 54: 65-77. <https://doi.org/10.1002/dvg.22914>

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J., WINER, M.A., FIRST, N.L., 1988. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin¹. **Biol. Reprod.** 38, 1171–1180.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod38.5.1171>

PESCE M., SCHOLER HR. Oct-4: control of totipotency and germline determination. **Mol Reprod Dev.** 2000; 55:452-457.

PEVNY LH, LOVELL-BADGE R. Sox genes find their feet. 1997. Current opinion in **genetics & development.** 7:338–344.

PIB DO AGRONEGÓCIO. **CNA - Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil e CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - ESALQ/USP.** 13 set 2021. Disponível em:
[https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Cepea_PIB_CNA_1semestre_21\(2\).pdf](https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Cepea_PIB_CNA_1semestre_21(2).pdf)

PINEAULT, K. M; NOVOA, A; LOZOVSKA, A; WELLIK, D. M; MALLO, M. Two CRISPR/Cas9-mediated methods for targeting complex insertions, deletions, or replacements in mouse, **MethodsX**, Volume 6, 2019, Pages 2088-2100, ISSN 2215 0161, <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.09.003>.

PONTES JH, NONATO-JUNIOR I, SANCHES BV, ERENO-JUNIOR JC, UVO S, BARREIROS TR, OLIVEIRA JA, HASLER JF, SENEDA MM. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (Bos indicus) donor cows. **Theriogenology.** 2009 Mar 1;71(4):690-7.

REX M, UWANOGHO D, CARTWRIGHT, PEARL G, SHARPE PT, SCOTTING PJ. Sox gene expression during neuronal development. **Biochemical Society Transactions.** 1994, Aug. 22(3)252.

- RIZOS, D., FAIR, T., PAPADOPOULOS, S., BOLAND, M.P., LONERGAN, P., 2002. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Mol. Reprod. Dev.** 62, 320–327. <https://doi.org/10.1002/mrd.10138>
- SAEKI, K., HOSHI, M., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., FIRST, N.L., 1991. In Vitro Fertilization and Development of Bovine Oocytes Matured in Serum-Free Medium1. **Biol. Reprod.** 44, 256–260. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.2.256>
- SAIZ, NESTOR, KANG, M., SCHRODE, N., LOU, X., HADJANTONAKIS, A.-K., 2016. Quantitative Analysis of Protein Expression to Study Lineage Specification in Mouse Preimplantation Embryos. **J. Vis. Exp.** 1–13. <https://doi.org/10.3791/53654>
- SAIZ, NÉSTOR, WILLIAMS, K.M., SESHAN, V.E., HADJANTONAKIS, A.K., 2016. Asynchronous fate decisions by single cells collectively ensure consistent lineage composition in the mouse blastocyst. **Nat. Commun.** 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13463>
- SANTOS, É.C. DOS, FONSECA JUNIOR, A.M. DA, LIMA, C.B. DE, ISPADA, J., SILVA, J.V.A. DA, MILAZZOTTO, M.P., 2021. Less is more: Reduced nutrient concentration during in vitro culture improves embryo production rates and morphophysiology of bovine embryos. **Theriogenology** 173, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.07.010>
- STENGLEIN, M., BURNS, M., LI, M. *et al.* APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. **Nat Struct Mol Biol** 17, 222–229 (2010). <https://doi.org/10.1038/nsmb.1744>
- STRINGFELLOW, D.A., GIVENS, M.D., WALDROP, J.G., 2004. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. **Reprod. Fertil. Dev.** 16, 93. <https://doi.org/10.1071/RD03082>
- TAKAHASHI, Y., FIRST, N.L., 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology** 37, 963–78. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(92\)90096-a](https://doi.org/10.1016/0093-691x(92)90096-a)
- TESAR, P., CHENOWETH, J., BROOK, F. *et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. **Nature** 448, 196–199 (2007). <https://doi.org/10.1038/nature05972>
- THOMPSON, J., 2000. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos — a decade of achievement. **Anim. Reprod. Sci.** 60–61, 263–275. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00096-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00096-8)
- USHIJIMA H, AKIYAMA K, TAJIMA T. Transition of cell numbers in bovine preimplantation embryos: in vivo collected and in vitro produced embryos. **J Reprod Dev.** 2008 Aug;54(4):239-43. doi: 10.1262/jrd.19128. Epub 2008 Apr 28. PMID: 18441502.
- VAN LANGENDONCKT, A., DONNAY, I., SCHUURBIERS, N., AUQUIER, P., CAROLAN, C., MASSIP, A., DESSY, F., 1997. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. **Reproduction** 109, 87–93. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1090087>

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M., MULLAART, E., DE ROOS, A.P.W., MERTON, J.S., DEN DAAS, J.H.G., KEMP, B., DE RUIGH, L., 2000. Effects of different reproduction techniques: AI, moet or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology** 53, 575–597. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00259-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00259-9)

VIANA, JHM. Estatísticas do mercado de embriões. **Jornal O Embrião**. SBTE 67, p.26-31, 2021

YAMANAKA, Y., LANNER, F., ROSSANT, J., 2010. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. **Development** 137, 715–724. <https://doi.org/10.1242/dev.043471>

YAO, X., WANG, X., HU, X. *et al.* Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. **Cell Res** 27, 801–814 (2017). <https://doi.org/10.1038/cr.2017.76>

Anexos

Anexo 1

Sequências de oligonucleotídeos utilizados no projeto. Nucleotídeos representados com letra minúscula correspondem a sequências acessórias para clonagem molecular.

Oligonucleotídeo	Sequência
gRNA1 Fwd	caccGTGAGGGCCGGACGGTGAAC
gRNA1 Rev	aaacGTTACCGTCCGGCCCTCAC
gRNA2 Fwd	aaacGTTACCGTCCGGCCCTCA
gRNA2 Rev	aaacTCCGGCCCTCACATGTGCGAC
SOX2 Fwd 5' short arm Hind	atcgtgaagcttGTGTGGTGTGACCTGTTGCTG
SOX2 5' Eco Rev	attagcgaattcCATGTGCGAGAGGGGCAG
SOX2 3' arm Fwd	tgtacaagcccgggggatccGGGCCGGACGGTGAAGTGA
SOX2 3'arm Rev	tgtacaagcccgggggatccGGTACTCTGCGTTCTTGGCTGA
SOX2 GenAmp Fwd	CTGGTGGTCGTCAAACCTCTGC
SOX2 GenAmp Rev	AAACACCCACCCAGCAGATGAG
SOX2 biotin Fwd	TGCAGGAGTTCAGGAGGGAAATATG
SOX2 biotin Rev	GGTACTCTGCGTTCTTGGCTGA
SOX2 detec mutation Fwd	TATGACCAGCTCGCAGACCTAC

SOX2 detec mutation Rev 1	CTTGCTGTCCTCCATTTCCCT
SOX2 detec mutation Rev 2	GTGTGGATGGGATTGGCGTT
pBS seq Fwd	CCCAATACGCAAACCGCCTC
pBS seq Rev	TAATAGCGAAGAGGCCCGCAC
U6 seq primer	CAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGA
mCherry Fwd seq	CCCCGTAATGCAGAAGAAGA
mCherry Rev seq	TTGGTCACCTTCAGCTTGG

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

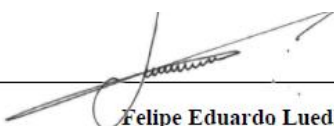
DECLARAÇÃO DE USO DE CONTEÚDO CIENTÍFICO

São Paulo, 14 de outubro de 2021.

Declaramos para os devidos fins que o artigo intitulado “**Effects of fetal bovine serum on trophoctoderm and primitive endoderm cell allocation of in vitro produced bovine embryos**” submetido para publicação em revista internacional durante o período de mestrado do aluno Felipe Eduardo Luedke (Nº USP 11105630) não será utilizado em outra dissertação ou tese, sendo de uso exclusivo para a presente dissertação de mestrado.

Declaramos ainda que o autor principal deste artigo é o aluno responsável pela presente dissertação. A submissão do conteúdo foi realizada em revista internacional e até o presente momento segue-se no aguardo do parecer.

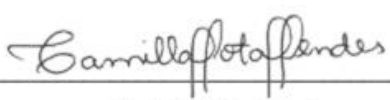
Cientes e de acordo.



Felipe Eduardo Luedke
1º Autor



Caroline Pereira da Costa
2ª Autora



Camilla Mota Mendes
3ª Autora



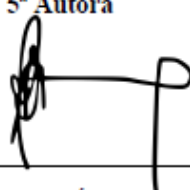
Thais Rose dos Santos Hamilton

4ª Autora



Marcella Pecora Milazzotto

5ª Autora



Mayra Elena Ortiz Ávila Assumpção

6ª Autora



Marcelo Demarchi Goissis

7º Autor e Orientador