



# Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas

**Biotecnologia  
aplicada à agricultura**

Hugo Bruno Correa Molinari  
Letícia Rios Vieira  
Nathalia Volpi e Silva  
Guilherme Souza Prado  
José Hernandez Lopes Filho

Editores Técnicos

**Embrapa**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agroenergia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas

Biotecnologia aplicada à agricultura

*Hugo Bruno Correa Molinari  
Letícia Rios Vieira  
Nathalia Volpi e Silva  
Guilherme Souza Prado  
José Hernandes Lopes Filho*

Editores Técnicos

**Embrapa**  
*Brasília, DF  
2020*

**Embrapa Agroenergia**  
Parque Estação Biológica (PqEB), s/n  
Ed. Embrapa Agroenergia  
Caixa Postal 40315  
CEP 70770-901, Brasília, DF  
Fone: +55 (61) 3448-1581  
Fax: +55 (61) 3448-1589  
www.embrapa.br/agroenergia  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

**Responsável pelo conteúdo e pela edição**  
Embrapa Agroenergia

**Comitê Local de Publicações**

Presidente  
*Patrícia Verardi Abdelnur*

Secretária-executiva  
*Lorena Costa Garcia Calsing*

Membros  
*Adilson Kobayashi*  
*André Leão*  
*Dasciana Rodrigues*  
*Emerson Léo Schultz*  
*Felipe Carvalho*  
*Thaís Salum*  
*Wesley Leal*

Supervisão editorial e revisão de texto  
*Luciane Chedid Melo Borges*

Normalização bibliográfica  
*Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes*  
*Ana Lucia Delalibera de Faria*  
*Carla Cristiane Osawa*  
*Valéria de Fátima Cardoso*

Projeto gráfico, diagramação e capa  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

**1ª edição**  
Publicação digital - PDF (2020)

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Agroenergia

---

Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura / Hugo Bruno Correa Molinari ... [et al.], editores técnicos. – Brasília, DF : Embrapa, 2020.  
PDF (207 p.) : il. color.

ISBN 978-65-86056-43-3

1. CRISPRevolution. 2. Biotecnologia. 3. Genoma de planta. I. Vieira, Leticia Rios. II. Silva, Nathalia Volpi e. III. Prado, Guilherme Souza. IV. Lopes Filho, José Hernandes. V. Embrapa Agroenergia. V. Título.

CDD 631.52

# Autores

## **Adilson Kenji Kobayashi**

Biólogo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF

## **Alexandre Lima Nepomuceno**

Engenheiro-agrônomo, doutor em Biologia Molecular e Fisiologia de Plantas, pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR

## **Bruno de Oliveira Garcia**

Engenheiro de bioprocessos e biotecnologia, mestre em Biotecnologia Vegetal, doutorando da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

## **Bruno Paes de Melo**

Bioquímico, doutor em Bioquímica Aplicada, bolsista de pós-doutorado da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

## **Carolina Vianna Morgante**

Bióloga, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE

## **Clidia Eduarda Moreira Pinto**

Bióloga, doutora em Biologia Molecular, bolsista de pós-doutorado da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

## **Edivaldo Domingues Velini**

Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, professor da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP

## **Eduardo Romano de Campos Pinto**

Biólogo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

## **Elton Gargioni Grisoste Barbosa**

Biólogo, mestre em Genética e Biologia Molecular, doutorando da Universidade de Cambridge, Reino Unido

## **Fabrcio Barbosa Monteiro Arraes**

Biólogo, doutor em Biologia Celular e Molecular, bolsista de pós-doutorado da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

## **Fernanda Justen**

Bióloga, mestre em Tecnologias Química e Biológica, especialista visitante da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF

## **Fernanda Rausch Fernandes**

Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Informática Agropecuária e do Centro de Pesquisa em Genômica Aplicada às Mudanças Climáticas (GCCRC), Campinas, SP

## **Galdino Andrade**

Biólogo, doutor em Ecologia Microbiana, professor da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR

## **Guilherme Souza Prado**

Biotecnologista, doutor em Ciências Genômicas e Biotecnologia, especialista visitante da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

## **Hugo Bruno Correa Molinari**

Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF

## **Isabel Rodrigues Gerhardt**

Engenheira-agrônoma, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Informática Agropecuária e do Centro de Pesquisa em Genômica Aplicada às Mudanças Climáticas (GCCRC), Campinas, SP

## **Jéssika Angelotti-Mendonça**

Engenheira-agrônoma, doutora em Ciências (Fitotecnia), especialista visitante da Embrapa Soja, Londrina, PR

## **José Hernandes Lopes Filho**

Biólogo, doutor em Ciências (Botânica), especialista visitante da Embrapa Informática Agropecuária e do Centro de Pesquisa em Genômica Aplicada às Mudanças Climáticas (GCCRC), Campinas, SP

## **Josenilda Carlos dos Santos**

Bióloga, doutora em Microbiologia Agrícola, bolsista de pós-doutorado da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

## **Josias Correa de Faria**

Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

**Juliana Erika de Carvalho Teixeira Yassitepe**

Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Informática Agropecuária e do Centro de Pesquisa em Genômica Aplicada às Mudanças Climáticas (GCCRC), Campinas, SP

**Larissa Girotto**

Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, especialista visitante da Embrapa Soja, Londrina, PR

**Letícia Rios Vieira**

Bióloga, doutora em Biotecnologia Vegetal, consultora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF

**Liliane Marcia Mertz-Henning**

Engenheira-agrônoma, doutora em Ciência e Tecnologia de Semente, pesquisadora da Embrapa Soja, Londrina, PR

**Maria Fatima Grossi-de-Sa**

Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

**Maria Lucia Zaidan Dagli**

Médica veterinária, doutora em Patologia Experimental e Comparada, professora da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

**Maria Sueli Soares Felipe**

Química, doutora em Bioquímica, professora da Universidade Católica de Brasília e professora aposentada emérita da Universidade de Brasília, Brasília, DF

**Mayla Daiane Correa Molinari**

Engenheira agrônoma, doutora em Genética e Biologia Molecular, especialista visitante da Embrapa Soja, Londrina, PR

**Natália Chagas Freitas**

Biotecnologista, doutora em Biotecnologia Vegetal, especialista visitante da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF

**Nathalia Volpi e Silva**

Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, especialista visitante da Embrapa Soja, Londrina, PR

**Patricia Machado Bueno Fernandes**

Bióloga, doutora em Bioquímica, professora da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES

**Renata Fuganti-Pagliarini**

Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento, líder da Plataforma de Biologia Celular do Global Institute for Food Security, Saskatoon, Saskatchewan, Canadá

**Ricardo Augusto Dante**

Biólogo, Ph.D. em Plant Sciences, pesquisador da Embrapa Informática Agropecuária e do Centro de Pesquisa em Genômica Aplicada às Mudanças Climáticas (GCCRC), Campinas, SP

**Rosana Pereira Vianello**

Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

**Thaísa Tessutti Pinheiro**

Bióloga, doutora em Ciências, especialista visitante da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

**Vívian de Jesus Miranda**

Bióloga, doutora em Ciências Genômicas e Biotecnologia, especialista visitante da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF

**Viviane Cristina Heinzen da Silva**

Bióloga, doutora em Ciências (Biologia Funcional e Molecular - Bioquímica), bolsista de pós-doutorado da Universidade Estadual de Campinas e colaboradora no Centro de Pesquisa em Genômica Aplicada às Mudanças Climáticas (GCCRC), Campinas, SP

Agradecemos a  
todos os envolvidos  
na criação desta obra.



# Apresentação

Há poucos anos, a possibilidade de se promover de forma rápida, precisa e econômica alterações pontuais em sequências dos genomas de plantas e animais de interesse agropecuário, de modo a torná-los mais aptos a um determinado ambiente ou condição, parecia algo distante. Cientistas se debruçavam sobre procedimentos de transformação genética que, em geral, custavam caro demais em função principalmente da necessidade de desregulamentação dos eventos-elite gerados e, além disso, eram na maioria das vezes demorados demais para responder a alterações importantes no cenário socioeconômico da atividade agropecuária. A consequência imediata disso era que somente poucas empresas no mundo conseguiam operar tal modelo de maneira eficiente.

Esse cenário começou a mudar há pouco mais de 8 anos, quando as pesquisadoras Emmanuelle Charpentier, diretora do Instituto Max Planck de Biologia das Infecções, e Jennifer A. Doudna, bioquímica da Universidade da Califórnia, publicaram na revista Science o artigo seminal intitulado “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity”, no qual descreveram como sequências palindrômicas curtas e repetitivas, agrupadas e interespaçadas regularmente, proviam bactérias e arqueas com imunidade adaptativa contra víruses e plasmídeos e mostraram que tais bactérias/arqueas usam RNAs CRISPR para guiar a clivagem de ácidos nucleicos invasores. A partir daí o campo da Engenharia Genética entrou em nova e revolucionária fase, na qual é possível usar sistemas baseados em CRISPR/Cas com RNAs programáveis, permitindo que cientistas em praticamente qualquer laboratório de biologia molecular possam mudar ou editar (termo que tem sido mais comum) sequências específicas do genoma de células eucarióticas. Assim, com essa “tesoura molecular”, é possível, por exemplo, “cortar” uma parte específica do DNA, fazendo com que a célula produza ou não determinadas proteínas. Por essa descoberta, Charpentier e Doudna foram agraciadas com o Prêmio Nobel de Química em 2020.

Como não podia deixar de ser, a técnica passou a ser amplamente utilizada na pesquisa agropecuária para desenvolver lavouras com novos atributos, tais como resistência a pragas e doenças, tolerância à seca e a outros estresses abióticos. A Embrapa tem hoje em seu portfólio de projetos um grande projeto, chamado CRISPRRevolution, que consiste no mais organizado esforço da empresa para utilização da edição genômica por meio da tecnologia CRISPR como solução biotecnológica para a melhoria da qualidade nutricional, industrial e da tolerância ao déficit hídrico de espécies de interesse agrônomico. Somam esforços na consecução des-

se projeto a Embrapa Agroenergia, que o coordena, a Embrapa Milho e Sorgo, a Embrapa Soja, a Embrapa Arroz e Feijão e a Embrapa Informática Agropecuária.

A ideia de se organizar e publicar a presente obra surgiu em uma conversa informal do grupo de líderes do projeto. Para eles, além de promover ciência de ponta e desenvolver produtos e processos inovadores com base na nova técnica, era preciso atuar também numa estratégia de disseminação do conhecimento científico. Pois bem, este livro é fruto dessa visão e traz um vasto material que, sem dúvida alguma, passará a ser referência para professores, pesquisadores, técnicos e estudantes que se dedicam ao estudo da biotecnologia. Que este material possa inspirar inúmeros cientistas a continuar avançando o campo da biotecnologia, trabalho que em nossa visão continuará a alicerçar a agropecuária moderna por anos a fio.

Esperamos que apreciem este texto. Boa leitura a todos.

*Alexandre Alonso Alves*  
Chefe-Geral da Embrapa Agroenergia

# Sumário

- 11      Capítulo 1  
Introdução à edição genômica em plantas
- 49      Capítulo 2  
Edição de genoma via *non-homologous end joining* (NHEJ)  
e ribonucleoproteínas (RNP)
- 91      Capítulo 3  
Edição de genoma por CRISPR/Cas  
via recombinação homóloga
- 125     Capítulo 4  
Modulação da expressão gênica em  
plantas via tecnologia CRISPR/dCas9
- 179     Capítulo 5  
Regulamentação da edição genômica  
em plantas no Brasil e no mundo



# Introdução à edição genômica em plantas

José Hernandes Lopes Filho  
Viviane Cristina Heinzen da Silva  
Josenilda Carlos dos Santos  
Ricardo Augusto Dante  
Isabel Rodrigues Gerhardt  
Juliana Erika de Carvalho Teixeira Yassitepe  
Fernanda Rausch Fernandes

## Desafios da agricultura moderna para o presente e o futuro

Os desafios da agricultura moderna, destinada tanto para abastecimento de alimentos quanto para obtenção de bioenergia, são de escala mundial e incluem aumento da demanda alimentícia devido ao crescimento populacional, mudanças de hábitos alimentares e mudanças climáticas. Um dos maiores desafios é aumento sustentável da produção, com a aplicação de melhores práticas agrícolas e o desenvolvimento de variedades capazes de produzir alimentos com teor e qualidade nutricional, bem como mais tolerantes aos diversos tipos de estresses bióticos e abióticos (DaMatta et al., 2010; Lobell; Gourdjji, 2012; McCouch et al., 2013; Eisenstein, 2013; FAO, 2019). Além disso, o contínuo aumento da utilização de áreas cultiváveis tem causado grande impacto de desmatamento florestal (Campbell et al., 2008).

Historicamente, o desenvolvimento de cultivares com características desejáveis (*traits*), tais como maior produtividade, resistência a pragas ou maior valor nutricional, baseou-se principalmente em métodos de seleção de alelos favoráveis de ocorrência natural ou induzidos por mutagênese não específica. Apesar de sua enorme contribuição, esses métodos apresentam limitações, tais como a seleção fenotípica sem conhecimento das bases moleculares e fisiológicas envolvidas (Purugganan; Fuller, 2009).

Com o advento da biologia molecular, a agricultura moderna se beneficiou de diversas técnicas que auxiliam o melhoramento genético vegetal, com destaque para a transgenia, a seleção assistida por marcadores moleculares e a seleção genômica. Contudo, embora tenham papel importante no cenário da agricultura atual, alimentos transgênicos sofrem forte crítica do público, normalmente sendo associados à imagem de algo “não natural” por reunir material genético de diferentes organismos (Schmidt et al., 2020). Além disso, ainda há muita limitação técnica para o desenvolvimento de produtos comerciais, como, por exemplo, a restrição à manipulação de características controladas por poucos genes, ou a impossibilidade de escolha da posição genômica onde o DNA exógeno é integrado (Que et al., 2010).

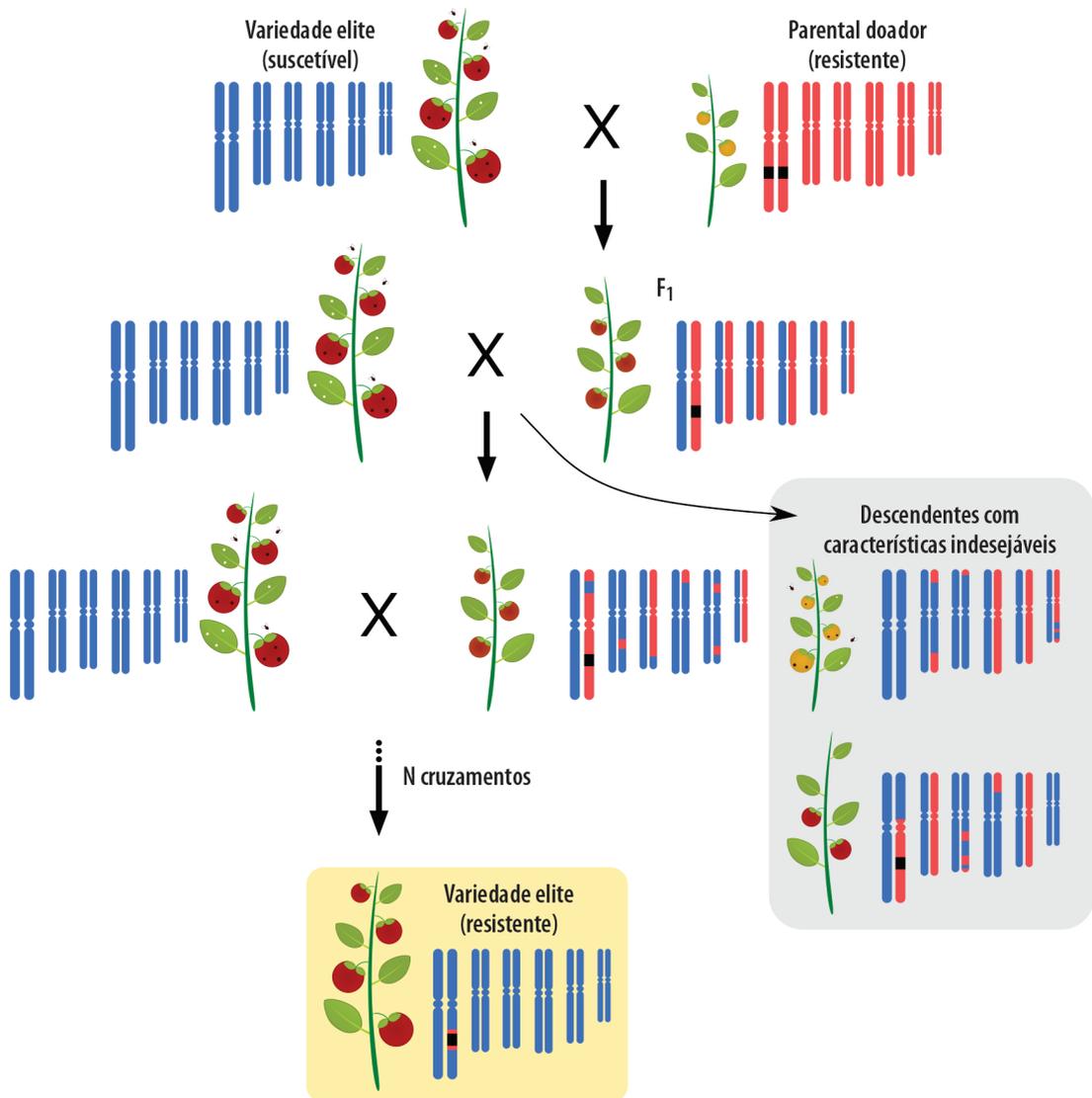
Outros métodos de introgressão de genes (transferência ou introdução permanente de genes de interesse de uma linhagem para outra) envolvem várias etapas de cruzamentos entre as linhagens selecionadas e a elite, o que demanda longos períodos de tempo (Mazur; Tingey, 1995; Jacobsen; Schouten, 2007; Harrison; Larson, 2014). Por exemplo, uma cultivar elite apresenta características de interesse agrônômico, mas pode ser suscetível a uma determinada praga. Para adquirir resistência, tal cultivar é cruzada com uma variedade doadora, resistente à praga, mas com demais características não desejadas. A geração F1 (híbrida) é resistente à praga graças ao alelo dominante proveniente do parental doador, mas apresenta características intermediárias. Diversas etapas de retrocruzamento e seleção são necessárias para recobrar as características da variedade elite, mantendo a resistência. Muitas vezes, mesmo após múltiplos ciclos de retrocruzamento, não é possível recuperar as sequências da variedade elite adjacentes ao locus de interesse (Figura 1). Esses métodos são ainda restritos a espécies aparentadas, uma vez que o cruzamento entre espécies distantes não é viável, ou, quando ocorre, tende a produzir descendentes inférteis (Moyle; Nakazato, 2008).

Assim, o desenvolvimento de híbridos ou cultivares agrícolas com múltiplos *traits* é um processo extremamente complexo, de alto custo e longo. Mesmo os programas de melhoramento assistido por marcadores moleculares, que identificam e garantem a presença do alelo introduzido, bem como selecionam o genoma do doador com características não desejadas, têm suas limitações (Xu; Crouch, 2008). Por exemplo, o extenso “arraste de ligação” (*linkage drag*), associado à segmentação de genoma, limita os programas de melhoramento na etapa de recombinação genética (Lin et al., 2014), exigindo tentativas para quebra da ligação do gene-alvo (Brown, 2002). Tais processos são muitas vezes desafiadores e exigem grandes populações de cruzamento e seleção trabalhosa, uma vez que a taxa de recombinação entre um dado marcador próximo ao locus de interesse e esse próprio locus é baixa, sendo diretamente relacionada à distância entre ambos (Li et al., 2015).

É, portanto, urgente que novas estratégias e tecnologias sejam utilizadas para reduzir o tempo e os custos do melhoramento genético. Nesse sentido, a edição genômica em plantas emergiu como uma importante ferramenta para o aumento da produtividade, qualidade e segurança dos alimentos produzidos.

## Ferramentas de edição de genomas para o melhoramento de precisão

Tecnologias eficientes de edição de genomas têm promovido grandes oportunidades para a agricultura, permitindo a manipulação de genomas de plantas de



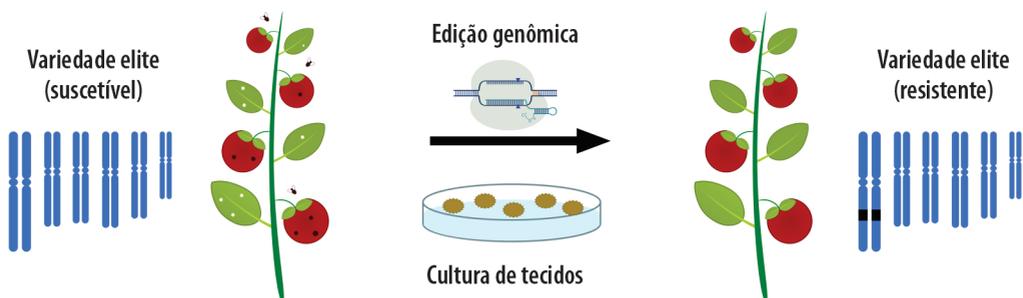
**Figura 1.** Representação do processo de introgressão no qual uma variedade elite suscetível a uma praga é cruzada com um parental doador resistente. Cromossomos azuis e vermelhos representam genoma da cultivar elite e doadora, respectivamente. Região em preto indica o locus que confere resistência à praga.

maneira altamente específica (não aleatória) em seu contexto cromossômico natural (Chen et al., 2019). Como veremos em detalhe mais adiante, diferentes técnicas de edição foram utilizadas nos últimos anos, destacando-se as baseadas em ZFNs (*Zinc Finger Nucleases*), TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) e CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR associated protein*).

Uma das maiores contribuições das técnicas de edição de genomas na área agrícola talvez seja a possibilidade de melhoramento de múltiplos *traits* simultaneamente – diretamente em linhagens elite, agilizando o desenvolvimento de produtos comerciais, o que geralmente é impraticável por meio de técnicas convencionais de melhoramento genético (Gao et al., 2020b). Tais estratégias, denominadas *multiplex*, envolvem a edição de diversos loci concomitantemente. Essa versatilidade é importante para o melhoramento de características determinadas por QTLs (do inglês *Quantitative Trait Loci*), ou seja, aquelas controladas por múltiplos loci do genoma (Rodríguez-Leal et al., 2017).

Estratégias alternativas, como *“in vivo desired-target mutator”* (DTM) (Li et al., 2017), são baseadas no cruzamento de eventos transgênicos (carregando a maquinaria de edição) com genótipos elite, nos quais a edição pode ocorrer diretamente nos seus alelos. Consequentemente, essas estratégias minimizam o efeito de *“arraste de ligação”* associado aos loci editados e aceleram a recuperação do genoma dos parentais recorrentes por possibilitar tanto número menor de gerações de retrocruzamento quanto uso menos intensivo de marcadores moleculares.

Além disso, recentes avanços da tecnologia permitem a obtenção de plantas modificadas sem a inserção cromossômica de DNA exógeno, abrindo assim a possibilidade de serem consideradas como livres de transgenia (Figura 2) (Jansing et al., 2019). Diferentes classificações vêm sendo adotadas, baseadas no tipo e extensão das modificações genômicas realizadas. Diversos países já optaram por não tratar como Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) aqueles obtidos por meio de edição genômica (a depender da abordagem utilizada). No Brasil, as técnicas de edição de genomas podem entrar na categoria de Técnicas Inovadoras do Melhoramento de Precisão (TIMPs), do inglês *Precision Breeding Innovation* (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, 2018). As TIMPs foram definidas pela Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018 (Comissão Técnica Nacional



**Figura 2.** Processo de melhoramento de resistência a uma determinada praga, por edição genômica, sem a necessidade de integração de DNA exógeno no genoma da variedade elite.

de Biossegurança, 2018), pela CTNBio, e têm por característica a ausência de DNA recombinante em seus produtos finais. Com isso, a técnica pode permitir que empresas de pequeno e médio porte, assim como institutos de pesquisa, tenham maiores condições de superar obstáculos regulatórios (Schmidt et al., 2020). O atual panorama da regulamentação de organismos com genoma editado é abordado no Capítulo 5 – Regulamentação da edição genômica em plantas no Brasil e no mundo.

## Histórico das metodologias de edição genômica

Edição genômica, edição gênica ou engenharia genômica são nomes dados às modificações específicas feitas no DNA de organismos vivos (Baltés et al., 2017). A edição genômica ocorre por meio da ação de nucleases sítio-dirigidas, capazes de clivar a molécula de DNA-alvo, ativando a subsequente ação de mecanismos de reparo de DNA da própria célula, que podem ser direcionados por recombinação homóloga (HR, do inglês *Homologous Recombination*) ou por união de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês *Non-Homologous End Joining*) (Satheesh et al., 2019). Isso se tornou possível após o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, a qual teve início em 1972, quando o laboratório de Paul Berg publicou a criação da primeira molécula de DNA recombinada (Jackson et al., 1972). Desde então, técnicas de biologia molecular e engenharia genética têm evoluído, permitindo aos cientistas desenvolverem diversas metodologias de edição de genomas, incluindo a construção de sistemas de vetores, métodos de entrega de material genético e aplicação de proteínas “engenheiradas” (Jansing et al., 2019; Anzalone et al., 2020). Entre as proteínas da primeira geração de ferramentas de edição de genomas em plantas, estão as enzimas ZFNs e TALENs.

### ZFNs (*Zinc Finger Nucleases*)

As ZFNs são proteínas quiméricas “engenheiradas”, compostas de um domínio de clivagem inespecífico de FokI, que promove a quebra da dupla fita de DNA, e de um arranjo de repetições de 3-5 dedos de zinco Cys2-His2, responsável pela ligação ao DNA (Shah et al., 2018). Cada dedo de zinco interage com 3 nucleotídeos em sucessão no DNA, formando um dímero. Esse dímero identifica uma sequência-alvo de 18 a 24 pares de base (pb) no genoma. Dessa forma, o dedo de zinco pode ser modificado para reconhecer genes ou regiões de interesse no DNA. A quebra na dupla fita de DNA pode ser reparada por NHEJ ou HR, resultando na edição do gene, por meio de inserções ou deleções (Satheesh et al., 2019).

ZFNs foram as primeiras enzimas utilizadas na edição de genoma de plantas, utilizando *Arabidopsis thaliana* como modelo e, desde então, diversos estudos foram

conduzidos utilizando essa técnica em outras espécies (Davies et al., 2017). Em milho, ZFN foi empregada para gerar cortes no gene *ipk1*, o que resultou em plantas tolerantes a herbicida (bialafos e quizalofop) (Shukla et al., 2009). Essa técnica também foi utilizada para gerar plantas de tabaco resistentes a imidazolinona e sulfonilureia (Townsend et al., 2009). Outro estudo mostrou a eficiência de ZFN associada ao mecanismo HR em tabaco, ao ser utilizada para a substituição de uma sequência genômica de 7 kb por um cassete de 4 kb codificando múltiplos marcadores (Schneider et al., 2016). Em soja, o papel funcional de genes que codificam uma família de proteínas DICER-LIKE1, envolvidos na via de maturação de pequenos RNAs, foi confirmado por meio de mutações geradas por ZFN (Curtin et al., 2016).

### TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*)

Os efetores do tipo ativador transcricional são proteínas sintetizadas por bactérias fitopatogênicas, do gênero *Xanthomonas* (Gaj et al., 2013). Essas proteínas são compostas por domínios de ligação ao DNA, os quais são formados por 13 a 30 arranjos de repetições de resíduo de aminoácidos em série. Cada arranjo contém cerca de 34 resíduos de aminoácidos idênticos, exceto por dirresíduos na posição 12 e 13, chamados de repetições dirresíduos variáveis (RVD), os quais são responsáveis pela especificidade de ligação no nucleotídeo da sequência-alvo (Satheesh et al., 2019). Cada RVD é capaz de reconhecer um único par de bases e permite modificações para alvos específicos no genoma em estudo (Shah et al., 2018). Os domínios repetidos são artificialmente fundidos à nuclease FokI, como acontece com as ZFNs, adicionando a função de clivagem aos efetores do tipo ativador transcricional. Diversos alvos potenciais podem ser “engenheirados” em TALEN, resultando em quebra na dupla fita de DNA, o que permite a edição de genomas de interesse (Satheesh et al., 2019).

TALENs têm sido usadas para edição gênica em várias culturas com o objetivo de melhorar características específicas. Com foco na produção de etanol lignocelulósico, TALEN foi empregada para induzir mutações em uma região altamente conservada de ácido cafeico-o-metil transferase de cana-de-açúcar (Sedeek et al., 2019). As linhagens mutantes apresentaram redução no conteúdo de lignina, comprovando a eficiência da técnica para editar genomas complexos como o de cana-de-açúcar (Jung; Altpeter, 2016). Em arroz, TALEN foi utilizada para causar mutações no gene *OsSWEET* e *OsBAHD2*, gerando plantas resistentes à ferrugem e com melhoramento de fragrância, respectivamente (Li et al., 2012; Shan et al., 2015). Dois genes, *FucT* e *XylIT*, foram nocauteados em tabaco por meio de TALEN, para melhorar a capacidade da planta em produzir glicoproteínas (Li et al., 2016).

## Limitações das técnicas clássicas e vantagens do Sistema CRISPR/Cas.

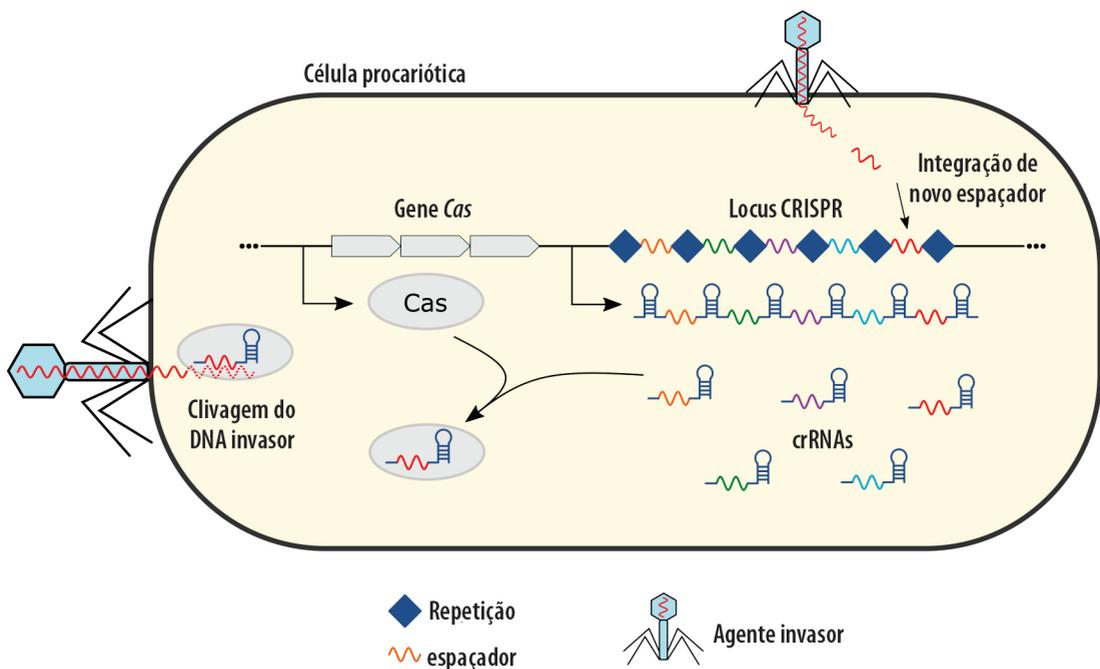
A utilização de ZFNs para edição genômica em plantas mostrou resultados bem-sucedidos, em diferentes espécies e com diferentes objetivos. No entanto, existem algumas limitações. Por exemplo, é necessário construir um arranjo de dedo de zinco para cada alvo selecionado (Chen et al., 2019). Além disso, o número de alvos é limitado e há possibilidade de ocorrer sobreposição entre o domínio catalítico e o domínio de ligação ao DNA, o que pode afetar a especificidade da proteína. Já a ferramenta TALEN, embora mais utilizada e mais precisa do que as ZFNs, tem a principal limitação na necessidade de construir grandes números de RVDs para atuar em um alvo pré-determinado (Satheesh et al., 2019). Assim, tanto ZFNs quanto TALENs necessitam ser redesenhadas para seus alvos específicos, o que caracteriza um grande desafio, visto que são proteínas complexas. Além disso, construir proteínas quiméricas como essas demanda tempo, é um processo complicado e tem um custo alto. Nesse cenário, surgiu o sistema CRISPR, o qual não depende da modificação de proteínas para a determinação dos alvos a serem editados, mas sim da simples inclusão de moléculas de RNA que conferem a especificidade do alvo (Jinek et al., 2012).

De maneira resumida, a edição genômica pelo sistema CRISPR se baseia em dois componentes básicos: uma nuclease (enzima capaz de promover a quebra da dupla fita de DNA) e moléculas de “RNA guia” (sgRNAs), que direcionam a atividade da nuclease para sítios específicos da molécula de DNA (Anzalone et al., 2020). Assim, com a simples troca das moléculas de sgRNA utilizadas, é possível editar diferentes regiões genômicas de interesse. Além do mais, a edição de múltiplos loci não depende necessariamente do uso de um grande número de sgRNAs. Por exemplo, diversos genes podem ser editados simultaneamente a partir do uso de sgRNAs que tenham como alvo um domínio conservado de uma família multigênica. Essa abordagem facilita a engenharia de vias metabólicas abundantes em enzimas redundantes. Essa mesma lógica pode ser utilizada para edição de múltiplas cópias de um mesmo gene, especialmente interessante para plantas com genomas poliploides.

## Origem da tecnologia CRISPR

O sistema CRISPR é um sofisticado mecanismo de imunidade adaptativa mediada por RNA/proteína usado por procariotos (bactérias e arqueas) na defesa contra ataque de vírus e plasmídeos (Figura 3). Esse sistema permite que o microrganismo clive ácidos nucleicos do invasor, interrompendo o seu ciclo (Wiedenheft et al., 2012; Koonin; Makarova, 2013). A sigla CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short*

*Palindromic Repeats* ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) refere-se ao arranjo gênico de pequenas regiões regulatórias repetitivas, contendo genes de RNAs pequenos e não codificantes, que conferem especificidade à defesa bacteriana: o CRISPR RNA (crRNA) e o transativador de crRNA (tracrRNA), ausente em alguns tipos de sistema CRISPR. Cas (do inglês *CRISPR associated protein*) é a nuclease capaz de clivar e destruir o DNA invasor (Wiedenheft et al., 2012; Marraffini, 2015).



**Figura 3.** Representação esquemática do sistema de imunidade CRISPR/Cas em procariotos. Uma célula procariótica, quando invadida por vírus ou plasmídeo, pode integrar parte do genoma invasor como um novo espaçador (em vermelho) em seu locus CRISPR. Em uma eventual infecção recorrente, crRNAs derivados do locus CRISPR se associam às proteínas Cas, que passam a reconhecer e clivar moléculas de DNA do invasor.

Fonte: adaptado de Doudna Lab (2020).

Em procariotos, durante o processo de imunização, pequenos fragmentos de DNA exógeno (do invasor) são integrados na região CRISPR do cromossomo hospedeiro. Essa integração ocorre na forma de novos espaçadores (*spacers*) das regiões repetitivas (Amitai; Sorek, 2016), promovendo a adaptação do hospedeiro contra uma nova infecção pelo mesmo invasor (Barrangou et al., 2007). Caso ocorra uma subsequente invasão pelo mesmo vírus ou plasmídeo, a transcrição da região regulatória CRISPR (agora contendo novos espaçadores) e seu processamento para

formação de crRNAs maduros (algumas vezes dependente de tracrRNA) resultam no reconhecimento do invasor: a região 5' do crRNA contendo o *spacer* parecia com a sequência do DNA exógeno na região do espaçador-precursor (*protospacer*), que é então destruído pela nuclease Cas (Figura 3) (Marraffini; Sontheimer, 2008; Hale et al., 2009; Garneau et al., 2010). A especificidade e a degradação do elemento invasor na maioria dos sistemas CRISPR/Cas também são determinadas por uma pequena sequência de 2-5 pb, localizada próxima à sequência-alvo (*protospacer*) no DNA invasor, conhecida como motivo PAM (do inglês *protospacer adjacent motif*) (Mojica et al., 2009; Anders et al., 2014; Jiang; Doudna, 2017).

Da descoberta do sistema CRISPR até a sua adaptação como ferramenta de edição de genomas em organismos vivos, foram longos anos de pesquisas. Em 1987, ao analisar a sequência de DNA do gene *iap* de *Escherichia coli* k12, Ishino et al. (1987) observaram a presença de uma região incomum na extremidade 3' do gene. Essa região era constituída por sequências repetidas e sequências espaçadoras intercaladas (Ishino et al., 1987). Alguns anos depois, essas mesmas regiões foram encontradas na arquea *Haloferax mediterraneii* (Mojica et al., 1993). Em 2000, esses elementos genéticos foram identificados em 20 microrganismos diferentes, incluindo *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium difficile* e *Yersinia pestis*. Finalmente, foram caracterizados e denominados como repetições curtas regularmente espaçadas (SRSRs) (Mojica et al., 2000). Pouco tempo depois, o nome desse elemento foi trocado para CRISPR, porém sua função biológica permanecia desconhecida (Jansen et al., 2002).

A descoberta de quatro genes da família *Cas*, localizados adjacentes ao locus em procariotos, foi importante para desvendar a função biológica do locus CRISPR. Esses genes codificam proteínas com motivos característicos de nuclease e helicase, indicando que eles poderiam estar envolvidos no metabolismo do DNA ou na expressão de genes e teriam uma possível relação funcional com o locus CRISPR (Jansen et al., 2002). A partir dessas informações, várias hipóteses surgiram para o papel funcional de CRISPR: poderia participar na regulação gênica, no particionamento de replicons, reparo de DNA e outras funções.

Nos anos seguintes, com o auxílio de ferramentas de bioinformática, surgiu o primeiro indício de que o locus CRISPR estaria envolvido com o sistema imune de procariotos. Pesquisadores buscaram por sequências similares ao locus CRISPR de *E. coli* e verificaram que ela combinava com a sequência do fago P1, que infectava muitas linhagens de *E. coli*. A partir dessa informação, 4.500 espaçadores CRISPR foram identificados em 67 cepas bacterianas, dos quais muitos eram similares a sequências conhecidas de vírus ou plasmídeos conjugativos (Mojica et al., 2005). Paralelamente a esses estudos, foi observado que 61 linhagens de *Y. pestis* eram

idênticas em seus loci de repetições em sucessão, exceto pelos espaçadores do locus CRISPR, e que muitos desses espaçadores correspondiam a profagos, presentes no genoma de *Y. pestis*. Os autores então sugeriram que o locus CRISPR funcionaria como um mecanismo de defesa e que poderia representar a memória de infecções anteriores (Pourcel et al., 2005).

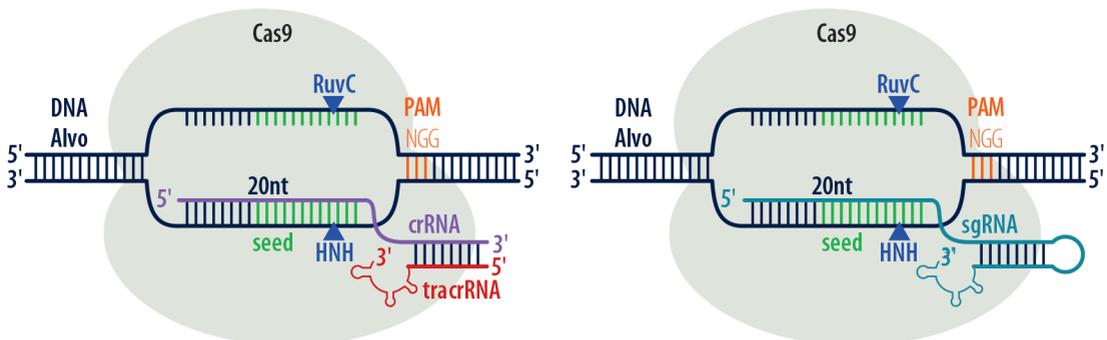
A hipótese de que CRISPR estaria envolvido com o sistema imune de procariontos ganhou reforço após a publicação do trabalho de Rodolphe Barrangou e colaboradores (Barrangou, 2007). Eles analisaram a sequência CRISPR de várias linhagens de *Streptococcus thermophilus*, incluindo linhagem próxima à industrial e linhagens resistentes a fagos, encontrando variação genômica na região dos espaçadores no locus CRISPR. Posteriormente, foi observado que após confrontar bactérias e fagos, novos espaçadores correspondentes às sequências gênicas do fago eram integrados ao genoma da bactéria. As bactérias que integravam a sequência de DNA do fago tornavam-se resistentes a ele, demonstrando que CRISPR desempenha funções relacionadas ao sistema imune bacteriano (Barrangou et al., 2007). Nos anos seguintes, com base em ferramentas de bioinformática, genética e biologia molecular, a função de cada componente e o mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas foram elucidados. Em 2012, a eficácia do sistema CRISPR/Cas *in vitro* foi comprovada, abrindo as portas para a edição genômica de eucariotos baseada em endonucleases guiadas por RNAs programáveis (Gasiunas et al., 2012).

Assim, o sistema CRISPR representou um grande salto na tecnologia de edição genômica, especialmente por não depender do longo e custoso processo de modificação de proteínas para conferir especificidade ao alvo. Uma vez que a reprogramação do sistema para edição de diferentes alvos depende, em linhas gerais, apenas da troca de moléculas de RNA guia, a tecnologia foi rapidamente difundida entre os laboratórios do mundo todo. A partir de então, a tecnologia de edição de genomas por CRISPR/Cas vem se tornando cada vez mais eficiente e sendo aplicada a uma vasta gama de organismos (Chen et al., 2019; Anzalone et al.; 2020, Li et al., 2020c).

### Visão geral dos mecanismos e tipos de enzimas

Existem distintos mecanismos CRISPR/Cas em procariontos, que podem ser divididos em duas classes, cada qual subdividida em três tipos, com base nos diferentes genes Cas e na natureza do complexo efetor. A Classe 1 (tipos I, III e IV) emprega múltiplas proteínas Cas no complexo efetor, enquanto a classe 2 (tipos II, V e VI), possui apenas uma única proteína efetora. O Sistema CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) pertence à classe 2, tipo II, e foi o primeiro sistema adaptado para edição de genomas eucariotos por meio de RNA programável. Diferentemente dos

tipos I e III, em CRISPR/Cas9 as moléculas de crRNA e tracrRNA formam estruturas únicas e hibridizadas, que guiam a Cas9 para clivagem de qualquer DNA contendo sequência-alvo complementar e adjacentes ao PAM (Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012). A plataforma de edição de genomas de eucariotos é simplificada pela síntese de uma única molécula quimérica contendo o crRNA e tracrRNA, referida como sgRNA (do inglês *single guide RNA*) ou gRNA (do inglês *guide RNA*) (Jinek et al., 2012; Koonin et al., 2017). Assim, a molécula sgRNA (a partir de sua região 5') contém a sequência de crRNA, com seu *spacer* complementar à sequência do DNA-alvo (*protospacer*), fusionado ao tracrRNA, que contém uma estrutura secundária em forma de três grampos necessária para o reconhecimento da enzima Cas, além de uma estrutura em grampo adicional para finalização da transcrição (Figura 4) (Jinek et al., 2012). Esse sistema simplificado de dois componentes pode ser programado para reconhecer virtualmente qualquer sequência específica de interesse no genoma, desde que adjacente a um sítio PAM.

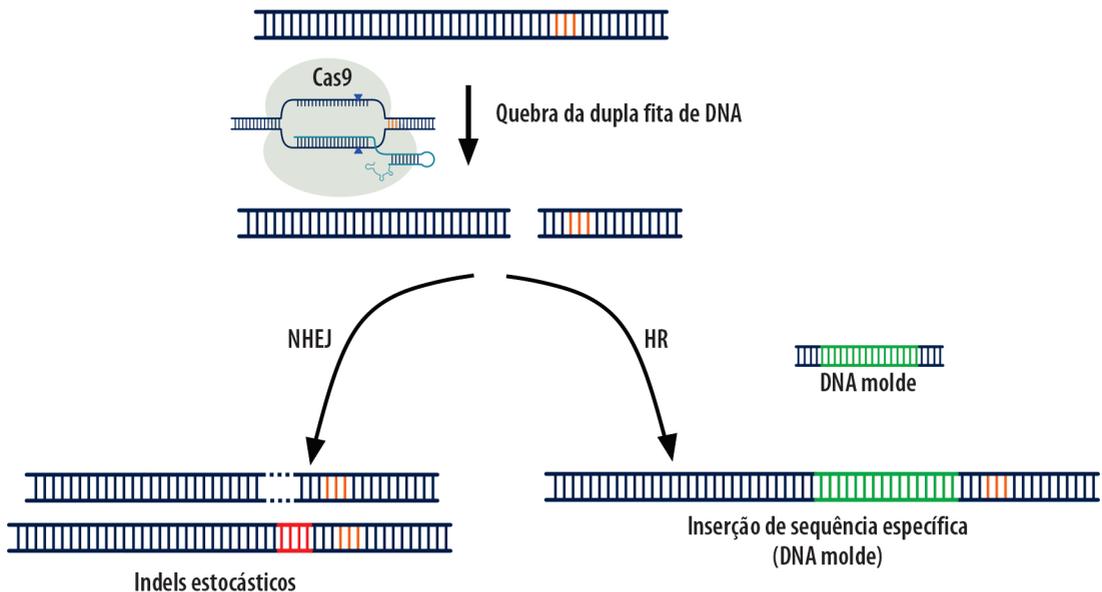


**Figura 4.** Comparação entre o complexo CRISPR/Cas9 nativo de *Streptococcus pyogenes* (esquerda), contendo crRNA e tracrRNA, e o complexo otimizado para edição genômica em eucariotos (direita) com uma única molécula guia (sgRNA, direita). Triângulos azuis indicam as posições de clivagem na molécula-alvo, realizadas pelos sítios ativos RuvC e HNH.

Fonte: adaptado de Doudna e Charpentier (2014).

Inicialmente, a enzima Cas9 reconhece o sgRNA por meio do seu lobo de reconhecimento (Rec). Uma vez formado, o complexo Cas9-sgRNA percorre a dupla fita do DNA-alvo até encontrar um sítio PAM, que é também reconhecido pelo lobo Rec da Cas9. Em seguida, a atividade helicase da Cas9 promove a abertura da dupla fita de DNA na posição imediatamente a montante de PAM, permitindo o pareamento de 20-24 nucleotídeos entre o DNA-alvo complementar e o sgRNA. Na maioria dos casos, o complexo Cas9-sgRNA é incapaz de reconhecer sítios de DNA apresentando mais do que três nucleotídeos não complementares, além de não poder reconhecer

e editar o DNA-alvo que contenha qualquer nucleotídeo não complementar nos 10-12 nucleotídeos próximos do sítio PAM (região também conhecida como *seed*). Somente após o pareamento completo, os domínios de atividade nuclease HNH e RuvC da Cas9 clivam a fita complementar e não complementar de DNA, respectivamente, e especificamente no terceiro nucleotídeo a montante do sítio PAM (Figura 4) (Cong et al., 2013; Hsu et al., 2013; Jiang et al., 2015). Assim, a especificidade de ligação de Cas9 com o DNA-alvo é determinada pela sequência conservada PAM no DNA-alvo e pelo pareamento de sua região *protospacer* com a região *spacer* (principalmente a região *seed*) do sgRNA. Por fim, a clivagem da dupla fita leva ao recrutamento dos mecanismos de reparo do DNA pelo organismo que está sendo editado. Em linhas gerais, o sistema de reparo pode seguir por duas vias distintas: (1) junção de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*), ou (2) recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*). Enquanto o reparo por NHEJ tende a produzir pequenas inserções e/ou deleções (*indels*) em torno do sítio de clivagem, o reparo por HR, com alta fidelidade direcionado por homologia, permite a inserção de sequências de interesse na região editada (Figura 5) (San Filippo et al., 2008; Chen et al., 2019; Anzalone et al., 2020).



**Figura 5.** Representação esquemática dos mecanismos de reparo de DNA por NHEJ ou HR. Regiões tracejadas e em vermelho indicam deleções e inserções, respectivamente. Região em verde representa uma sequência de interesse a ser integrada no DNA-alvo.

## Modificações e alternativas à SpCas9

Embora CRISPR/Cas9 seja o sistema mais usado para edição de genomas (Doudna; Charpentier, 2014; Sander; Joung, 2014), a quantidade de sequências que Cas9 pode reconhecer é limitada pela necessidade de o motivo PAM ser, geralmente, 5'-NGG-3' (Mojica et al., 2009; Jinek et al., 2012; Shah et al., 2013; Sternberg et al., 2014). Contudo, tem sido reportado que o complexo SpCas9-sgRNA também é capaz de reconhecer sequências alternativas PAM (3' NAG e NGA), potencialmente aumentando a probabilidade de mutagênese fora do alvo (*off-target*) (Zhang et al., 2014; Kleinstiver et al., 2015). Além do requerimento de sítios específicos PAM e da probabilidade de cortes *off-target*, outras características da Cas9, como seu tamanho e modo de ação, podem limitar seu uso em edição de genomas eucariotos. Tais restrições levaram à busca de proteínas Cas alternativas, bem como ao desenvolvimento de uma série de estratégias e modificações da Cas9, visando o aprimoramento de sua acurácia, eficiência e versatilidade de aplicações.

Enzimas ortólogas de SpCas9, como as de *Staphylococcus aureus* (SaCas9), *Streptococcus thermophilus* (StCas9) e *Neisseria meningitidis* (NmCas9), entre outras (Gasiunas et al., 2020), reconhecem diferentes tamanhos e sequências PAM e também têm sido utilizadas como ferramenta em edição de genomas (Ran et al., 2015; Cebrian-Serrano; Davies, 2017). Além do estudo de enzimas ortólogas, Cas9 tem sido modificada para o reconhecimento de diferentes sítios PAMs, tais como VQR-Cas9 (NGA PAM), EQR-Cas9 (NGAG PAM), VRERCas9, (NGCG PAM), SaKKH-Cas9 (NNRRRT PAM) (Kleinstiver et al., 2015), xCas9 (NG, GAA e GTA PAM) (Hu et al., 2018) e SpCas9-NG (NG PAM) (Nishimasu et al., 2018). Outras modificações, como a fusão de Cas9 a domínios de ligação ao DNA de outras proteínas, também resultaram em clivagem de sequências com motivo PAM alternativas (Bolukbasi et al., 2015).

O sistema SpCas9-sgRNA pode ainda tolerar alguns erros de pareamento entre sgRNA e o DNA-alvo, podendo levar à mutação de *off-targets* (Cradick et al., 2013; Fu et al., 2013; Hsu et al., 2013). A importância de *off-targets* na edição de genomas é ainda questionável (Iyer et al., 2015; Zhang et al., 2018b) e, embora limite o potencial da aplicação de CRISPR/Cas9 em terapias de doenças humanas (Li et al., 2020b), não é considerada uma restrição para o uso da tecnologia em plantas, na qual foi demonstrada rara ocorrência, frequentemente predita *in silico* (Young et al., 2019; Gao et al., 2020a; Graham et al., 2020; Herbert et al., 2020; Zhang et al., 2020).

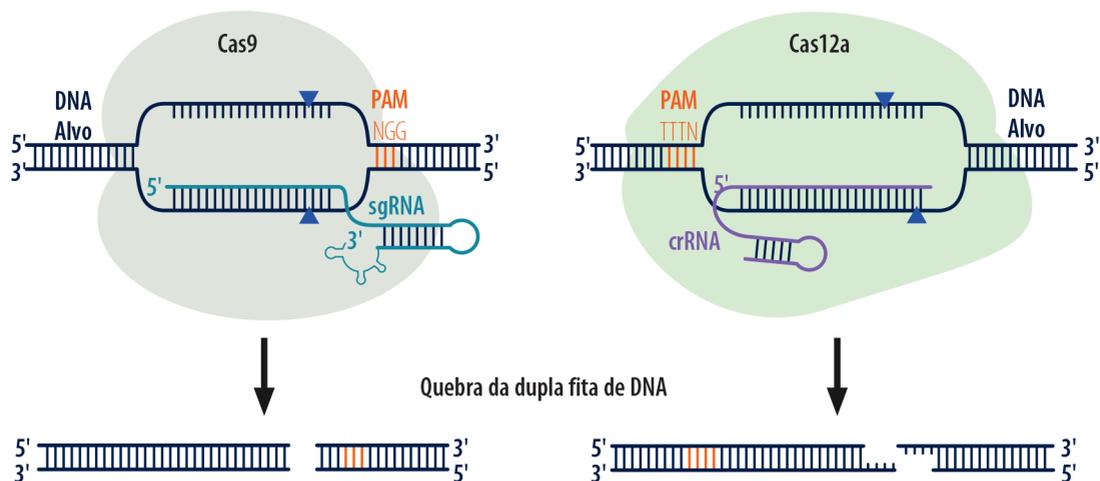
Assim, grandes avanços têm sido obtidos no desenvolvimento de ferramentas que aumentam a especificidade de Cas9. Um exemplo com vasta aplicação é o uso de variantes de Cas conhecidas como *nickases* (nSpCas9), que tiveram um de seus domínios nucleases inativados por mutações pontuais no sítio catalítico: mutação D10A no sítio HNH, ou mutação H840A no sítio RuvC (Cong et al., 2013; Mali et al.,

2013; Ran et al., 2013; Cebrian-Serrano; Davies, 2017). As *nickases* retêm a especificidade de ação (continuam reconhecendo o DNA-alvo), mas clivam apenas uma única fita do DNA. Essa abordagem de corte de uma única fita aumenta a fidelidade do reparo e a obtenção da mutação desejada (Dianov; Hübscher, 2013; Cebrian-Serrano; Davies, 2017). Além disso, *nickases* mostraram-se altamente específicas em células humanas, com redução de *off-targets* sem comprometer a eficiência de edição (Cho et al., 2014). A inativação de ambos os sítios de atividade nucleasê levaram à obtenção de Cas9 desativadas (dCas9) capazes de reconhecer alvos específicos, mas com a atividade catalítica de outra proteína a ela fusionada (Brezgin et al., 2019). Outra abordagem para alcançar maior especificidade, sem perder eficiência, é a mutação de SpCas9 em resíduos envolvidos na redução de energia do complexo SpCas9-sgRNA-DNA-alvo (Kleinstiver et al., 2016; Slaymaker et al., 2016). As proteínas modificadas dessa maneira ficaram conhecidas como SpCas9-HF1 e eSpCas9 e continuam sendo otimizadas em suas versões *plus* (Kulcsár et al., 2020).

Além da proteína Cas9, o sgRNA também pode ser alvo de modificações para aumentar a especificidade pelo DNA-alvo. Por exemplo, modificações na região 5' com adição de uma pequena região do alvo, ou a adição de dois nucleotídeos de guanina extras, levaram à redução de *off-targets* (Cho et al., 2014; Fu et al., 2014; Kim et al., 2014; Kim et al., 2015), embora certa diminuição de eficiência de mutagênese tenha sido reportada para alguns alvos (Cho et al., 2014).

Finalmente, em adição à acurácia, a entrega dos componentes do sistema CRISPR/Cas9 também deve ser eficiente nas diversas aplicações, e o grande tamanho da proteína Cas9 (160 kDa) é um fator limitante nesse quesito (Mout et al., 2017). Os diferentes mecanismos de entrega, suas vantagens e desvantagens serão abordados ao longo deste livro, nos capítulos subsequentes. No geral, o tamanho dos componentes do sistema pode influenciar no sucesso da edição genômica de plantas, tanto nas aplicações que utilizam o sistema de *Agrobacterium*, para a entrega de um único vetor contendo os promotores e os genes para expressão de todo o sistema dentro da célula eucariótica, quanto nas aplicações que utilizam vetores virais para uma expressão transiente, ou mesmo quando na entrega do complexo ribonucleico pelo método de proteolítica (Murovec et al., 2017). Assim, a obtenção de mutantes de SpCas9 com deleções em regiões redundantes para diminuição de seu tamanho bem como a descoberta de outras enzimas menores, ou mesmo de sistema CRISPR alternativos (que não necessitam de tracrRNA, por exemplo), têm sido descritas (Cebrian-Serrano; Davies, 2017; Murovec et al., 2017). A descoberta de outras enzimas efectoras, pertencentes à classe 2 do sistema CRISPR, abriu novas possibilidades de aplicações. A enzima originalmente descrita como Cpf1 (agora conhecida como Cas12a) bem como suas ortólogas e suas variantes modificadas para melhoramento da especificidade (Shmakov et al., 2017; Chen et al., 2019) têm sido

usadas com especial interesse devido às suas características distintas de CRISPR/Cas9. A Cas12a não requer tracrRNA, sendo o RNA guia praticamente a metade do tamanho daquele necessário para Cas9 (~43 contra ~80 nucleotídeos, respectivamente) (Zetsche et al., 2015). Além disso, o complexo Cas12a-crRNA reconhece sequência PAM rica em T em vez de G (5'-TTTN- 3'), clivando em sítios escalonados e distantes de PAM, o que pode facilitar a redução de *off-targets* em genomas ricos em conteúdo GC (Zetsche et al., 2015; Fonfara et al., 2016; Chen et al., 2019). Uma vez que a clivagem promovida por Cas12a resulta em extremidades coesivas na dupla fita de DNA, estas podem aumentar a taxa de eficiência de estratégias HR (Figura 6) (Zaidi et al., 2017).



**Figura 6.** Representação das principais diferenças entre as nucleases Cas9 (esquerda) e Cas12a (direita). Triângulos azuis representam a posição do corte na molécula-alvo.

Fonte: adaptado de Doudna e Charpentier (2014) e Zaidi et al. (2017).

Outras enzimas da classe 2, tais como Cms1 (CRISPR de *Microgenomates* e *Smithella*) e AaCas12b (originada de *Alicyclobacillus acidiphilus*), também apresentam características interessantes, como: tamanho menor do que Cas9 e Cas12a, sítio PAM rico em AT (Begemann et al., 2017), ou atividade ótima em temperaturas altas (Teng et al., 2018). Finalmente, novas proteínas efetoras como a C2c2 (conhecida como Cas13) e suas variantes têm sido modificadas para reconhecerem e editarem alvos de RNA (Abudayyeh et al., 2017) com o emergente potencial de aplicação na interferência de RNA viral em plantas (Mahas et al., 2019).

## Técnicas variantes de CRISPR

A constante busca por modificações da ferramenta, seja na melhoria de Cas9 “engenheiradas” originárias de diferentes espécies procarióticas, seja na otimização da molécula de sgRNA, ou ainda na entrega do sistema para a célula eucariótica a ser editada, levou ao aprimoramento e aumento da eficiência e especificidade da técnica. Além das modificações já discutidas até aqui, novos conhecimentos e fusões com outras técnicas biotecnológicas estão trazendo avanços surpreendentes ao sistema de edição de genomas (Anzalone et al., 2020).

A partir do desenvolvimento de *nickases* e *dCas9*, novas tecnologias passaram a utilizar a capacidade dessas enzimas de reconhecimento do sítio específico da edição, mas sem a realização do corte na dupla fita de DNA. Por exemplo, a fusão de *dCas9* a fatores de transcrição pode levar à ativação e repressão transcricional de genes-alvo, sem promover edição genômica propriamente dita (Bikard et al., 2013; Perez-Pinera et al., 2013). Sobretudo, duas técnicas de edição baseadas em *nickases* e *dCas9* se destacam e serão abordadas aqui: *base editing* (edição de base única) e a recentemente publicada técnica de *prime editing*.

A edição de base única permite a conversão direta e irreversível de um nucleotídeo em outro, de maneira programável. A técnica, que começou a ser utilizada para edição de genomas a partir de 2016, consiste em uma Cas9 nuclease deficiente (*dCas9/nCas9*) fusionada ao domínio de citosina ou adenosina deaminase e ao inibidor uracila DNA glicosilase (UGI). Assim, a função da Cas9 modificada é apenas de se ligar ao DNA, guiada pela molécula de sgRNA, direcionando assim o complexo para que a citosina (ou adenosina) desaminase faça a conversão de uma única base no sítio-alvo (Anzalone et al., 2020; Mishra et al., 2020). O inibidor UGI subverte a via de reparo celular da excisão de uracila (Molla; Yang, 2019). A técnica permite quatro tipos de mutações de transição (C→T, G→A, A→G e T→C) e tem sido utilizada com sucesso em arroz, milho, trigo, batata, tomate, melancia e algodão (Mishra et al., 2020; Qin et al., 2020). Contudo, a técnica também possui limitações, entre elas a impossibilidade das oito mutações por transversões remanescentes (C→A, C→G, G→C, G→T, A→C, A→T, T→A e T→G), restringindo alvos ou regiões específicas dos alvos a serem mutados (Anzalone et al., 2020). Além das conversões de DNA, uma variante da técnica também permite mutações de RNA, convertendo adenina (A) para inosina (I). Essa técnica é conhecida como RBE, do inglês *RNA base editor* (Cox et al., 2017).

Uma alternativa para as limitações da edição de base única de DNA, conhecida como *prime editing*, foi recentemente desenvolvida para ajudar a tornar o sistema de edição seguro em terapias humanas (Anzalone et al., 2019). A técnica, contudo, já foi empregada com sucesso na edição de genomas de trigo e arroz (Li et al.,

2020a; Lin et al., 2020; Tang et al., 2020; Xu et al., 2020). Sua principal característica é a minimização de efeitos *off-target*, além de ser capaz de fazer uma variedade maior de edições, tornando a técnica mais precisa e versátil do que outras alternativas de CRISPR. De maneira simplificada, podemos descrever a técnica como sendo constituída de uma *nickase* fusionada a uma enzima transcriptase reversa modificada. O RNA guia, neste caso, também serve como o molde para a edição precisa no local de destino e recebe o nome pegRNA (abreviatura do inglês *prime editing extended guide RNA*). O trabalho pioneiro demonstrou que o sistema é capaz de reconhecer e modificar o genoma humano por meio de inserções, deleções e edição precisa de base única nas 12 possíveis conversões, constituindo uma possível vantagem sobre o método de edição de base única que utiliza citosina ou adenosina deaminase (Anzalone et al., 2019). Contudo, a técnica não é capaz de fazer inserções ou deleções muito grandes de DNA (como nas edições baseadas em recombinação homóloga, nas quais um DNA doador é adicionado ao sistema CRISPR/Cas9 convencional), uma vez que a molécula de RNA usada como molde é mais suscetível a danos causados por enzimas celulares. Portanto, é mais uma técnica complementar, assim como as demais variações discutidas anteriormente, em que diferentes tipos de edição requerem diferentes tecnologias de edição de genomas.

Apesar de todos os esforços para alcançar maior precisão, eficiência e versatilidade na edição de genomas, o gargalo para seu sucesso em plantas está na eficiência da entrega do sistema às células, considerando-se as diversas variedades genéticas que são pouco ou ineficientemente transformáveis, além do longo e laborioso processo de cultura de tecidos. Um grande avanço na redução do tempo de cultura de tecidos e no aumento de eficiência da obtenção de plantas regeneradas foi o desenvolvimento de protocolos que associam a transformação à expressão transiente de genes reguladores do crescimento e desenvolvimento, tais como *Wuschel* (*WUS*), *Baby Boom* (*BBM*) e *Shoot Meristemless* (*STM*) (Lowe et al., 2016; Zhang et al., 2019; Maher et al., 2020). A técnica já foi aplicada com sucesso em milho, sorgo, cana-de-açúcar, arroz, tabaco, tomate, uva e batata, permitindo até mesmo a brotação transgênica “de novo” a partir de tecidos vegetativos (Steinwand; Ronald, 2020). A utilização do sistema CRISPR/Cas, ou suas variantes, associada à expressão desses genes reguladores, é uma das grandes promessas para expandir o uso do sistema de edição de genomas nas diferentes variedades.

## Exemplos da aplicação de CRISPR na agricultura

Em fevereiro de 2019, iniciou-se a comercialização, nos Estados Unidos, do primeiro derivado de um vegetal com genoma editado. O produto, óleo de soja com

alto teor oleico, é produzido a partir de uma variedade desenvolvida pela Calyxt Inc. por meio do sistema TALEN e teve entrada no mercado norte-americano sem necessidade da regulamentação aplicada a OGMs (Kim; Kim, 2019).

Ao longo dos últimos anos, técnicas de mutação dirigida, como, por exemplo, por ZFN e TALEN, foram utilizadas para geração de características desejadas em diversas culturas, como arroz, milho, soja, entre outros (Jansing et al., 2019). Contudo, dada a facilidade e versatilidade do uso de CRISPR para edição genômica, outras técnicas vêm se tornando cada vez menos utilizadas, ao passo em que estudos com CRISPR crescem rapidamente.

Até o presente momento, a maioria dos trabalhos aborda provas de conceito ou visa o aperfeiçoamento das técnicas envolvidas na edição genômica, sendo poucos os relatos de ensaios de campo. Não obstante, muitos desses estudos têm aplicações orientadas para o mercado, tanto em culturas produzidas em larga escala quanto em espécies vegetais menos difundidas (Metje-Sprink et al., 2020). A seguir, abordaremos alguns exemplos do uso de CRISPR no melhoramento de diferentes características de interesse agrônomo, como a produtividade e a qualidade, além do aumento de resistência a fatores bióticos e abióticos.

## Aumento de produtividade

A produtividade é um atributo complexo, envolvendo diversos fatores que muitas vezes são específicos para cada cultura. Exemplos de características que afetam a produtividade são o número e tamanho de frutos e/ou grãos, arquitetura da planta e biomassa (Chen et al., 2019). Muitos dos fatores relacionados à produtividade são quantitativos e controlados por QTLs. Nesse sentido, a edição genômica por CRISPR se apresenta como uma poderosa ferramenta para o melhoramento, uma vez que estratégias *multiplex* podem ser utilizadas com relativa facilidade para a edição de diferentes QTLs simultaneamente (Rodríguez-Leal et al., 2017; Sedeek et al., 2019).

Por exemplo, em arroz, o *knockout* simultâneo de três genes que regulam negativamente o peso dos grãos (*GW2*, *GW5* e *TGW6*) levou a um aumento de aproximadamente 30%. O potencial da ferramenta fica evidente no estudo. Ainda que mutantes individuais para cada um desses genes já fossem conhecidos, eles estavam presentes em diferentes *backgrounds* genéticos. Além disso, foram obtidas linhagens mutantes para os três genes ainda em  $T_0$ , sendo possível a segregação do T-DNA utilizado para expressão do sistema CRISPR já em  $T_1$ , resultando assim em linhagens não transgênicas mutantes para os três genes (Xu et al., 2016). De maneira semelhante, comprimento e peso de grãos foram melhorados em dois

*backgrounds* genéticos de trigo (*Triticum aestivum*) a partir do *knockout* de três homólogos do gene *TaGASR7*. Com o uso de apenas um sgRNA, com alvo em uma região de sequência conservada entre os homólogos, foi possível realizar *knockout* dos seis alelos simultaneamente em T<sub>0</sub> (Zhang et al., 2016).

Além de *knockout* mediado por CRISPR, outras estratégias já foram utilizadas para melhoramento da produtividade. Um exemplo é a edição de regiões promotoras. Em tomate (*Solanum lycopersicum*), a edição de elementos regulatórios em *cis* de genes do circuito *CLAVATA-WUSCHEL*, responsável pelo controle do tamanho de meristemas, levou a diferentes efeitos sobre o tamanho dos frutos (Rodríguez-Leal et al., 2017). O trabalho demonstra que a regulação fina dos níveis de expressão de genes envolvidos no desenvolvimento pode ter efeitos importantes para o melhoramento vegetal.

## Melhoramento da qualidade

Assim como a produtividade, a qualidade vegetal envolve ampla gama de características, como coloração, aroma, conteúdo nutricional, tempo de prateleira, entre outros. Conteúdo nutricional é um fator de especial interesse, visto que produtos enriquecidos para determinadas substâncias podem ser usados como fonte de nutrientes, tanto diretamente quanto na produção de insumos alimentícios. Por exemplo, foram desenvolvidas linhagens de *Camelina sativa* e *Brassica napus*, cujas sementes possuem alto teor de ácido oleico (Jiang et al., 2017; Morineau et al., 2017; Okuzaki et al., 2018). Em tomate, por meio de abordagem *multiplex*, foram inibidas as vias de conversão de licopeno em  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno. Como resultado, ocorre o acúmulo de licopeno nos frutos (Li et al., 2018a).

Além de esforços para o enriquecimento de nutrientes pontuais, outras abordagens buscam modular o balanço de vias metabólicas para biossíntese maior ou menor de determinadas moléculas. Por exemplo, o amido, principal carboidrato de reserva nas plantas e amplamente utilizado na indústria, é composto por dois polissacarídeos: amilose e amilopectina. Grãos de milho costumam apresentar uma proporção de 75% amilopectina e 25% de amilose (Ricroch, 2019). Contudo, diferenças nessa proporção são encontradas em variedades de arroz e milho e refletem diretamente nas propriedades dos grãos. Assim, variedades de arroz com alto grau de amilose apresentam grãos mais firmes e bem separados após o cozimento, enquanto variedades com baixo teor resultam em grãos mais macios e aglutinados (Zhang et al., 2018a).

Visando a redução de amilose em arroz, dois grupos independentes utilizaram a estratégia de *knockout* do gene *OsWaxy*, por CRISPR, em três variedades (T65, XS134 e 9522) da subespécie *japonica*. Ambos os grupos alcançaram uma redução similar no conteúdo de amilose (aproximadamente de 20%–15% para 2.5%) (Ma et al., 2015; Zhang et al., 2018a). A rápida geração dessas linhagens é especialmente interessante quando se leva em conta que as variedades XS134 e 9522, consideradas elite, não apresentaram alteração de outras características de interesse agrônomo (altura da planta, número de grãos por panícula, número de panícula por plantas, tamanho e peso dos grãos) após a edição do gene *OsWaxy* (Zhang et al., 2018a). Com a mesma estratégia de *knockout* do gene *Wx1* por CRISPR, a DuPont Pioneer produziu uma variedade de milho cujo amido é composto 100% por amilopectina que deve ter o início de sua comercialização em 2020 (Waltz, 2016; Ricroch, 2019). Em arroz, edição por CRISPR também já foi realizada para o efeito inverso: por meio de *knockout* do gene *SBEIIb*, foram desenvolvidas linhagens com alto teor de amilose, que, por ser uma potencial fonte de amido resistente, tem seu consumo indicado para redução dos riscos de doenças crônicas não infecciosas (Sun et al., 2017).

### Eliminação de características indesejáveis

A qualidade vegetal pode ser melhorada, muitas vezes, por meio da eliminação de características indesejáveis. As proteínas do glúten, por exemplo, são conhecidas por desencadear doença celíaca em 0.7%–2% da população mundial (Rewers, 2005). Em trigo, a maior família gênica que codifica para proteínas do glúten ( $\alpha$ -gliadina) apresenta quase 100 genes e pseudogenes (Ozuna et al., 2015), de maneira que métodos convencionais de mutagênese e seleção não foram capazes de gerar variedades de trigo com glúten de baixa atividade imunogênica. Ainda que a grande quantidade de genes-alvo possa sugerir uma abordagem *multiplex*, um grupo foi capaz de realizar o *knockout* simultâneo da maioria dos domínios conservados de  $\alpha$ -gliadina utilizando apenas dois sgRNAs. Como resultado, foram geradas linhagens não transgênicas de trigo com baixo teor de glúten, que apresentam uma redução de até 85% em sua imunorreatividade (Sánchez-León et al., 2018).

Edição por CRISPR também foi realizada em batata (*Solanum tuberosum*) para a completa eliminação da produção de glicoalcaloides esteroidais, substâncias que, além de conferirem sabor amargo, podem ser tóxicas se ingeridas em grandes quantidades (Nakayasu et al., 2018). Nesse caso, o estudo ainda representa um passo inicial no desenvolvimento de uma variedade com potencial de comercialização. Dada a baixa eficiência de edição decorrente do genoma tetraploide da batata, o trabalho foi desenvolvido no sistema de cultura conhecido como *hairy roots*, contudo foi um passo importante para identificação de um gene que, quando mutado, interrompe a via de síntese glicoalcaloides.

Outro fator que vem sendo explorado pelo melhoramento por edição genômica é o escurecimento causado por enzimas polifenoloxidasas (PPO). Embora o silenciamento de PPOs já tenha sido realizado por RNAi em maçãs pela empresa Okanagan Specialty Fruits (Waltz, 2015), existem agora iniciativas de *knockout* de PPOs por mutagênese direcionada. Esse é o caso da empresa Calyxt, que, utilizando o sistema TALEN, desenvolveu uma variedade de batata que não escurece (Ricroch, 2019). Já o sistema CRISPR/Cas9 foi utilizado para *knockout* de uma PPO em champignon (*Agaricus bisporus*), melhorando o aspecto visual e o tempo de prateleira do produto (Waltz, 2016; Ricroch, 2019).

## Resistência a fatores bióticos

Doenças e pestes são um dos maiores desafios para a agricultura moderna, sendo o melhoramento da tolerância a estresses bióticos uma das maiores demandas pela aplicação da edição genômica (Ricroch et al., 2016). Dada sua importância, temos hoje considerável conhecimento acerca dos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos em inúmeras doenças vegetais (bem como em suas vias de resistência). Diversos esforços já foram realizados com o uso de CRISPR para melhoramento de resistência a bactérias, fungos e vírus.

Uma das possíveis abordagens é a edição de fatores da planta hospedeira utilizados por patógenos para o estabelecimento da infecção e/ou sua replicação, promovendo assim a imunização da planta (Sedeek et al., 2019). Por exemplo, o gene *CsLOB1* foi reconhecido por conferir suscetibilidade ao cancro cítrico (Hu et al., 2014), uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* que pode afetar diferentes espécies do gênero *Citrus*. Por meio da edição tanto de regiões promotoras quanto de codificantes do gene *CsLOB1*, foram desenvolvidas linhagens de laranja (*Citrus sinensis*) e toranja (*Citrus x paradisi*) resistentes ao cancro cítrico (Jia et al., 2017; Peng et al., 2017). Em arroz, o crestamento bacteriano é causado por *Xanthomonas oryzae*, que utiliza o efetor PthXo2 para induzir a expressão do gene *OsSWEET13* na planta hospedeira. Esse gene, relacionado ao transporte de sacarose, parece ser determinante para o processo infeccioso por *Xanthomonas*. Assim, mutações promovidas por CRISPR/Cas9 na região codificante de *OsSWEET13* resultou em plantas resistentes à infecção (Zhou et al., 2015).

Estratégias semelhantes foram utilizadas para o desenvolvimento de resistência a doenças causadas por fungos. Em trigo, resistência a oídio (*Blumeria graminis*) foi obtida após a edição (por CRISPR/Cas9 e TALEN) de três homólogos do gene *MILDEW-RESISTANCE LOCUS O* (*TaMLO-A1*, *TaMLO-B1* e *TaMLO-D1*) (Wang et al., 2014). Em tomateiro, a edição do homólogo desse mesmo gene (*SIM1o1*) foi capaz

de conferir resistência total à *Oidium neolycopersici*. Como ressaltam os autores do trabalho, embora existam mutantes naturais para *SIM101*, a introgressão de tal alelo em linhagens elite seria um processo longo e laborioso. A edição de *SIM101* por CRISPR levou ao desenvolvimento de plantas (não transgênicas) da variedade elite “MoneyMaker” em apenas 10 meses (Nekrasov et al., 2017). Em outro exemplo, resistência a bruzone (*Magnaporthe oryzae*) foi alcançada em arroz após a edição do fator de transcrição responsivo a etileno *OsERF922* (Wang et al., 2016). Com esse trabalho, mais uma vez, foram obtidas plantas não transgênicas com significativo aumento da resistência ao patógeno, mas sem quaisquer alterações em características de interesse agrônomo.

Por fim, a tecnologia CRISPR também pode ser utilizada para realizar seu papel original: conferir resistência a infecções virais. Diversos trabalhos demonstram o potencial de CRISPR/Cas9 para a interferência contra diferentes vírus de DNA, como *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV), *Beet Curly Top Virus* (BCTV), *Merremia Mosaic Virus* (MeMV), *Bean Yellow Dwarf Virus* (BeYDV) e *Beet Severe Curly Top Virus* (BSCTV) (Ali et al., 2015; Baltés et al., 2015; Ji et al., 2015; Ali et al., 2016). Inclusive, o uso de um mesmo sgRNA com alvo em uma sequência viral conservada foi capaz de produzir interferência em diferentes geminivírus (Ali et al., 2015). Contudo, vale ressaltar que esses estudos são realizados como prova de conceito, majoritariamente utilizando *Nicotiana benthamiana* e também *Arabidopsis thaliana* como modelos. Os mecanismos de interferência dependem da presença de Cas9 e de sgrNAs nos tecidos vegetais, de maneira que eventuais aplicações do sistema requerem a expressão endógena de tais componentes, caracterizando um organismo transgênico. Uma alternativa à transgenia seria a entrega direta de RNPs (ribonucleoproteínas), metodologia que será abordada no Capítulo 2 – Edição de genoma via *non-homologous end joining* (NHEJ) e ribonucleoproteínas (RNP). Há ainda indícios de que o sistema CRISPR/Cas13 (Classe 2, tipo VI), capaz de clivar moléculas de RNA, apresenta potencial para ser usado na interferência contra vírus de RNA (Aman et al., 2018; Mahas et al., 2019).

## Resistência a fatores abióticos

Estresses abióticos representam importantes ameaças para a produção agrícola mundial. Em especial, o presente cenário de mudanças climáticas gera grande preocupação, dado que condições de seca e temperaturas extremas vêm aumentando consistentemente (Tong; Ebi, 2019; Sippel et al., 2020). Embora o melhoramento da tolerância a estresses abióticos seja de grande interesse, tais iniciativas são dificultadas pela maneira com a qual as plantas respondem a tais fatores, muitas

vezes envolvendo vias metabólicas complexas. Não obstante, alguns esforços para o aumento da resistência a estresses abióticos já foram bem-sucedidos.

Pesquisadores da DuPont Pioneer, por exemplo, foram capazes de melhorar a tolerância à seca em milho a partir da edição do gene *ARGOS8*, um inibidor da resposta a etileno que normalmente é expresso em baixas quantidades. Nesse trabalho, por meio de uma abordagem HR, o promotor de outro gene, *GOS2*, foi inserido na região 5'UTR de *ARGOS2*, aumentando assim sua expressão. Como resultado, as linhagens desenvolvidas sobrevivem mais e têm produtividade melhorada em condições de seca (Shi et al., 2017).

Em arroz, CRISPR/Cas9 foi utilizado para *knockout* de diferentes genes da família *OsPYL*, envolvidos na resposta ao ácido abscísico (ABA). O estudo descobriu que triplos mutantes *pyl1/4/6* apresentam maior tolerância a altas temperaturas, além de maior produtividade. Contudo, o mesmo triplo mutante parece apresentar maior sensibilidade à seca (Miao et al., 2018). Esse trabalho demonstra como muitas vezes as vias de resposta a diferentes estresses podem estar relacionadas, representando um desafio para o campo do melhoramento vegetal.

## Domesticação acelerada e “de novo” de espécies selvagens

Até agora abordamos o uso da edição genômica para o melhoramento de características pontuais. Contudo, além do uso de CRISPR em culturas já estabelecidas, uma abordagem diferente e de crescente interesse é a “redomesticação”, ou domesticação “de novo”, de espécies selvagens.

Um dos efeitos negativos decorrentes do melhoramento clássico é a perda de variabilidade genética. Essa erosão genética que acompanha o histórico de domesticação de plantas cultiváveis pelo homem é decorrência da seleção de características de interesse primário, como a produtividade de grãos e biomassa, em detrimento de características de qualidade, tolerância a pragas e doenças, etc. (Doebley et al., 2006). Dessa forma, o processo acarreta culturas agrícolas mais suscetíveis a patógenos e/ou a estresses abióticos. Para contornar esse problema, linhagens elite são frequentemente cruzadas com seus parentais selvagens, ou ainda espécies próximas, levando à introgressão de genes que eventualmente possam conferir a resistência ou característica desejada (Mazur; Tingey, 1995; Jacobsen; Schouten, 2007; Harrison; Larson, 2014). Esse processo, contudo, demanda longos períodos de tempo para realização de retrocruzamentos que visam a segregação de loci indesejados.

A “redomesticação” utiliza uma lógica inversa: genes-chave são editados em espécies selvagens para torná-las mais interessantes para o cultivo. Dessa maneira, a variabilidade genética presente em tais espécies não é perdida, ao passo que características desejáveis são nelas introduzidas (Zsögön, et al. 2017). Uma segunda vantagem dessa abordagem é a drástica redução no tempo de seleção de tais linhagens, uma vez que dispensa o extensivo processo de retrocruzamentos.

A sugestão de utilização de edição genômica para rápida domesticação “de novo” de espécies selvagens data de meados da década de 2010. Um exemplo bem estruturado é a proposta de domesticação de *Thlaspi arvense*, uma oleaginosa da família Brassicaceae. Nessa proposta, o extenso conhecimento prévio da planta modelo *Arabidopsis thaliana* (também da família Brassicaceae) foi extrapolado para a definição de genes-alvo a serem editados, o que poderia levar rapidamente ao desenvolvimento de uma linhagem de *Thlaspi arvense* com características propícias ao cultivo e utilização em larga escala (Sedbrook et al., 2014).

As primeiras publicações que descreveram aplicações da edição genômica para a domesticação de espécies selvagens ocorreram em 2018. A primeira descreve a domesticação “de novo” de uma espécie de tomate selvagem (*Solanum pimpinellifolium*), que teve seis loci de seu genoma concomitantemente editados por CRISPR/Cas9. Tais loci foram escolhidos por serem de reconhecida importância para a produtividade das atuais culturas de tomate (*S. lycopersicum*). Assim, em poucas gerações, foi obtida uma linhagem de *S. pimpinellifolium* com produção de frutos dez vezes aumentada, sendo estes três vezes maiores em comparação com a linhagem selvagem. Além disso, tal linhagem apresenta diversas vantagens em relação às atuais culturas de tomate, como um teor 500% maior de licopeno nos frutos, além de reter a diversidade genética e a tolerância a estresses das plantas selvagens de *S. pimpinellifolium* (Zsögön et al., 2018).

Em um esforço similar, no mesmo ano, quatro diferentes acessos de *S. pimpinellifolium* foram editados por CRISPR/Cas9, por meio de uma abordagem *multiplex*, de modo a gerar plantas com fenótipos domesticados (morfologia compacta, aumento no número de flores e frutos produzidos, bem como aumento da síntese de ácido ascórbico). Notavelmente, tais plantas retiveram a tolerância parental a patógenos e a altas concentrações salinas (Li et al., 2018b).

Finalmente, a edição genômica apresenta potencial para o melhoramento de espécies não convencionais, chamadas em inglês de *orphan crops* (Lemmon et al., 2018). São consideradas *orphan crops* espécies de importância regional, mas que não são comercializadas internacionalmente em larga escala, acabando por receber pouca atenção de pesquisadores quando comparadas às culturas mais difundidas (Varshney et al., 2012). Esse é o caso de *Physalis pruinosa*, outra espécie da família

Solanaceae, que também foi alvo de edição por CRISPR/Cas9 para melhoramento da arquitetura da planta, aumento de produção de flores e tamanho do fruto (Lemmon et al., 2018).

## Perspectivas e conclusões

Nas últimas três décadas, o desenvolvimento de técnicas de edição de genomas, como TALENs, ZFNs e o sistema CRISPR/Cas, tem contribuído de maneira extraordinária para o progresso da agricultura moderna. O sistema CRISPR/Cas se destaca por ser uma tecnologia sem precedentes em termos de simplicidade, especificidade, eficiência, versatilidade, robustez e baixíssimo custo. Tem sido aplicada com sucesso para a rápida obtenção de culturas agrícolas com melhor produtividade e qualidade, além de aumento de resistência a fatores bióticos e abióticos, trazendo benefícios para produtores, consumidores e meio ambiente.

Os crescentes, rápidos e elegantes avanços para melhorias e adaptações do sistema CRISPR/Cas têm permitido desde a mutagênese de um locus específico, regulação transcricional, edição de epigenoma, edição de base única, fusão de *tags* marcadores, mutações em *multiplex*, substituição de um gene ou alelo por outro de maior interesse, até a geração de uma variedade comercial contendo um alelo elite e com significativa redução do laborioso e custoso tempo dispendido pelos métodos tradicionais de introgressão.

Além disso, ao contrário dos organismos geneticamente modificados, a edição de genes não requer a inserção de DNA exógeno para produzir uma característica desejada. Assim, a tecnologia também tem levado a mudanças na regulamentação de produtos agrícolas, o que está contribuindo com a democratização da obtenção de produtos sustentáveis, não restringindo o benefício às grandes companhias de biotecnologias, mas possibilitando as pesquisas em universidades públicas, ou pequenas startups, por exemplo.

## Referências

ABUDAYYEH, O. O.; GOOTENBERG, J. S.; ESSLETZBICHLER, P.; HAN, S.; JOUNG, J.; BELANTO, J. J.; VERDINE, V.; COX, D. B. T.; KELLNER, M. J.; REGEV, A.; LANDER, E. S.; VOYRTAS, D. F.; TING, A. Y.; ZHANG, F. RNA targeting with CRISPR–Cas13. **Nature**, v. 550, n. 7675, p. 280–284, 2017. DOI: 10.1038/nature24049.

ALI, Z.; ABULFARAJ, A.; IDRIS, A.; ALI, S.; TASHKANDI, M.; MAHFOUZ, M. M. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. **Genome Biology**, v. 16, p. 1-11, 2015. DOI: 10.1186/s13059-015-0799-6.

ALI, Z.; ALI, S.; TASHKANDI, M.; ZAIDI, S. S. A.; MAHFOUZ, M. M. CRISPR/Cas9-mediated immunity to geminiviruses: differential interference and evasion. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-11, 2016.

DOI: 10.1038/srep26912.

AMAN, R.; ALI, Z.; BUTT, H.; MAHAS, A.; ALJEDAANI, F.; KHAN, M. Z.; DING, S.; MAHFOUZ, M. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. **Genome Biology**, v. 19, p. 1–9, 2018.

DOI: 10.1186/s13059-017-1381-1.

AMITAI, G.; SOREK, R. CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 67–76, 2016. DOI: 10.1038/nrmicro.2015.14.

ANDERS, C.; NIEWOEHNER, O.; DUERST, A.; JINEK, M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. **Nature** v. 513, n. 7519, p. 569–573, 2014. DOI: 10.1038/nature13579.

ANZALONE, A. V.; KOBLAN, L. W.; LIU, D. R. Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 824–844, 2020, DOI: 10.1038/s41587-020-0561-9.

ANZALONE, A. V.; RANDOLPH, P. B.; DAVIS, J. R.; SOUSA, A. A.; KOBLAN, L. W.; LEVY, J. M.; CHEN, P. J.; WILSON, C.; NEWBY, G. A.; RAGURAM, A.; LIU, D. R. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. **Nature**, v. 576, n. 7786, p. 149–157, 2019. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4.

BALTES, N. J.; GIL-HUMANES, J.; VOYTAS, D. F. Genome engineering and agriculture: opportunities and challenges. WEEKS, D. P.; YANG, B. (Ed.). **Gene editing in plants**. San Diego: Elsevier, 2017. p. 1–26. (Progress in molecular biology and translational science, 149). DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.03.011.

BALTES, N. J.; HUMMEL, A. W.; KONECNA, E.; CEGAN, R.; BRUNS, A. N.; BISARO, D. M.; VOYTAS, D. F. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system. **Nature Plants**, v. 1, n. 10, p. 14, 2015. DOI: 10.1038/NPLANTS.2015.145.

BARRANGOU, R.; FREMAUX, C.; DEVEAU, H.; RICHARDS, M.; BOYAVAL, P.; MOINEAU, S.; ROMERO, D. A.; HORVATH, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1709–1712, 2007. DOI: 10.1126/science.1138140.

BEGEMANN, M. B.; GRAY, B. N.; JANUARY, E.; SINGER, A.; KESLER, D. C.; HE, Y.; LIU, H.; GUO, H.; JORDAN, A.; BRUTNELL, T. P.; MOCKLER, T. C. OUFATTOLE, M. Characterization and validation of a novel group of type V, class 2 nucleases for *in vivo* genome editing. **BioRxiv preprint**. 2017. DOI: 10.1101/192799.

BIKARD, D.; JIANG, W. Y.; SAMAI, P.; HOCHSCHILD, A.; ZHANG, F.; MARRAFFINI, L. A. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 15, p. 7429–7437, 2013. DOI: 10.1093/nar/gkt520.

BOLUKBASI, M. F.; GUPTA, A.; OIKEMUS, S.; DERR, A. G.; GARBER, M.; BRODSKY, M. H.; ZHU, L. J.; WOLFE, S. A. DNA-binding-domain fusions enhance the targeting range and precision of Cas9. **Nature Methods**, v. 12, n. 12, p. 1150–1156, 2015. DOI: 10.1038/nmeth.3624.

BREZGIN, S.; KOSTYUSHEVA, A.; KOSTYUSHEV, D.; CHULANOV, V. Dead Cas systems: types, principles, and applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 1-26, 2019. DOI: 10.3390/ijms20236041.

BROWN, J. K. M. Yield penalties of disease resistance in crops. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 4, p. 339-344, 2002. DOI: 10.1016/S1369-5266(02)00270-4.

CAMPBELL, J. E.; LOBELL, D. B.; GENOVA, R. C.; FIELD, C. B. The global potential of bioenergy on abandoned agriculture lands. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 15, p. 5791-5794, 2008. DOI: 10.1021/es800052w.

CEBRIAN-SERRANO, A.; DAVIES, B. CRISPR-Cas orthologues and variants: optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools. **Mammalian Genome**, v. 28, n. 7-8, p. 247-261, 2017. DOI: 10.1007/s00335-017-9697-4.

CHEN, K.; WANG, Y.; ZHANG, R.; ZHANG, H.; GAO, C. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, p. 667-697, 2019. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050718-100049.

CHO, S. W.; KIM, S.; KIM, Y.; KWEON, J.; KIM, H. S.; BAE, S.; KIM, J. S. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. **Genome Research**, v. 24, n. 1, p. 132-141, 2014. DOI: 10.1101/gr.162339.113.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Resolução Normativa nº 16, de 15 de janeiro de 2018**. Disponível em: <<http://ctnbio.mctic.gov.br/resolucoes-normativas>>. Acesso em: 27 ago. 2020.

CONG, L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HABIB, N.; HSU, P. D.; WU, X.; JIANG, W.; MARRAFFINI, L. A.; ZHANG, f. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819-823, 2013. DOI: 10.1126/science.1231143.

COX, D. B. T.; GOOTENBERG, J. S.; ABUDAYYEH, O. O.; FRANKLIN, B.; KELLNER, M. J.; JOUNG, J.; ZHANG, F. RNA editing with CRISPR-Cas13. **Science**, v. 358, n. 6366, p. 1019-1027, 2017. DOI: 10.1126/science.aag0180.

CRADICK, T. J.; FINE, E. J.; ANTICO, C. J.; BAO, G. CRISPR/Cas9 systems targeting  $\beta$ -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 20, p. 9584-9592, 2013. DOI: 10.1093/nar/gkt714.

CURTIN, S. J.; MICHNO, J. M.; CAMPBELL, B. W.; GIL-HUMANES, J.; MATHIONI, S. M.; HAMMOND, R.; GUTIERREZ-GONZALEZ, J. J.; DONOHUE, R. C.; KANTAR, M. B.; EAMENS, A. L.; MEYERS, B. C.; VOYTAS, D. F.; STUPAR, R. M. MicroRNA maturation and microRNA target gene expression regulation are severely disrupted in soybean dicer-like1 double mutants. **G3-Genes Genomes Genetics**, v. 6, n. 2, p. 423-433, 2016. DOI: 10.1534/g3.115.022137.

DAMATTA, F. M.; GRANDIS, A.; ARENQUE, B. C.; BUCKERIDGE, M. S. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. **Food Research International**, v. 43, n. 7, p. 1814-1823, 2010. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.11.001.

DAVIES, J. P.; KUMAR, S.; SASTRY-DENT, L. Use of zinc-finger nucleases for crop improvement. In: WEEKS, D. P.; YANG, B. (Ed.). **Gene editing in plants**. San Diego: Academic Press, 2017. p. 47-63. (Progress in molecular biology and translational science, 149). DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.03.006.

- DIANOV, G. L.; HÜBSCHER, U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 6, p. 3483–3490, 2013. DOI: 10.1093/nar/gkt076.
- DOEBLEY, J. F.; GAUT, B. S.; SMITH, B. D. The molecular genetics of crop domestication. **Cell**, v. 127, n. 5, p. 1309–1321, 2006. DOI 10.1080/03081079.2015.1106730.
- DOUDNA LAB. **CRISPR systems**. Berkeley, 2020. Disponível em: <[https://doudnalab.org/research\\_areas/crispr-systems/](https://doudnalab.org/research_areas/crispr-systems/)>. Acesso em: 27 ago. 2020.
- DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1077–1086, 2014. DOI: 10.1126/science.1258096.
- EISENSTEIN, M. Plant breeding: discovery in a dry spell. **Nature**, v. 501, n. 7468, p. S7–S9, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/50157a>.
- FAO. **The state of food security and nutrition in the world: safeguarding against economic slowdown and downturns**. Rome, 2019.
- FONFARA, I.; RICHTER, H.; BRATOVIČ, M.; LE RHUN, A.; CHARPENTIER, E. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. **Nature**, v. 532, n. 7600, p. 517–521, 2016. DOI: 10.1038/nature17945.
- FU, Y.; FODEN, J. A.; KHAYTER, C.; MAEDER, M. L.; REYON, D.; JOUNG, J. K.; SANDER, J. D. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 822–826, 2013. DOI: 10.1038/nbt.2623.
- FU, Y.; SANDER, J. D.; REYON, D.; CASCIO, V. M.; JOUNG, J. K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 279–284, 2014. DOI: 10.1038/nbt.2808.
- GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 397–405, 2013. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
- GAO, H.; GADLAGE, M. J.; LAFITTE, H. R.; LENDERTS, B.; YANG, M.; SCHRODER, M.; FARRELL, J.; SNOPEK, K.; PETERSON, D.; FEIGENBUTZ, L.; JONES, S.; ST CLAIR, G.; RAHE, M.; SANYOUR-DOYEL, N.; PENG, C. N.; WANG, L. J.; YOUNG, J. K.; BEATTY, M.; DAHIKE, B.; HAZEBROEK, J.; GREENE, T. W.; CIGAN, A. M.; CHILCOAT, N. D.; MEELEY, R. B. Superior field performance of waxy corn engineered using CRISPR–Cas9. **Nature Biotechnology**, v. 38, p. 579–581, 2020a. DOI: 10.1038/s41587-020-0444-0.
- GAO, H.; MUTTI, J.; YOUNG, J. K.; YANG, M.; SCHRODER, M.; LENDERTS, B.; WANG, L.; PETERSON, D.; ST CLAIR, G.; JONES, S.; FEIGENBUTZ, L.; MARSH, W.; ZENG, M.; WAGNER, S.; FARRELL, J.; SNOPEK, K.; SCHELONGE, C.; SOPKO, X.; SANDER, J. D.; BETTS, S.; CIGAN, A. M.; CHILCOAT, N. D. Complex trait loci in maize enabled by CRISPR–Cas9 mediated gene insertion. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1–14, 2020b. DOI: 10.3389/fpls.2020.00535.
- GARNEAU, J. E.; DUPUIS, M. È.; VILLION, M.; ROMERO, D. A.; BARRANGOU, R.; BOYAVAL, P.; FREMAUX, C.; HORVATH, P.; MAGADÁN, A. H.; MOINEAU, S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. **Nature**, v. 468, n. 7320, p. 67–71, 2010. DOI: 10.1038/nature09523.
- GASIUNAS, G.; BARRANGOU, R.; HORVATH, P.; SIKSNYS, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. **Proceedings of the National**

**Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 39, p. E2579–E2586, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1208507109.

GASIUNAS, G.; YOUNG, J. K.; KARVELIS, T.; KAZLAUSKAS, D.; URBAITIS, T.; JASNAUSKAITE, M.; GRUSYTE, M.; PAULRAJ, S.; WANG, P. H.; HOU, Z.; DOOLEY, S. K.; CIGAN, M.; ALARCON, C.; CHILCOAT, N. D.; BIGELYTE, G.; CURCURU, J. L.; MABUCHI, M.; SUN, Z.; FUCHS, R. T.; SCHILDKRAUT, E.; WEIGELE, P. R.; JACK, W. E.; ROBB, G. B.; VENCLOVAS, C.; SIKSNYS, V. Biochemically diverse CRISPR-Cas9 orthologs. **bioRxiv**: the preprint server for biology, 2020. DOI:10.1101/2020.04.29.066654.

HALE, C. R.; ZHAO, P.; OLSON, S.; DUFF, M. O.; GRAVELEY, B. R.; WELLS, L.; TERNS, R. M.; TERNS, M. P. RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 945–956, 2009. DOI: 10.1016/j.cell.2009.07.040.

HARRISON, R. G.; LARSON, E. L. Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. **Journal of Heredity**, v. 105, p. 795–809, 2014. DOI: 10.1093/jhered/esu033.

HERBERT, L.; MEUNIER, A. C.; BES, M.; VERNET, A.; PORTEFAIX, M.; DURANDET, F.; MICHEL, R.; CHAINE, C.; THIS, P.; GUIDERDONI, E.; PERIN, C. Beyond seek and destroy: how to generate allelic series using genome editing tools. **Rice**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1186/s12284-020-0366-y.

HSU, P. D.; SCOTT, D. A.; WEINSTEIN, J. A.; RAN, F. A.; KONERMANN, S.; AGARWALA, V.; LI, Y.; FINE, E. J.; WU, X.; SHALEM, O.; CRADICK, T. J.; MARRAFINI, L. A.; BAO, G.; ZHANG, F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 827–832, 2013. DOI: 10.1038/nbt.2647.

HU, J. H.; MILLER, S. M.; GEURTS, M. H.; TANG, W.; CHEN, L.; SUN, N.; ZEINA, C. M.; GAO, X.; REES, H. A.; LIN, Z.; LIU, D. R. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. **Nature**, v. 556, n. 7699, p. 57–63, 2018. DOI: 10.1038/nature26155.

HU, Y.; ZHANG, J.; JIA, H.; SOSSO, D.; LI, T.; FROMMER, W. B.; YANG, B.; WHITE, F. F.; WANG, N.; JONES, J. B. Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 4, p. E521–E529, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1313271111.

ISHINO, Y.; SHINAGAWA, H.; MAKINO, K.; AMEMURA, M.; NAKATA, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429–5433, 1987. DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.

IYER, V.; SHEN, B.; ZHANG, W.; HODGKINS, A.; KEANE, T.; HUANG, X.; SKARNES, W. C. Off-target mutations are rare in Cas9-modified mice. **Nature Methods**, v. 12, n. 6, p. 479–479, 2015. DOI: 10.1038/nmeth.3408.

JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H.; BERG, P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 10, p. 2904–2909, 1972. DOI: 10.1073/pnas.69.10.2904.

JACOBSEN, E.; SCHOUTEN, H. J. Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 219–223, 2007. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.03.008.

- JANSEN, R.; van EMBDEN, J. D. A.; GAASTRA, W.; SCHOOLS, L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1565–1575, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- JANSING, J.; SCHIERMEYER, A.; SCHILLBERG, S.; FISCHER, R.; BORTESI, L. Genome editing in agriculture: technical and practical considerations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p. 1–33, 2019. DOI: 10.3390/ijms20122888.
- JI, X.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; GAO, C. Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. **Nature Plants**, v. 1, n. 10, p. 1–4, 2015. DOI: 10.1038/NPLANTS.2015.144.
- JIA, H.; ZHANG, Y.; ORBOVIĆ, V.; XU, J.; WHITE, F. F.; JONES, J. B.; WANG, N. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 7, p. 817–823, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12677.
- JIANG, F.; DOUDNA, J. A. CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. **Annual Review of Biophysics**, v. 46, p. 505–529, 2017. DOI: 0.1146/annurev-biophys-062215-010822.
- JIANG, F.; ZHOU, K.; MA, L.; GRESSEL, S.; DOUDNA, J. A. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. **Science**, v. 348, n. 5242, p. 1477–1481, 2015. DOI: 10.1126/science.aab1452.
- JIANG, W. Z.; HENRY, I. M.; LYNAGH, P. G.; COMAI, L.; CAHOON, E. B.; WEEKS, D. P. Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 5, p. 648–657, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12663.
- JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 2012. DOI: 10.1126/science.1225829.
- JUNG, J. H.; ALTPETER, F. TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid O-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall composition for production of bioethanol. **Plant Molecular Biology**, v. 92, n. 1–2, p. 131–142, 2016. DOI: 10.1007/s11103-016-0499-y.
- KIM, D.; BAE, S.; PARK, J.; KIM, E.; KIM, S.; YU, H. R.; HWANG, J.; KIM, J.; KIM, J. S. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR–Cas9 off-target effects in human cells. **Nature Methods**, v. 12, n. 5, p. 237–243, 2015. DOI: 10.1038/NMETH.3284.
- KIM, J.; KIM, J. Y. New era of precision plant breeding using genome editing. **Plant Biotechnology Reports**, v. 13, n. 5, p. 419–421, 2019. DOI: 10.1007/s11816-019-00581-w.
- KIM, S.; KIM, D.; CHO, S. W.; KIM, J.; KIM, J. S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. **Genome Research**, v. 24, n. 6, p. 1012–1019, 2014. DOI: 10.1101/gr.171322.113.
- KLEINSTIVER, B. P.; PATTANAYAK, V.; PREW, M. S.; TSAI, S. Q.; NGUYEN, N. T.; ZHENG, Z. L.; JOUNG, J. K. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. **Nature**, v. 529, n. 7587, p. 490–495, 2016. DOI: 10.1038/nature16526.

KLEINSTIVER, B. P.; PREW, M. S.; TSAI, S. Q.; TOPKAR, V. V.; NGUYEN, N. T.; ZHENG, Z.; GONZALES, A. P. W.; LI, Z.; PETERSON, R. T.; YEY, J. R. J.; ARYEE, M. J.; JOUNG, J. K. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. **Nature**, v. 523, n. 7561, p. 481–485, 2015. DOI: 10.1038/nature14592.

KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S. CRISPR-Cas: Evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes. **RNA Biology**, v. 10, n. 5, p. 679–686, 2013. DOI: 10.4161/rna.24022.

KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S.; ZHANG, F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 37, p. 67–78, 2017. DOI: 10.1016/j.mib.2017.05.008.

KULCSÁR, P. I.; TÁLAS, A.; TÓTH, E.; NYESTE, A.; LIGETI, Z.; WELKER, Z.; WELKER, E. Blackjack mutations improve the on-target activities of increased fidelity variants of SpCas9 with 5′G-extended sgRNAs. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-15021-5.

LEMMON, Z. H.; REEM, N. T.; DALRYMPLE, J.; SOYK, S.; SWARTWOOD, K. E.; RODRIGUEZ-LEAL, D.; VAN ECK, J.; LIPPMAN, Z. B. Rapid improvement of domestication traits in an orphan crop by genome editing. **Nature Plants**, v. 4, n. 10, p. 766–770, 2018. DOI: 10.1038/s41477-018-0259-x.

LI, C.; LIU, C.; QI, X.; WU, Y.; FEI, X.; MAO, L.; CHENG, B.; LI, X.; XIE, C. RNA-guided Cas9 as an in vivo desired-target mutator in maize. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 12, p. 1566–1576, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12739.

LI, H.; LI, J.; CHEN, J.; YAN, L.; XIA, L. Precise modifications of both exogenous and endogenous genes in rice by prime editing. **Molecular Plant**, v. 13, n. 5, p. 671–674, 2020a. DOI: 10.1016/j.molp.2020.03.011.

LI, H.; YANG, Y.; HONG, W.; HUANG, M.; WU, M.; ZHAO, X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-23, 2020b. DOI: 10.1038/s41392-019-0089-y.

LI, J.; LI, H.; CHEN, J.; YAN, L.; XIA, L. Toward Precision Genome Editing in Crop Plants. **Molecular Plant**, v. 3, n. 6, p. 811–813, 2020c. DOI 10.1016/j.molp.2020.04.008.

LI, J.; STODDARD, T. J.; DEMOREST, Z. L.; LAVOIE, P. O.; LUO, S.; CLASEN, B. M.; CEDRONE, F.; RAY, E. E.; COFFMAN, A. P.; DAULHAC, A.; YABANDITH, A.; RETTERATH, A. J.; MATHIS, L.; VOYTAS, D. F.; D'AOUST, M. A.; ZHANG, F. Multiplexed, targeted gene editing in *Nicotiana benthamiana* for glyco-engineering and monoclonal antibody production. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 2, p. 533–542, 2016. DOI: 10.1111/pbi.12403.

LI, T.; LIU, B.; SPALDING, M. H.; WEEKS, D. P.; YANG, B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 390–392, 2012. DOI: 10.1038/nbt.2199.

LI, T.; YANG, X.; YU, Y.; SI, X.; ZHAI, X.; ZHANG, H.; DONG, W.; GAO, C.; XU, C. Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1160–1163, 2018b. DOI: 10.1038/nbt.4273.

LI, X.; LI, L.; YAN, J. Dissecting meiotic recombination based on tetrad analysis by single-microspore sequencing in maize. **Nature Communications**, v. 6, p. 1-9, 2015. DOI: 10.1038/ncomms7648.

LI, X.; WANG, Y.; CHEN, S.; TIAN, H.; FU, D.; ZHU, B.; LUO, Y.; ZHU, H. Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-12, 2018a. DOI: 10.3389/fpls.2018.00559.

- LIN, Q.; ZONG, Y.; XUE, C.; WANG, S.; JIN, S.; ZHU, Z.; WANG, Y.; ANZALONE, A. V.; RAGURAM, A.; DOMAN, J. L.; LIU, D. R.; GAO, C. Prime genome editing in rice and wheat. **Nature Biotechnology**, v. 38, p. 582–585, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0455-x.
- LIN, T.; ZHU, G.; ZHANG, J.; XU, X.; YU, Q.; ZHENG, Z.; ZHANG, Z.; LUN, Y.; LI, S.; WANG, X.; HUANG, Z.; LI, J.; ZHANG, C.; WANG, T.; ZHANG, Y.; WANG, A.; ZHANG, Y.; LIN, K.; LI, C.; XIONG, G.; XUE, Y.; MAZZUCATO, A.; CAUSSE, M.; FEI, Z.; GIOVANNONI, J.; CHETELAT, R. T.; ZAMIR, D.; STADLER, T.; LI, J.; YE, Z.; DU, Y.; HUANG, S. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. **Nature Genetics**, v. 46, n. 11, p. 1220–1226, 2014. DOI: 10.1038/ng.3117.
- LOBELL, D. B.; GOURDJI, S. M. The Influence of Climate Change on Global Crop Productivity. **Plant Physiology**, v. 160, n. 4, p. 1686–1697, 2012. DOI: 10.1104/pp.112.208298.
- LOWE, K.; WU, E.; WANG, N.; HOERSTER, G.; HASTINGS, C.; CHO, M. J.; SCELONGE, C.; LENDERTS, B.; CHAMBERLIN, M.; CUSHATT, J.; WANG, L.; RYAN, L.; KHAN, T.; CHOW-YIU, J.; HUA, W.; YU, M.; BANH, J.; BAO, Z.; BRINK, K.; IGO, E.; RUDRAPPA, B.; SHAMSEER, P. M.; BRUCE, W.; NEWMAN, L.; SHEN, B.; ZHENG, P.; BIDNEY, D.; FALCO, C.; REGISTER, J.; ZHAO, Z.; XU, D.; JONES, T.; GORDON-KAMM, W. Morphogenic regulators baby boom and wuschel improve monocot transformation. **The Plant Cell**, v. 28, n. 9, p. 1998–2015, 2016. DOI: 10.1105/tpc.16.00124.
- MA, X.; ZHANG, Q.; ZHU, Q.; LIU, W.; CHEN, Y.; QIU, R.; WANG, B.; YANG, Z.; LI, H.; LIN, Y.; XIE, Y.; SHEN, R.; CHEN, S.; WANG, Z.; CHEN, Y.; GUO, J.; CHEN, L.; ZHAO, X.; DONG, Z.; LIU, Y. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 8, p. 1274–1284, 2015. DOI: 10.1016/j.molp.2015.04.007.
- MAHAS, A.; AMAN, R.; MAHFOUZ, M. CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants. **Genome Biology**, v. 20, n. 1, p. 1–16, 2019. DOI: 10.1186/s13059-019-1881-2.
- MAHER, M. F.; NASTI, R. A.; VOLLBRECHT, M.; STARKER, C. G.; CLARK, M. D.; VOYTAS, D. F. Plant gene editing through de novo induction of meristems. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 84–89, 2020. DOI: 10.1038/s41587-019-0337-2.
- MALI, P.; AACH, J.; STRANGES, P. B.; ESVELT, K. M.; MOOSBURNER, M.; KOSURI, S.; YANG, L.; CHURCH, G. M. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 833–838, 2013. DOI: 10.1038/nbt.2675.
- MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 55–61, 2015. DOI: 10.1038/nature15386.
- MARRAFFINI, L. A.; SONTHEIMER, E. J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in Staphylococci by targeting DNA. **Science**, v. 322, n. 5909, p. 1843–1845, 2008. DOI: 10.1126/science.1165771.
- MAZUR, B. J.; TINGEY, S. V. Genetic mapping and introgression of genes of agronomic importance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 175–182, 1995. DOI: 10.1016/0958-1669(95)80028-X.
- MCCOUCH, S.; BAUTE, G. J.; BRADEEN, J.; BRAMEL, P.; BRETTING, P. K.; BUCKLER, E.; BURKE, J. M.; CHAREST, D.; CLOUTIER, S.; COLE, G.; DEMPEWOLF, H.; DINGKUHN, M.; FEUILLET, C.; GEPTS, P.; GRATTAPAGLIA, D.; GUARINO, L.; JACKSON, S.; KNAPP, S.; LANGRIDGE, P.; LAWTON-RAUH, A.; LIJUA, Q.; LUSTY, C.; MICHAEL, T.; MYLES, S.; NAITO, K.; NELSON, R. L.; PONTAROLLO, R.; RICHARDS, C. M.;

RIESEBERG, L.; ROSS-IBARRA, J.; ROUNSLEY, S.; HAMILTON, R. S.; SCHURR, U.; STEIN, N.; TOMOOKA, N.; VAN DER KNAAP, E.; VAN TASSEL, D.; TOLL, J.; VALLS, J.; VARSHNEY, R. K.; WARD, J.; WAUGH, R.; WENZL, P.; ZAMIR, D. Feeding the future. **Nature**, v. 499, n. 7456, p. 23–24, 2013. DOI: 10.1038/499023a.

METJE-SPRINK, J.; SPRINK, T.; HARTUNG, F. Genome-edited plants in the field. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 1–6, 2020. DOI: 10.1016/j.copbio.2019.08.007.

MIAO, C.; XIAO, L.; HUA, K.; ZOU, C.; ZHAO, Y.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K. Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 23, p. 6058–6063, 2018. DOI: 10.1073/pnas.1804774115.

MISHRA, R.; JOSHI, R. K.; ZHAO, K. Base editing in crops: current advances, limitations and future implications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, p. 20–31, 2020. DOI: 10.1111/pbi.13225.

MOJICA, F. J. M.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; ALMENDROS, C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. **Microbiology**, v. 155, p. 733–740, 2009. DOI: 10.1099/mic.0.023960-0.

MOJICA, F. J. M.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; SORIA, E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. **Journal of molecular evolution**, v. 60, n. 2, p. 174–182, 2005. DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3.

MOJICA, F. J. M.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; SORIA, E.; JUEZ, G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 244–246, 2000. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x.

MOJICA, F. J. M.; JUEZ, G.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 613–621, 1993. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x.

MOLLA, K. A.; YANG, Y. CRISPR/Cas-mediated base editing: technical considerations and practical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 1121–1142, 2019. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.03.008.

MORINEAU, C.; BELLEC, Y.; TELLIER, F.; GISSOT, L.; KELEMEN, Z.; NOGUÉ, F.; FAURE, J. D. Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid *Camelina sativa*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 6, p. 729–739, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12671.

MOUT, R.; RAY, M.; LEE, Y. W.; SCALETTI, F.; ROTELLO, V. M. In vivo delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic gene editing: progress and challenges. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 880–884, 2017. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00057.

MOYLE, L. C.; NAKAZATO, T. Comparative genetics of hybrid incompatibility: sterility in two solanum species crosses. **Genetics**, v. 179, n. 3, p. 1437–1453, 2008. DOI: 10.1534/genetics.107.083618.

MUROVEC, J.; PIRC, Z.; YANG, B. New variants of CRISPR RNA-guided genome editing enzymes. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 8, p. 917–926, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12736.

NAKAYASU, M.; AKIYAMA, R.; LEE, H. J.; OSAKABE, K.; OSAKABE, Y.; WATANABE, B.; SUGIMOTO, Y.; UMEMOTO, N.; SAITO, K.; MURANAKA, T.; MIZUTANI, M. Generation of  $\alpha$ -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the St16DOX gene. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 131, p. 70–77, 2018. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.04.026.

- NEKRASOV, V.; WANG, C.; WIN, J.; LANZ, C.; WEIGEL, D.; KAMOUN, S. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–6, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-00578-x.
- NISHIMASU, H.; SHI, X.; ISHIGURO, S.; GAO, L.; HIRANO, S.; OKAZAKI, S.; NODA, T.; ABUDAYYEH, O. O.; GOOTENBERG, J. S.; MORI, H.; OURA, S.; HOLMES, B.; TANAKA, M.; SEKI, M.; HIRANO, H.; ABURATANI, H.; ISHITANI, R.; IKAWA, M.; YACHIE, N.; ZHANG, F.; NUREKI, O. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. **Science**, v. 361, n. 6408, p. 1259–1262, 2018. DOI: 10.1126/science.aas9129.
- OKUZAKI, A.; OGAWA, T.; KOIZUKA, C.; KANEKO, K.; INABA, M.; IMAMURA, J.; KOIZUKA, N. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 131, p. 63–69, 2018. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.04.025.
- OZUNA, C. V.; IEHISA, J. C. M.; GIMÉNEZ, M. J.; ALVAREZ, J. B.; SOUSA, C.; BARRO, F. Diversification of the celiac disease  $\alpha$ -gliadin complex in wheat: a 33-mer peptide with six overlapping epitopes, evolved following polyploidization. **Plant Journal**, v. 82, n. 5, p. 794–805, 2015. DOI: 10.1111/tbj.12851.
- PENG, A.; CHEN, S.; LEI, T.; XU, L.; HE, Y.; WU, L.; YAO, L.; ZOU, X. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 12, p. 1509–1519, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12733.
- PEREZ-PINERA, P.; KOCAK, D. D.; VOCKLEY, C. M.; ADLER, A. F.; KABADI, A. M.; POLSTEIN, L. R.; THAKORE, P. I.; GLASS, K. A.; OUSTEROUT, D. G.; LEONG, K. W.; GUILAK, F.; CRAWFORD, G. E.; REDDY, T. E.; GERSBACH, C. A. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, p. 973–976, 2013. DOI: 10.1038/NMETH.2600.
- POURCEL, C.; SALVIGNOL, G.; VERGNAUD, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology**, v. 151, p. 653–663, 2005. DOI: 10.1099/mic.0.27437-0.
- PURUGGANAN, M. D.; FULLER, D. Q. The nature of selection during plant domestication. **Nature**, v. 457, n. 7231, p. 843–848, 2009. DOI: 10.1038/nature07895.
- QIN, L.; LI, J.; WANG, Q.; XU, Z.; SUN, L.; ALARIQI, M.; MANGHWAR, H.; WANG, G.; LI, B.; DING, X.; RUI, H.; HUANG, H.; LU, T.; LINDSEY, K.; DANIELL, H.; ZHANG, X.; JIN, S. High-efficient and precise base editing of C •G to T•A in the allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) genome using a modified CRISPR/Cas9 system. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, n. 1, p. 45–56, 2020. DOI: 10.1111/pbi.13168.
- QUE, Q.; CHILTON, M. D. M.; DE FONTES, C. M.; HE, C.; NUCCIO, M.; ZHU, T.; WU, Y.; CHEN, J. S.; SHI, L. Trait stacking in transgenic crops: challenges and opportunities. **GM Crops**, v. 1, n. 4, p. 220–229, 2010. DOI: 10.4161/gmcr.1.4.13439.
- RAN, F. A.; CONG, L.; YAN, W. X.; SCOTT, D. A.; GOOTENBERG, J. S.; KRIZ, A. J.; ZETSCHKE, B.; SHALEM, O.; WU, X.; MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V.; SHARP, P. A.; ZHANG, F. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. **Nature**, v. 520, n. 7546, p. 186–191, 2015. DOI: 10.1038/nature14299.
- RAN, F. A.; HSU, P. D.; LIN, C. Y.; GOOTENBERG, J. S.; KONERMANN, S.; TREVINO, A. E.; SCOTT, D. A.; INOUE, A.; MATOBA, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1380–1389, 2013. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.021.

REWERS, M. Epidemiology of celiac disease: what are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease? **Gastroenterology**, v. 128, n. 4, p. S47–S51, 2005. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.02.030.

RICROCH, A. Global developments of genome editing in agriculture. **Transgenic Research**, v. 28, p. 45–52, 2019. DOI: 10.1007/s11248-019-00133-6.

RICROCH, A.; HARWOOD, W.; SVOBODOVÁ, Z.; SÁGI, L.; HUNDLEBY, P.; BADEA, E. M.; ROSCA, I.; CRUZ, G.; SALEMA FEVEREIRO, M. P.; MARFÀ RIERA, V.; JANSSON, S.; MORANDINI, P.; BOJINOV, B.; CETINER, S.; CUSTERS, R.; SCHRADER, U.; JACOBSEN, H. J.; MARTIN-LAFFON, J.; BOISRON, A.; KUNTZ, M. Challenges facing european agriculture and possible biotechnological solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 5, p 875–883, 2016. DOI: 10.3109/07388551.2015.1055707.

RODRÍGUEZ-LEAL, D.; LEMMON, Z. H.; MAN, J.; BARTLETT, M. E.; LIPPMAN, Z. B. Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. **Cell**, v. 171, n. 2, p. 470-480, 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2017.08.030.

SAN FILIPPO, J.; SUNG, P.; KLEIN, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p. 229–257, 2008. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255.

SÁNCHEZ-LEÓN, S.; GIL-HUMANES, J.; OZUNA, C. V.; GIMÉNEZ, M. J.; SOUSA, C.; VOYTAS, D. F.; BARRO, F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 4, p. 902–910, 2018. DOI: 10.1111/pbi.12837.

SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 347–355, 2014. DOI: 10.1038/nbt.2842.

SATHEESH, V.; ZHANG, H.; WANG, X.; LEI, M. Precise editing of plant genomes – prospects and challenges. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 96, p. 115–123, 2019. DOI: 10.1016/j.semcdb.2019.04.010.

SCHMIDT, S. M.; BELISLE, M.; FROMMER, W. B. The evolving landscape around genome editing in agriculture: many countries have exempted or move to exempt forms of genome editing from GMO regulation of crop plants. **EMBO Reports**, v. 21, n. 6, p. 1-4, 2020. DOI: 10.15252/embr.202050680.

SCHNEIDER, K.; SCHIERMEYER, A.; DOLLS, A.; KOCH, N.; HERWARTZ, D.; KIRCHHOFF, J.; FISCHER, R.; RUSSELL, S. M.; CAO, Z.; CORBIN, D. R.; SASTRY-DENT, L.; AINLEY, W. M.; WEBB, S. R.; SCHINKEL, H.; SCHILLBERG, S. Targeted gene exchange in plant cells mediated by a zinc finger nuclease double cut. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 5, p. 1151–1160, 2016. DOI: 10.1111/pbi.12483.

SEDBROOK, J. C.; PHIPPEN, W. B.; MARKS, M. D. New approaches to facilitate rapid domestication of a wild plant to an oilseed crop: example pennycress (*Thlaspi arvense* L.). **Plant science**, v. 227, p. 122–132, 2014. DOI: 10.1016/j.plantsci.2014.07.008.

SEDEEK, K. E. M.; MAHAS, A.; MAHFOUZ, M. Plant genome engineering for targeted improvement of crop traits. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–16, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.00114.

SHAH, S. A.; ERDMANN, S.; MOJICA, F. J. M.; GARRETT, R. A. Protospacer recognition motifs: mixed identities and functional diversity. **RNA Biology**, v. 10, n. 5, p. 891–899, 2013. DOI: 10.4161/rna.23764.

SHAH, T.; ANDLEEB, T.; LATEEF, S.; NOOR, M. A. Genome editing in plants: advancing crop transformation and overview of tools. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 131, p. 12–21, 2018. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.05.009.

SHAN, Q.; ZHANG, Y.; CHEN, K.; ZHANG, K.; GAO, C. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the OsBADH2 gene using TALEN technology. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 6, p. 791–800, 2015. DOI: 10.1111/pbi.12312.

SHI, J.; GAO, H.; WANG, H.; LAFITTE, H. R.; ARCHIBALD, R. L.; YANG, M.; HAKIMI, S. M.; MO, H.; HABBEN, J. E. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 2, p. 207–216, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12603.

SHMAKOV, S.; SMARGON, A.; SCOTT, D.; COX, D.; PYZOSKA, N.; YAN, W.; ABUDAYYEH, O. O.; GOOTENBERG, J. S.; MAKAROVA, K. S.; WOLF, Y. I.; SEVERINOV, K.; ZHANG, F.; KOONIN, E. V. Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 169–182, 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.184.

SHUKLA, V. K.; DOYON, Y.; MILLER, J. C.; DEKELVER, R. C.; MOEHLE, E. A.; WORDEN, S. E.; MITCHELL, J. C.; ARNOLD, N. L.; GOPALAN, S.; MENG, X.; CHOI, V. M.; ROCK, J. M.; WU, Y. Y.; KATIBAH, G. E.; ZHIFANG, G.; MCCASKILL, D.; SIMPSON, M. A.; BLAKESLEE, B.; GREENWALT, S. A.; BUTLER, H. J.; HINKLEY, S. J.; ZHANG, L.; REBAR, E. J.; GREGORY, P. D.; URNOV, F. D. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 437–441, 2009. DOI: 10.1038/nature07992.

SIPPEL, S.; MEINSHAUSEN, N.; FISCHER, E. M.; SZÉKELY, E.; KNUTTI, R. Climate change now detectable from any single day of weather at global scale. **Nature Climate Change**, v. 10, n. 1, p. 35–41, 2020. DOI: 10.1038/s41558-019-0666-7.

SLAYMAKER, I. M.; GAO, L.; ZETSCHKE, B.; SCOTT, D. A.; YAN, W. X.; ZHANG, F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. **Science**, v. 351, n. 6268, p. 84–88, 2016. DOI: 10.1126/science.aad5227.

STEINWAND, M. A.; RONALD, P. C. Crop biotechnology and the future of food. **Nature Food**, v. 1, p. 273–283, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0072-3>.

STERNBERG, S. H.; REDDING, S.; JINEK, M.; GREENE, E. C.; DOUDNA, J. A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. **Nature**, v. 507, n. 7490, p. 62–67, 2014. DOI: 10.1038/nature13011.

SUN, Y.; JIAO, G.; LIU, Z.; ZHANG, X.; LI, J.; GUO, X.; DU, W.; DU, J.; FRANCIS, F.; ZHAO, Y.; XIA, L. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–15, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.00298.

TANG, X.; SRETENOVIC, S.; REN, Q.; JIA, X.; LI, M.; FAN, T.; YIN, D.; XIANG, S.; GUO, Y.; LIU, L.; ZHENG, X.; QI, Y.; ZHANG, Y. Plant prime editors enable precise gene editing in rice cells. **Molecular Plant**, v. 13, n. 5, p. 667–670, 2020. DOI: 10.1016/j.molp.2020.03.010.

TENG, F.; CUI, T.; FENG, G.; GUO, L.; XU, K.; GAO, Q.; LI, T.; LI, J.; ZHOU, Q.; LI, W. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. **Cell Discovery**, v. 4, p. 1–15, 2018. DOI: 10.1038/s41421-018-0069-3.

- TONG, S.; EBI, K. Preventing and mitigating health risks of climate change. **Environmental Research**, v. 174, p. 9–13, 2019. DOI: 10.1016/j.envres.2019.04.012.
- TOWNSEND, J. A.; WRIGHT, D. A.; WINFREY, R. J.; FU, F.; MAEDER, M. L.; JOUNG, J. K.; VOYTAS, D. F. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 442–445, 2009. DOI: 10.1038/nature07845.
- VARSHNEY, R. K.; RIBAUT, J. M.; BUCKLER, E. S.; TUBEROSA, R.; RAFALSKI, J. A.; LANGRIDGE, P. Can genomics boost productivity of orphan crops? **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 1172–1176, 2012. DOI: 10.1038/nbt.2440.
- WALTZ, E. CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 582, 2016. DOI: 10.1038/nbt0616-582.
- WALTZ, E. Nonbrowning GM apple cleared for market. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 326–327, 2015. DOI: 10.1038/nbt0415-326c.
- WANG, F.; WANG, C.; LIU, P.; LEI, C.; HAO, W.; GAO, Y.; LIU, Y. G.; ZHAO, K. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. **Plos One**, v. 11, n. 4, p. 1–18, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0154027.
- WANG, Y.; CHENG, X.; SHAN, Q.; ZHANG, Y.; LIU, J.; GAO, C.; QIU, J. L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 9, p. 947–951, 2014. DOI: 10.1038/nbt.2969.
- WIEDENHEFT, B.; STERNBERG, S. H.; DOUDNA, J. A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. **Nature**, v. 482, n. 7385, p. 331–338, 2012. DOI: 10.1038/nature10886.
- XU, R.; YANG, Y.; QIN, R.; LI, H.; QIU, C.; LI, L.; WEI, P.; YANG, J. Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. **Journal of Genetics And Genomics**, v. 43, n. 8, p. 529–532, 2016. DOI: 10.1016/j.jgg.2016.07.003.
- XU, W.; ZHANG, C.; YANG, Y.; ZHAO, S.; KANG, G.; HE, X.; SONG, J.; YANG, J. Versatile nucleotides substitution in plant using an improved prime editing system. **Molecular Plant**, v. 13, n. 5, p. 675–678, 2020. DOI: 10.1016/j.molp.2020.03.012.
- XU, Y.; CROUCH, J. H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. **Crop Science**, v. 48, n. 2, p. 391–407, 2008. DOI: 10.2135/cropsci2007.04.0191.
- YOUNG, J.; ZASTROW-HAYES, G.; DESCHAMPS, S.; SVITASHEV, S.; ZAREMBA, M.; ACHARYA, A.; PAULRAJ, S.; PETERSON-BURCH, B.; SCHWARTZ, C.; DJUKANOVIC, V.; LENDERTS, B.; FEIGENBUTZ, L.; WANG, L.; ALARCON, C.; SIKSNYS, V.; MAY, G.; CHILCOAT, N. D.; KUMAR, S. CRISPR-Cas9 editing in maize: systematic evaluation of off-target activity and its relevance in crop improvement. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-11, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-43141-6.
- ZAIDI, S. S. E. A.; MAHFOUZ, M. M.; MANSOOR, S. CRISPR-Cpf1: a new tool for plant genome editing. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 7, p. 550–553, 2017. DOI: 10.1016/j.tplants.2017.05.001.
- ZETSCHKE, B.; GOOTENBERG, J. S.; ABUDAYYEH, O. O.; SLAYMAKER, I. M.; MAKAROVA, K. S.; ESSLETZBICHLER, P.; VOLZ, S. E.; JOUNG, J.; VAN DER OOST, J.; REGEV, A.; KOONIN, E. V.; ZHANG, F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. **Cell**, v. 163, n. 3, p. 759–771, 2015. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038.

ZHANG, J.; ZHANG, H.; BOTELLA, J. R.; ZHU, J. K. Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *Waxy* gene in elite rice varieties. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 60, n. 5, p. 369–375, 2018a. DOI: 10.1111/jipb.12620.

ZHANG, N.; ROBERTS, H. M.; VAN ECK, J.; MARTIN, G. B. Generation and molecular characterization of CRISPR/Cas9-induced mutations in 63 immunity-associated genes in tomato reveals specificity and a range of gene modifications. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1-13, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2020.00010.

ZHANG, Q.; XING, H. L.; WANG, Z. P.; ZHANG, H. Y.; YANG, F.; WANG, X. C.; CHEN, Q. J. Potential high-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR/Cas9 in *Arabidopsis* and its prevention. **Plant Molecular Biology**, v. 96, n. 4-5, p. 445–456, 2018b. DOI: 10.1007/s11103-018-0709-x.

ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; LU, M. H.; CHAI, Y. P.; JIANG, Y. Y.; ZHOU, Y.; WANG, X. C.; CHEN, Q. J. A novel ternary vector system united with morphogenic genes enhances CRISPR/Cas delivery in maize. **Plant Physiology**, v. 181, n. 4, p. 1441–1448, 2019. DOI: 10.1104/pp.19.00767.

ZHANG, Y.; GE, X.; YANG, F.; ZHANG, L.; ZHENG, J.; TAN, X.; JIN, Z. B.; QU, J.; GU, F. Comparison of non-canonical PAMs for CRISPR/Cas9-mediated DNA cleavage in human cells. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-5, 2014. DOI: 10.1038/srep05405.

ZHANG, Y.; LIANG, Z.; ZONG, Y.; WANG, Y.; LIU, J.; CHEN, K.; QIU, J. L.; GAO, C. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–8, 2016. DOI: 10.1038/ncomms12617.

ZHOU, J.; PENG, Z.; LONG, J.; SOSSO, D.; LIU, B.; EOM, J. S.; HUANG, S.; LIU, S.; VERA CRUZ, C.; FROMMER, W. B.; WHITE, F. F.; YANG, B. Gene targeting by the TAL effector *Pthxo2* reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. **Plant Journal**, v. 82, n. 4, p. 632–643, 2015. DOI: 10.1111/tpj.12838.

ZSÖGÖN, A.; ČERMÁK, T.; NAVES, E. R.; NOTINI, M. M.; EDEL, K. H.; WEINL, S.; FRESCHI, L.; VOYTAS, D. F.; KUDLA, J.; PERES, L. E. P. De novo domestication of wild tomato using genome editing. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1211–1216, 2018.

ZSÖGÖN, A.; CERMAK, T.; VOYTAS, D.; PERES, L. E. P. Genome editing as a tool to achieve the crop ideotype and de novo domestication of wild relatives: Case study in tomato. **Plant Science** v. 256, p. 120–130, 2017.

# Edição de genoma via *non-homologous end joining* (NHEJ) e ribonucleoproteínas (RNP)

Guilherme Souza Prado  
Thaísa Tessutti Pinheiro  
Josias Correa de Faria  
Rosana Pereira Vianello

## Introdução

A edição de genomas é uma ferramenta que permite a manipulação do material genético de forma a induzir mutações em regiões de interesse para que o organismo apresente um fenótipo desejável, podendo, em alguns casos, não ser considerado transgênico. Devido a isso sua aplicação em plantas de interesse agrônomico tem despertado grande interesse, principalmente por simplificar etapas de regulamentação.

Existem quatro principais classes de nucleases que são empregadas nas novas tecnologias de edição gênica, sendo elas: meganucleases, *zinc-finger nucleases* (ZFNs); *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs); e *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)-*associated* (Cas) (Gaj et al., 2016). As meganucleases são endonucleases que clivam o DNA em regiões específicas, reconhecendo sequências maiores que 12 pb (pares de base). A família de meganucleases LAGLIDADG engloba I-Crel e I-SceI, que são as primeiras enzimas que foram usadas para edição gênica. Como apenas alguns resíduos de aminoácidos fazem contato com os nucleotídeos, essas enzimas foram manipuladas para clivar genes em locais específicos (Paques; Duchateau, 2007). Além disso, as ZFNs são enzimas artificiais que também foram uma das primeiras utilizadas com o intuito de induzir mutações dirigidas em plantas. Essas enzimas foram geradas a partir da fusão entre domínios do tipo *Zinc-Finger* e domínios da enzima de restrição *FokI*. Da mesma forma que as outras nucleases utilizadas na edição gênica, a ZFN insere quebras na dupla fita (DSBs-*double strand break*) em locais específicos no DNA que vão ser reparados e, por meio de falhas durante o mecanismo de reparo, podem surgir mutações (Carroll, 2011). O principal problema do uso desse sistema está na alta toxicidade dessa enzima e também pelo fato de ela gerar muitos efeitos *off-target* (Cornu et al., 2008; Ramirez et al., 2008), que podem prejudicar funções de genes que não deveriam ter seu funcionamento alterado (Zhang et al., 2015). Com a consolidação da edição

gênica como ferramenta biotecnológica e a busca por alternativas mais viáveis, a técnica TALEN foi desenvolvida a partir da fusão de efetores TAL (*transcription activator-like*), proteínas derivadas de patógenos que infectam plantas e têm a capacidade de se ligar ao DNA, ao domínio da endonuclease *FokI* (Moscou; Bogdanove, 2009). TALENs podem ser gerados a partir de uma biblioteca de plasmídeos que permite a montagem da proteína de interesse de forma combinatória. Apesar de essa técnica apresentar vantagens em relação ao ZFN, por utilizar proteínas menos tóxicas e mais fáceis de se manipularem (Mussolino et al., 2014), ainda é considerada mais trabalhosa em relação à CRISPR (Nemudryi et al., 2014).

Entre as técnicas que tornaram a edição de genoma mais acessível e revolucionária, o sistema CRISPR/Cas se destaca. Isso se deve pela simplicidade, baixo custo e alta eficiência da técnica em relação a outras ferramentas de edição, como ZFNs e TALENs. Devido a isso, o sistema CRISPR/Cas se tornou amplamente utilizado em laboratórios de biologia molecular de forma rotineira nos últimos anos, e atualmente é a principal ferramenta de edição genômica utilizada. O sistema CRISPR se baseia na indução de mutações no DNA por meio de cortes na fita dupla, de maneira extremamente específica e direcionada. Esses cortes são promovidos por endonucleases da família Cas e direcionados pelos chamados RNAs guias (gRNA). Eles serão reparados por uma das duas principais vias de reparo que a célula apresenta quando a dupla fita é danificada: recombinação homóloga (HR) ou *non-homologous end joining* (NHEJ) (Cardona; Morales, 2014). Maiores detalhes podem ser encontrados no Capítulo 1.

Focaremos aqui na utilização do sistema CRISPR/Cas para indução de mutações via NHEJ. O mecanismo NHEJ atua na maior parte do ciclo celular e não se baseia na homologia para reparar o DNA, podendo causar mutações do tipo inserções ou deleções (*indels*) ou ainda substituições. Desse modo, a expressão dos genes presentes no local onde houve reparo por NHEJ pode ser, em geral, totalmente interrompida, e as proteínas codificadas podem não ser funcionais (Cui et al., 2019). Com o objetivo de esclarecer o processo de edição do genoma por CRISPR, este capítulo visa abordar os detalhes do mecanismo NHEJ, bem como o uso de sistemas de ribonucleoproteínas (RNPs) para promover a edição, além de fornecer um procedimento prático para o delineamento de experimentos.

## Mecanismos de reparo genético

O sistema CRISPR atua por meio de cortes específicos na dupla fita do DNA em regiões genômicas de forma direcionada utilizando um RNA guia (gRNA) que, em seguida, é reparado, podendo causar a modulação de genes ou regiões promotoras.

Desse modo, esclarecer os principais sistemas de reparo utilizados pela célula para reconstrução da dupla fita torna-se fundamental para o entendimento da técnica. A importância de a informação genética ser transmitida através das gerações de forma precisa é evidente, tanto pelo eficiente sistema de replicação quanto pela complexidade e investimento da célula em um sistema de reparo especializado na correção dos diversos tipos de desordens do DNA.

Com esse objetivo, para sanar as alterações ocorridas no DNA, as células apresentam mecanismo de resposta aos danos. Um deles é o sistema DDR (*DNA Damage Response*), que é eficiente no reparo do DNA e atua por diversas vias e enzimas, dependendo do tipo de lesão ocorrida. Nesse mecanismo, quando as células sofrem danos, o processo de replicação é suspenso até que o reparo seja efetuado (Silva; Ideker, 2019). Para isso, ocorre uma cascata de sinalização que gera modificações na cromatina e deixa a extremidade danificada acessível às proteínas de reparo do DNA (Riches et al., 2008). Com a extremidade do DNA danificada exposta, o complexo Mre11-Rad50-NBS1 (MRN) se liga à DSB, recrutando proteínas-membros da família ATM (Ataxia Telangiectasia Mutada), que regulam a resposta ao dano por meio de fosforilações (Lavin; Kozlov, 2007). Desse modo, são ativados pontos de verificação do ciclo celular e remodelação da cromatina; tudo para que o DNA seja reparado antes de o ciclo celular continuar (Silva; Ideker, 2019). Entretanto, nos animais multicelulares, se o dano no material genético for irremediável, é ativada a apoptose para que a lesão não seja perpetuada (Norbury; Zhivotovsky, 2004).

Para que a célula realize o reparo da lesão no material genético, cinco principais vias de reparo são ativadas em diferentes momentos do ciclo celular. Quando o dano no material genético acontece em apenas uma das fitas (SSB, *single strand break*), os mecanismos de reparo são do tipo reparo de mal-pareamento (MMR, *mismatch repair*), reparo por excisão de bases (BER, *Base Excision Repair*) reparo por excisão de nucleotídeo (NER, *Nucleotide Excision Repair*). Porém, quando o DNA é danificado em ambas as fitas (DSB), podem ocorrer as vias de reparo por recombinação homóloga (HR) ou por *non-homologous end joining* (NHEJ) (Cardona; Morales, 2014), que são a base molecular da tecnologia CRISPR.

## *Non-homologous end joining* (NHEJ)

A via NHEJ não necessita de DNA-molde e é responsável por 75% dos reparos no material genético das células animais (Mao et al., 2008). Essa via de reparo leva cerca de 30 minutos para se completar, enquanto a HR é finalizada dentro de 7 horas ou mais (Mao et al., 2008). Na via NHEJ, quando a DSB é reparada, geralmente são formados *indels* que, ao modificarem a sequência de DNA original, podem causar

a inativação de genes (Her; Bunting, 2018). O reparo por NHEJ emprega, para isso, uma série de fatores essenciais que trabalham para detectar as DSBs, bem como alinhar e reparar as extremidades para que possam ser novamente ligadas (Her; Bunting, 2018).

## Mecanismo bioquímico

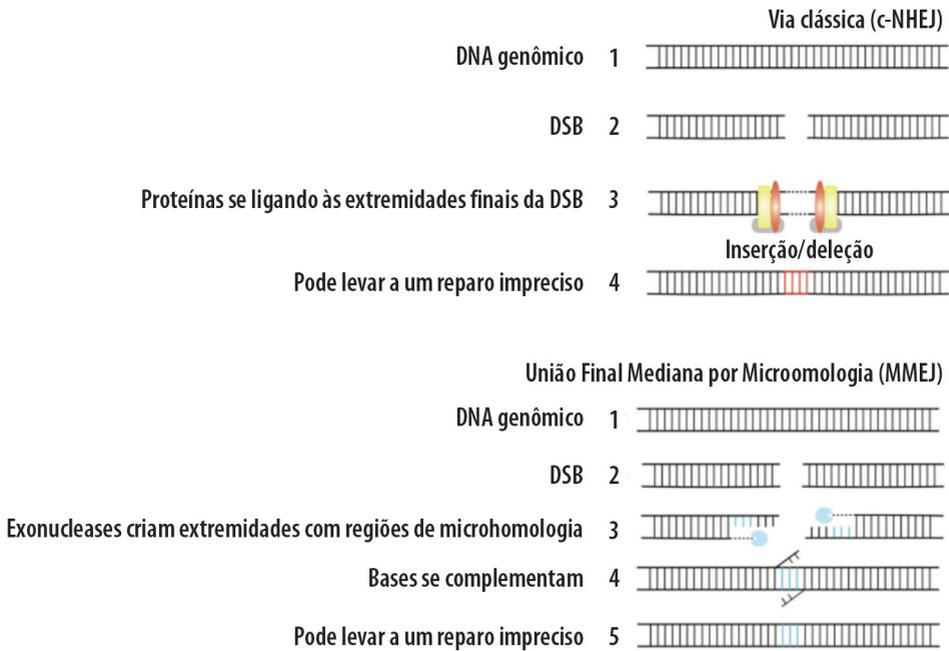
Na presença da DSB, o mecanismo de resposta aos danos DDR é acionado. Desse modo, uma cascata de fosforilação é ativada, gerando modificações na cromatina, que deixam a extremidade danificada acessível às proteínas de reparo do DNA (Riches et al., 2008). Em plantas (Steinert et al., 2016) e mamíferos (Hartlerode; Scully, 2009), tanto HR quanto NHEJ são acionadas.

NHEJ, por sua vez, pode ser subdividida em duas vias: clássica (c-NHEJ), que é a principal via de reparo e de rearranjo cromossômico (Lieber, 2010), e a *backup* (b-NHEJ), também chamada de via alternativa (a-NHEJ) ou *microhomology-mediated end joining* (MMEJ) (Deriano; Roth, 2013). Essa segunda via é ativada caso ocorram problemas funcionais com a c-NHEJ, porém não apresenta um mecanismo de reparo tão preciso, o que geralmente leva a translocações cromossômicas e deleções excessivas (Deriano; Roth, 2013) (Figura 1).

A via c-NHEJ pode ser dividida em três principais etapas: o reconhecimento da DSB, o processamento do DNA e a ligação das fitas (Yang et al., 2016). O reconhecimento da DSB depende das proteínas Ku70-Ku80 (Ku), um heterodímero com duas subunidades de 70 kDa e 80 kDa, que se entrelaçam em um anel que envolve a extremidade final da DSB, formando o complexo Ku:DNA (Figura 2). Este complexo mantém as extremidades finais da DSB relativamente próximas, para que não haja translocações adicionais ou fusões (Downs; Jackson, 2004).

Assim que o complexo Ku:DNA é formado em cada extremidade da DSB, são recrutados fatores proteicos, como a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs), proteína de reparo de raios-X transversal complementar 4 (XRCC4), fator tipo XLF, PAXX (parálogo de XRCC4 e XLF) e DNA-Ligase IV (Lig4), que mantêm próximas as extremidades do DNA, formando uma ponte entre elas para que ocorra o processamento e a ligação (Davis et al., 2014).

Se a DSB gera extremidades simples, estas podem ser diretamente ligadas após o reconhecimento da DSB. Entretanto, na maioria das DSBs existem extremidades incompatíveis por modificações químicas ou incompatibilidade dos terminos das fitas de DNA, que acabam impedindo que as fitas sejam ligadas diretamente. Desse modo, o DNA deve ser processado e, para isso, exonucleases degradam as extre-



**Figura 1.** Vias de reparo por *non-homologous end joining* (NHEJ). (A) Via clássica *non-homologous end joining* (c-NHEJ), que pode levar a inserções ou deleções (*indels*). (B) União final mediada por micro-homologia (MMEJ), a qual sempre resulta em deleções.

Fonte: adaptado de Deriano e Roth (2013).



**Figura 2.** Complexo Ku:DNA. A proteína Ku70 é destacada em vermelho, e a Ku80 em laranja. Os pares de bases terminais do duplex central são numerados +8 (extremidade do DNA quebrada) e -6.

Fonte: adaptado de Walker et al. (2001).

midades 5' ou 3', gerando regiões de micro-homologia. Esse processo, conhecido como recessão, permite que as duas extremidades se tornem compatíveis.

Durante a recessão das extremidades finais da DSB, as DNA-PKcs agem em complexo com a endonuclease Artemis que, após ser fosforilada pela DNA-PKcs, cliva ligações da fita simples e entre a fita dupla. Outros fatores envolvidos nesse processo são a polinucleotídeo quinase fosfatase (PNKP), aprataxina (APTX), APTX-polinucleotídeo quinase-fosfatase-like fator 1 (APLF ou PALF), werner (WRN), DNA polimerases e desoxinucleotidil terminal transferase (TdT) (Lieber, 2010).

Após o processamento da DSB, as extremidades estão prontas para serem ligadas. Todo processamento e ligação do DNA é coordenado pelas DNA-PKcs, que fosforilam diversas proteínas (Jiang et al., 2015). Essas proteínas também podem ser autofosforiladas ou transfosforiladas por outros fatores, como ATM e ataxia relacionadas à telangiectasia (ATR) (Davis et al., 2014). Para que ocorra a ligação da dupla fita, são recrutadas ligases específicas e o complexo XRCC4-XLF-Lig4, que é o principal fator envolvido. Para a formação desse complexo, XRCC4 é ancorado ao complexo Ku:DNA-PKcs e, junto ao fator XLF, forma uma ponte com Lig4, promovendo a ligação da DSB (Andres et al., 2012).

## Edição de Genomas via NHEJ – aplicações práticas

A aplicação do sistema CRISPR/Cas para edição de genomas em plantas tem sido usada com sucesso para a obtenção de cultivares melhoradas geneticamente. As características manipuladas com essa ferramenta abrangem desde o melhoramento nutricional, uso eficiente de nutrientes (Liang et al., 2014), resistência a doenças (Wang et al., 2014, Peng et al., 2017) e tolerância a estresses abióticos (Mushtaq et al., 2018) até o aumento da produtividade (Ma et al., 2016). Com isso, uma das frentes do melhoramento com CRISPR é o *knockout*, que elimina a função gênica por meio de *indels* derivados do reparo por NHEJ.

Visando à resistência de plantas de trigo (*Triticum aestivum*) ao fungo oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*), foi realizada a edição gênica via TALEN para introduzir mutações direcionadas em três genes homólogos que codificam as proteínas Mlo-Resistance Locus (MLO) (*TaMLO-A1*, *TaMLO-B1* e *TaMLO-D1*) e, também, a edição via CRISPR para *knockout* do gene *TaMLO-A1*. As proteínas MLO agem como reguladores negativos, reprimindo as vias de defesa da planta contra o oídio em tecidos não infectados (Piffanelli et al., 2002). Desse modo, quando os genes homólogos *MLO* foram editados via TALEN e CRISPR, observou-se o aumento da resistência das plantas de trigo ao fungo oídio em relação às plantas não editadas. Para a construção CRISPR, foi usado um vetor de expressão contendo a CDS da Cas9,

o promotor Ubiquitina 1 de milho e o sgRNA. O vetor foi introduzido no genoma de trigo via biobalística, obtendo-se eficiência de mutação nas plantas regeneradas igual a 5,6% (Wang et al., 2014).

Em outro trabalho, pesquisadores trabalharam com milho (*Zea mays*), o qual possui uma alta concentração de ácido fítico, um antinutriente que não é digerido por animais monogástricos e prejudica a absorção de nutrientes. Com o uso de CRISPR, foi realizado um *knockout* no gene *Zea mays Inositol Fosfato Cinase* (*ZmIPK*), o que gerou plantas editadas com baixa concentração de ácido fítico. Nesse estudo, a transformação genética via transfecção de protoplastos utilizando duas guias construídas para o direcionamento da Cas9 ao gene *ZmIPK* resultou em uma eficiência de mutação da ordem de 16,4% e 19,1% para cada guia utilizada (Liang et al., 2014).

Para soja (*Glycine max* (L.) Merrill), o primeiro trabalho de sucesso conduzido como prova de conceito com utilização do sistema CRISPR para realizar a mutagênese direcionada em raízes (*hairy roots*) demonstrou a eficácia da técnica por meio do desligamento de genes endógenos e do gene *bar* (Cai et al., 2015). Nesse estudo foram construídos sete vetores, um com a gRNAs para o transgene *bar* e outros seis com gRNAs direcionadas a dois genes endógenos de soja (*GmFEI2* e *GmSHR*), sendo três guias para cada gene (*GmFEI2-SP1*, *GmFEI2-SP2* e *GmFEI2-SP3* para o gene *GmFEI2* e *GmSHR-SP1*, *GmSHR-SP2* e *GmSHRSP3* para *GmSHR*). A expressão da Cas9 foi dirigida pelo promotor Ubiquitina de milho, as gRNAs foram dirigidas pelo promotor U6 de *Arabidopsis*, e a expressão do gene *GFP*, para a rápida visualização das *hairy roots* transgênicas, foi dirigida pelo promotor CAMV 35S. O método de transformação genética usado foi baseado em *Agrobacterium rhizogenes* e, como material vegetal, foram utilizadas plantas transgênicas homozigotas para o gene *bar* (para a edição do gene *bar*) e plantas selvagens, não transformadas geneticamente, para a edição dos genes *GmFEI2* e *GmSHR*. Para o transgene *bar*, foram identificadas 11 mutações nas 30 *hairy roots* transgênicas independentes analisadas, com frequência de 1,3% a 21,0%. Já para os genes endógenos, na guia *GmFEI2-SP1* foram identificadas mutações em 18 das 30 *hairy roots* transgênicas independentes, com frequência de *indels* entre 0,6% e 18,8%. Mutações no local da guia *GmFEI2-SP2* foram identificadas em 28 das 30 *hairy roots*, com frequência de *indels* variando de 1,0% a 95,0%. Para a guia *GmFEI2-SP3*, foram identificadas 3 mutações nas 30 *hairy roots* transgênicas independentes analisadas, com frequência de *indels* entre 5,4% a 27,0%. Já para o gene *GmSHR-SP2*, foram identificadas em 10 das 22 *hairy roots*, com frequência de *indels* de 8,7% a 30,0%. Para *GmSHR-SP1*, as mutações foram encontradas em 15 das 30 raízes analisadas, com frequência de *indels* variando entre 2,3% a 21,3%. Já no local *GmSHR-SP2* foram encontradas mutações em 10 das 22 raízes analisadas, com frequência de *indels* variando de 8,7% a 30,0% (Cai et al., 2015). Em *GmSHR-SP3* foram identificadas mutações em 10 das 28, com frequência variando de 2,8% a 28,7%.

## Modulação e otimização de promotores

O uso de NHEJ com o objetivo de modular a expressão de genes também pode ser aplicado a elementos regulatórios, a exemplo das regiões promotoras. Essa estratégia faz com que a atividade transcricional, com base na modulação do acesso dos fatores de transcrição ao promotor, seja alterada e, como consequência, tem-se a mudança na expressão de genes (Cong et al., 2013). Quando sequências promotoras são modificadas por meio das técnicas de edição de genoma, dá-se o nome de engenharia promotora *in vivo* (IPE, do inglês *in vivo promoter engineering*) (Pandiarajan; Grover, 2018). Alguns trabalhos conduziram essa abordagem visando à geração de variantes de promotores com atividade transcricional alterada (Li et al., 2020).

Com o objetivo de obter plantas de arroz mais adaptadas a solos com alto teor de salinidade, a tecnologia CRISPR foi utilizada para gerar *indels* em regiões de unidades promotoras funcionais, os elementos *cis* regulatórios (CREs, do inglês *Cis Regulatory Elements*) do gene *OsRAV2*. Esse sistema foi estabelecido para confirmar que deleções nos CREs da sequência promotora do gene *OsRAV2* (nos elementos GT-1) estariam relacionadas à resistência ao estresse salino. Os genes *RAV* (*Related to ABI3/VP1*) codificam proteínas envolvidas na resposta ao estresse abiótico, sendo *OsRAV2* específico na resposta a ambientes com excesso de salinidade em arroz. Desse modo, foi construído um vetor contendo a Cas9 e um gRNA direcionado aos elementos GT-1 da região promotora do gene *OsRAV2*, e a transformação genética foi conduzida via *Agrobacterium tumefaciens*. Nesse estudo, 12 plantas foram editadas e todas apresentaram as mutações direcionadas desejadas, que promoveram a resistência das plantas a solos com alta concentração salina (Duan et al., 2016).

Em um trabalho que envolveu o cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri*, um patógeno responsável por perdas significativas no cultivo de *Citrus* spp., foi utilizado CRISPR em *Citrus sinensis* Osbeck, almejando a modulação do promotor do gene *Lateral Organ Boundaries 1* (*CsLOB1*), associado à suscetibilidade ao patógeno. O gene teve sua indução em resposta à infecção interrompida, e essa abordagem gerou plantas com maior resistência ao cancro cítrico em comparação com o tipo selvagem. Para a obtenção das plantas, foi realizada a construção de um vetor codificando a Cas9, além do promotor AtU6-1 dirigindo a expressão do gRNA direcionado à região promotora do gene *CsLOB1*. A transformação genética foi realizada por *A. tumefaciens*, e a eficiência de mutação foi entre 32.5% e 90.7% (Peng et al., 2017).

## Ribonucleoproteínas (RNPs) nuclease-sgRNA

### RNPs: sistemas DNA-free

A edição ou engenharia de genoma é, na maioria dos casos, conduzida utilizando sistemas de vetores plasmidiais carreando genes que, ao se integrarem no genoma do hospedeiro, codificam a expressão dos produtos necessários para o mecanismo de edição, sendo basicamente uma nuclease e o RNA-guia (gRNA), além de um gene marcador de seleção de transformantes, que confere resistência a um antibiótico ou um herbicida, quando o organismo-alvo é uma planta, e, eventualmente, genes-repórter (Xie; Yang, 2013).

Com isso, novas características são incorporadas ao hospedeiro tanto devido à mutagênese desencadeada no hospedeiro por meio da edição quanto devido aos genes exógenos que são introduzidos, o que configura o evento obtido como um OGM transgênico. Nesse caso, preocupações e problemas relacionados à regulamentação em biossegurança e à bioética podem se tornar obstáculos para que o produto biotecnológico desenvolvido se torne uma realidade mercadológica. Para contornar e/ou evitar barreiras que atrasam a chegada do organismo editado ao mercado, os pesquisadores normalmente recorrem a métodos que empregam a eliminação das sequências inseridas por meio de técnicas de hibridização e segregação mendeliana, de modo que o organismo editado passe a ser caracterizado apenas como GM, porém não como transgênico, uma vez que o material genético exógeno é perdido (Cyranoski, 2015).

Entretanto, essas técnicas podem se tornar inviáveis para a obtenção de plantas editadas não transgênicas que possuam processo de reprodução assexuada, a exemplo de uva (*Vitis* spp.), banana (*Musa* spp.) e batata (*Solanum tuberosum*), devido à ausência de recombinação que promoveria a eliminação dos transgenes na prole. Também podem ser pouco viáveis ou pouco vantajosas no caso de plantas perenes, como maracujá (*Passiflora* spp.), eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e cereja (*Prunus* spp.), devido à própria falta de praticidade do processo de eliminação de transgenes, que se torna demasiadamente longo. Desse modo, plantas com ciclo de vida curto são mais passíveis de obtenção por meio desse método devido à maior praticidade (Woo et al., 2015).

Diante desse cenário, o rol de plantas-alvo se torna estreito, havendo a necessidade de desenvolver ou encontrar alternativas que contornem essa limitação. Sendo assim, uma das estratégias é o uso de sistemas DNA-free de edição gênica, dos quais

as ribonucleoproteínas (RNPs) são as mais conhecidas e cujo uso nos últimos anos segue expandindo para várias espécies (Kanchiswamy, 2016).

Em edição de genoma, as RNPs são complexos ribonucleoproteicos compostos por uma nuclease e um ou mais gRNAs. O gRNA é obtido por síntese *in vitro* ou síntese química, também podendo eventualmente ser otimizado para que sua inespecificidade seja reduzida, como por meio da truncagem para 17 resíduos de nucleotídeos, diferentemente dos 20 resíduos normalmente utilizados para Cas9, por exemplo. O gRNA também é estabilizado ao ser protegido contra a degradação por RNases devido à complexação com a nuclease (Kanchiswamy, 2016). A nuclease, por sua vez, pode ser obtida comercialmente a partir de fornecedores de empresas de biotecnologia ou expressa na forma recombinante em sistema heterólogo, comumente sistemas bacterianos baseados em *Escherichia coli*. Após a expressão, a proteína recombinante é purificada, preferencialmente por bioafinidade em coluna cromatográfica de níquel, com base em uma 6-His-tag fusionada a uma das extremidades da nuclease.

Conforme relatos da literatura científica, as RNPs são geralmente utilizadas para edição de genoma de células animais e, em comparação aos vetores plasmidiais, elas apresentam muito baixa citotoxicidade ao hospedeiro. Isso porque a citotoxicidade muitas vezes está associada ao próprio processo de transfecção plasmidial e a alguns reagentes utilizados para conduzir a transfecção.

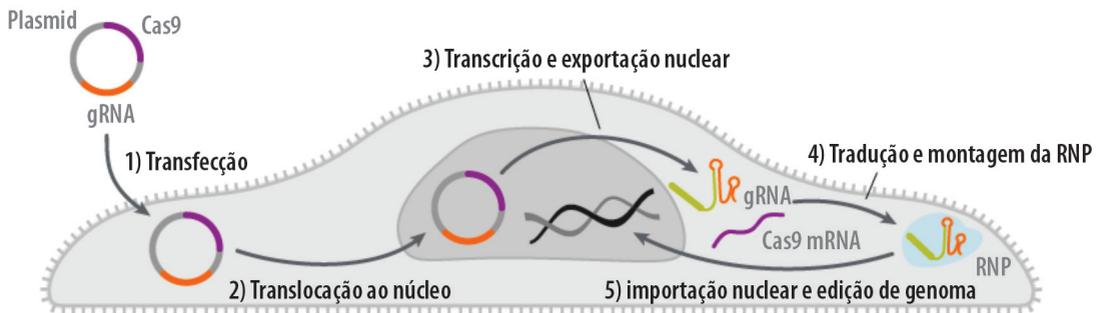
Algumas vantagens das RNPs em comparação com os plasmídeos são destacadas abaixo:

- a) O mecanismo plasmidial é mais complexo, uma vez que depende da maquinaria molecular de transcrição (para a nuclease e para o gRNA) e de tradução (para a nuclease), já que há a necessidade de integração dos genes de interesse no genoma-alvo, no núcleo, para que os transcritos sejam produzidos e, no caso da informação genética para a nuclease, exportado ao citoplasma para tradução gênica, com a nuclease retornando ao núcleo para realizar a edição. Observa-se, com isso, um trânsito contínuo e complexo entre diferentes compartimentos subcelulares, enquanto no uso de RNPs o mecanismo ocorre de forma direta, já que o complexo pré-formado se direciona imediatamente ao núcleo e executa sua função (Figura 3) (Amirkhanov; Stepanov, 2019; Wilbie et al., 2019).
- b) O uso de plasmídeos leva à integração gênica, a qual culmina na persistência da expressão dos agentes da edição, que permanecem funcionalmente ativos de forma prolongada, mantendo a atividade de edição, o que aumenta a probabilidade de ocorrerem efeitos *off-target*. Por outro lado, RNPs não

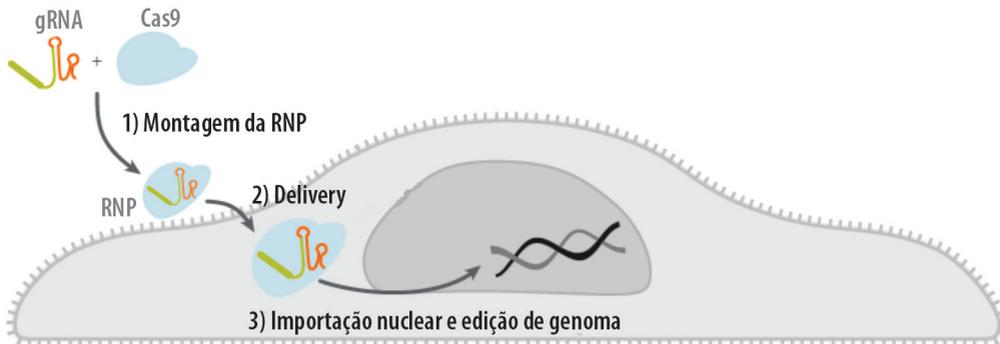
dependem de integração gênica para realizarem a edição, a qual ocorre imediatamente após o *delivery* do complexo no núcleo, com pico de mutagênese após cerca de 24 horas, sendo rapidamente degradadas e reduzindo, portanto, a ocorrência de efeitos *off-target* (Amirkhanov; Stepanov, 2019).

- c) Além da integração dos genes de interesse, o *backbone* dos plasmídeos também pode ser integrado no genoma do hospedeiro e persistir, mesmo após o uso de técnicas de hibridização, deixando “pegadas” (*footprints*) moleculares (Mao et al., 2018), o que pode se tornar outro problema na regulamentação da planta editada, por caracterizar um organismo transgênico.

**Edição de genoma baseada e plasmídeo**



**Edição de genoma baseada e RNP**



**Figura 3.** Plasmídeos versus RNPs na edição de genoma. (A) Vetor plasmidial carreando genes para codificação de uma proteína Cas9 e um gRNA, evidenciando etapas de um trânsito mais complexo entre diferentes compartimentos celulares até a edição do genoma. (B) RNP composta de uma Cas9 complexada a um gRNA, evidenciando uma etapa simples de trânsito direto ao núcleo para realizar a edição do genoma.

Fonte: adaptado de Spencer (2020).

RNPs não constituem a única estratégia DNA-free para edição de genoma. Outros sistemas também foram desenvolvidos e suas aplicações foram demonstradas não apenas para células animais, mas também para plantas de interesse econômico. Entre eles, os IVTs (*in vitro transcripts*, ou transcritos *in vitro*) e os vetores baseados em replicons virais são alternativas que também dispensam a integração genômica, sendo que cada um apresenta vantagens e desvantagens (Gil-Humanes et al., 2017; Liang et al., 2018). Em relação às várias vantagens oferecidas pelos vetores baseados em replicons virais, conferir o Capítulo 3.

Por meio do sistema de IVTs, são entregues moléculas de RNAm codificantes da nuclease e, embora os RNAm derivados de IVT apresentem a vantagem de não se integrarem ao genoma, as moléculas de RNAm estão mais sujeitas à degradação por RNases no meio intracelular do hospedeiro, resultando em menor estabilidade do sistema. Além disso, moléculas longas de RNA, como as codificantes da nuclease, são facilmente degradadas ao longo dos processos de manipulação em laboratório, dificultando o preparo. Já os vetores virais, frequentemente utilizados em sistemas baseados em replicon, exigem passos adicionais de clonagem e engenharia genética que são desnecessários no sistema RNPs (Gil-Humanes et al., 2017; Liang et al., 2018). Enquanto alguns vetores virais para células animais levam à integração do genoma viral no DNA do hospedeiro, em plantas isso não ocorre, e o replicon permanece ativo de forma episomal no citoplasma, dispensando as etapas de eliminação dos transgenes da planta editada.

Como exemplo de relatos da aplicação de RNPs em plantas, Woo et al. (2015) estabeleceram pela primeira vez a edição de genoma em sistemas vegetais via RNP, tendo como organismos hospedeiros: *Arabidopsis thaliana*, arroz (*Oryza sativa*), alface (*Lactuca sativa*) e tabaco-coiote (*Nicotiana attenuata*). Os autores realizaram a transfecção de protoplastos via PEG com RNPs pré-montados, obtendo eficiência de edição de até 46% (8,4% a 44% para *A. thaliana*, arroz e tabaco, e 46% para alface). Não foram detectados quaisquer efeitos *off-target*, e as edições se mantiveram estáveis na geração seguinte. As mutações geradas se demonstraram indistinguíveis das variações genéticas ocorridas de forma natural.

Svitashev et al. (2016) e Young et al. (2019), por sua vez, demonstraram a aplicabilidade das RNPs em milho (*Zea mays*), utilizando o bombardeamento de partículas para a transfecção do complexo em embriões imaturos, visando ao *knockout* dos genes *LIG1*, *Ms26* e *Ms45*, localizados em diferentes cromossomos. Mais especificamente, Young et al. (2019) estudaram os efeitos *off-target* dessa estratégia comparativamente ao uso de plasmídeos, demonstrando a ausência desses efeitos no genoma de milho. Liang et al. (2017) compararam RNPs com vetores plasmidiais em trigo (*Triticum aestivum*), verificando similaridade de atividade *on-target*, mas

efeito *off-target* cinco vezes menor quando foram utilizadas RNPs, corroborando o que foi mencionado sobre a correlação entre a atividade de edição prolongada na célula e o aumento dos casos de *off-target*. Por fim, Liang et al. (2018) compararam RNPs com IVTs para *T. aestivum*, demonstrando que ambos foram equivalentes em termos de eficácia, ao mesmo tempo eliminando a integração genômica e dando origem a plantas editadas DNA-free (não transgênicas). Outras espécies vegetais também foram transfectadas com RNPs, como, por exemplo: uva (*Vitis vinifera*) e maçã (*Malus domestica*) (Malnoy et al., 2016), petúnia (*Petunia x hybrida*) (Subburaj et al., 2016) e batata (*S. tuberosum*) (Andersson et al., 2018).

Nesse caso, os autores desses trabalhos utilizaram protoplastos como explantes para transfecção. Desses, apenas Andersson et al. (2018) regeneraram tecidos a partir dos protoplastos transfectados, obtendo brotações derivadas de calos induzidos. Para esse trabalho, a análise da eficiência de edição foi conduzida utilizando-se o próprio tecido foliar como fonte de amostra de DNA genômico, na qual concluíram que 9% dos eventos obtidos continham a mutação esperada em pelo menos um dos alelos do gene-alvo. Por outro lado, tanto Malnoy et al. (2016) quanto Subburaj et al. (2016) analisaram amostras de DNA genômico obtidas diretamente a partir dos protoplastos, sem passar por regeneração de plântulas. Com isso, Malnoy et al. (2016) verificaram eficiência de edição de 0,1% para uva e de 0,5% a 6,9% para maçã, enquanto Subburaj et al. (2016) obtiveram eficiência de 2,4% a 21% em petúnia.

Como é possível observar, as RNPs possuem aplicabilidade de grande alcance, com potencial para abranger outras abordagens úteis para o desenvolvimento de plantas editadas e economicamente importantes que sejam DNA-free. Desse modo, assim como plasmídeos, IVTs e vetores baseados em replicons virais, as RNPs são adequadas para gerar *knockout* via *indels* a partir do mecanismo de NHEJ, bem como podem ser adaptadas ao *knock-in* a partir do mecanismo de HDR, o qual será detalhado no próximo capítulo. Além disso, a regulação transcricional para edição e modulação de promotores via *indels*, visando à superexpressão ou ao *knock-down* de genes, bem como para a edição de base (*base editing*) e para a mais recente tecnologia de edição precisa de genoma, *prime editing*, é possível de ser executada em plantas utilizando RNPs, o que abre oportunidades para pesquisas que demonstrem pela primeira vez essa viabilidade e seu sucesso.

Entretanto, a limitação do uso de RNPs surge com abordagens que exigem a persistência do complexo nuclease-sgRNA atuando no núcleo. Isso porque as nucleases das RNPs são degradadas por proteinases intracelulares, perdendo sua atividade biológica tão logo sua tarefa de edição genômica seja cumprida. Portanto, estudos envolvendo a modulação e engenharia epigenética, que utilizam ativadores e inibidores via dCas9 em sistema CRISPRa/CRISPRi ou estudos voltados

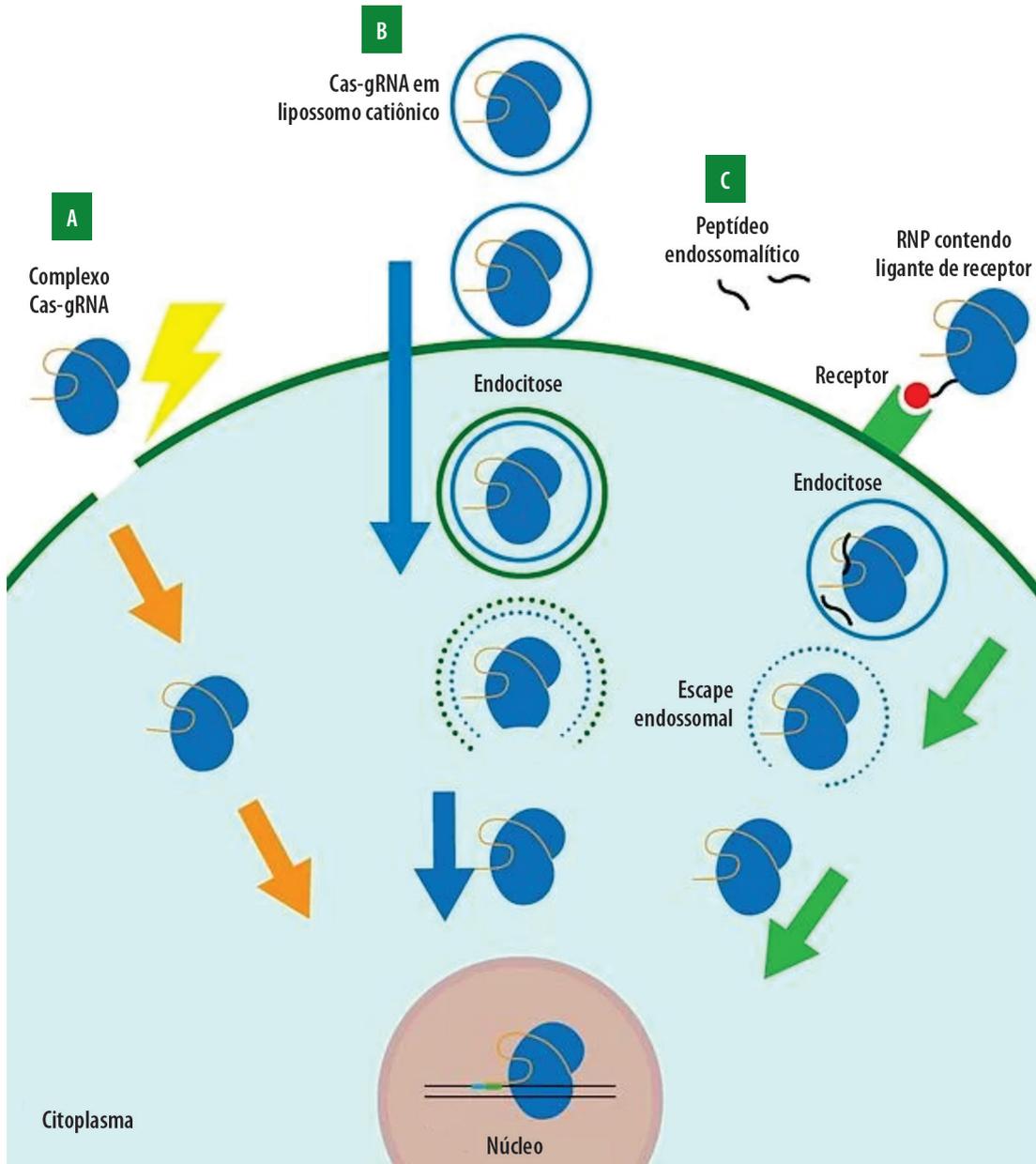
ao imageamento com base na marcação genômica com sondas fluorescentes, por exemplo, se tornam inviáveis por meio das RNPs. Adicionalmente, a obtenção de RNPs exige a produção *in vitro* de transcritos de sgRNA, os quais, uma vez produzidos, possuem baixa durabilidade devido à sua alta sensibilidade (Liang et al., 2018). Além disso, pelo próprio fator mencionado a respeito da degradação, há uma janela curta disponível às RNPs para que a edição seja executada, o que costuma acarretar baixa eficiência de mutagênese por esse mecanismo. Por fim, ao se trabalhar com RNPs, não se faz uso de genes marcadores de seleção que auxiliariam na discriminação de explantes transformados, o que faz com que as RNPs sejam uma técnica mais trabalhosa, por demandar uma etapa adicional de caracterização molecular a fim de identificar as plantas editadas (Kanchiswamy, 2016).

Em suma, aprofundar e estender o uso das RNPs em espécies já testadas e em outras ainda não avaliadas, respectivamente, é de grande importância, dentro dos limites técnicos da abordagem, podendo impactar significativamente a agricultura mundial e, por consequência, a qualidade de vida humana.

## Estratégias de *delivery* e internalização das RNPs

O *delivery* dos agentes moleculares da edição genômica é um passo fundamental para a obtenção de plantas editadas, e os parâmetros a ele associados estão diretamente ligados ao sucesso e à praticidade no desenvolvimento desses eventos. Com base nisso, uma ampla variedade de métodos de *delivery* para RNPs já é utilizada ou pode ser complementada com estratégias ainda não estabelecidas para plantas, embora já sejam amplamente aplicadas a células animais (Figura 4). Esses métodos podem ser classificados em:

- 1) **Transfecção simples:** abrange técnicas de introdução direta de RNPs – embora também seja utilizada para sistemas plasmidiais e outros mecanismos – na célula hospedeira por métodos físicos ou químicos, sem mediação de reagentes ou sistemas complexos e sofisticados para facilitar a transfecção. Exemplos:
  - a) Eletroporação: em se tratando de plantas, consiste na aplicação de pulsos de corrente elétrica em protoplastos, de modo a promover a abertura rápida de poros na membrana plasmática, permitindo a introdução das RNPs na célula.
  - b) PEG: o polietilenoglicol é um polímero mediador da internalização das RNPs, sendo frequentemente utilizado para transfecção de protoplastos como explantes.



**Figura 4.** Métodos de *delivery* e internalização de RNPs. (A) Transfecção simples, exemplificada pela eletroporação. (B) Sistemas nanoestruturados, exemplificados pelo encapsulamento da RNP em lipossomas catiônicos. (C) Mecanismo ligante-receptor, exemplificado pela RNP fusionada a um ligante peptídico e endossomalítico. Todos os métodos culminam na edição do genoma nuclear, tendo ou não como passo intermediário a endocitose.

Fonte: adaptado de Hampstead (2020).

c) Bombardeamento de partículas (biobalística): método majoritariamente utilizado para plantas, consistindo na aceleração de micropartículas compostas, geralmente, de ouro ou tungstênio, a velocidades acima de 1.500 km/h, por meio do equipamento *gene gun*. Nesse procedimento, o complexo RNP é preparado e precipitado sobre as micropartículas, seguindo protocolos já bem-estabelecidos. Trata-se de uma técnica classicamente utilizada na transformação genética de plantas. Mais informações sobre a técnica podem ser verificadas no Capítulo 5 do livro *Manual de transformação genética de plantas* (Vianna et al., 2015).

2) **Sistemas nanoestruturados:** abrangem polímeros ou outras substâncias, produzidos na forma de partículas em escala nanométrica, que agem como nanocarreadores de RNPs (Zuris et al., 2015). Li et al. (2015) revisaram potenciais vetores não virais na forma de sistemas nanoestruturados ou nanomateriais para o *delivery* de CRISPR/Cas, os quais podem perfeitamente ser utilizados em um futuro próximo para edição em plantas via RNPs, como:

a) Lipossomos catiônicos: bicamadas lipídicas esféricas com cargas positivas, habilitando a ligação a nucleases negativamente carregadas, que, por sua vez, estão complexadas ao sgRNA. Podem ser compostos por DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamoniopropano), DOTMA (cloreto de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio), DOSPA (trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propilamina) e DMRIE (brometo de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxietilamônio).

b) Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS): nanopartículas constituídas de lipídios com alto ponto de fusão, especialmente ácidos graxos (ex.: ácido esteárico e ácido palmítico), com um *core* sólido e cobertas por moléculas de surfactantes.

c) Nanopartículas poliméricas: polímeros em forma de partículas nanométricas, podendo ser compostos por PEI (polietilenimina), PLL (poli-L-lisina) e PDMAEMA (poli[2-(dimetilamino)etilmetacrilato]), por exemplo.

d) Nanopartículas de quitosana: nanopartículas compostas por um polissacarídeo derivado da desacetilação da quitina e com propriedades catiônicas.

e) Dendrímeros: polímeros altamente carregados positivamente, funcionando como “esponjas de prótons”, com alta afinidade para moléculas negativamente carregadas. A poliamidoamina (PAMAM) é um dos principais exemplos.

f) Nanopartículas de sílica (Torney et al., 2007).

- g) Nanopartículas magnéticas (Zhao et al., 2017).
- h) Nanotubos de carbono (Demirer et al., 2019).

Embora o uso de RNPs para edição de genoma em plantas seja de ocorrência esporádica, seus relatos na literatura majoritariamente envolvem a utilização de transfecção simples. Apenas recentemente, Liu et al. (2020) conduziram a transfecção de protoplastos de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow-2) com base em sistemas nanoestruturados para lipofecção, utilizando dois reagentes lipídicos (Lipofectamina 3000 e RNAiMAX) para a montagem de lipossomas catiônicos, obtendo eficiência de *delivery* de 66% e 48% para esses reagentes, respectivamente. Para a Lipofectamina 3000, a eficiência de edição foi de 6%. Embora a lipofecção seja bem-estabelecida para edição de genoma em células animais, apenas nesse estudo foi estabelecida uma transição de nanomateriais para CRISPR/Cas aos sistemas vegetais.

- 3) **Mecanismo ligante-receptor:** abrangem a lógica de que a nuclease responsável pelo processo de edição pode ser fusionada a ligantes peptídicos ou proteicos de receptores celulares específicos (Rouet et al., 2018). Embora haja relatos do uso dessa abordagem para edição em células animais, sua aplicabilidade para CRISPR em plantas ainda não foi demonstrada, e tampouco os autores na literatura científica apresentam perspectivas nesse sentido.

Excluindo o bombardeamento de partículas, para todos os métodos e técnicas utilizados para *delivery*, é importante frisar a necessidade de se estabelecerem protocolos que facilitem o uso desses sistemas, principalmente para regeneração *in vitro* de plantas a partir de protoplastos, uma vez que são os explantes mais utilizados para conduzir esses procedimentos. Entretanto, sabendo que algumas espécies são recalcitrantes à regeneração a partir de protoplastos, o desenvolvimento de tais protocolos seria inviável, devendo-se optar por outras estratégias baseadas em tipos alternativos de explantes. De qualquer forma, para aquelas espécies para as quais esse procedimento é possível, surge esse benefício ao se trabalhar com RNPs.

## Procedimento prático

### Parte 1: *in silico*

O primeiro passo para realizar a edição genômica via CRISPR/Cas é escolher alvos genômicos da espécie desejada a ser editada. Essa escolha servirá de base

para identificar em seguida, dentro dos respectivos genes, sítios com sequências complementares ao gRNA utilizado para guiar a nuclease, desde que atendam aos requisitos da respectiva sequência PAM exigida pela enzima para a clivagem. Além disso, torna-se essencial realizar a predição de potenciais sítios *off-target*, de modo a sugerir gRNAs candidatos mais seguros quanto à especificidade genômica. Por fim, escolher particularmente uma estratégia adequada de *delivery*, a depender do tipo de explante necessário para a transfecção, bem como um vetor de expressão adequado com configuração apropriada de seus elementos genéticos, são a etapa final e fundamental – embora variem conforme os objetivos e a espécie de cada estudo – de um conjunto de procedimentos que deve ser conduzida de forma complementar à análise *in silico*, conforme será detalhado a seguir.

### Identificação e seleção de alvos genômicos

Visando ao *knockout* em sequências codantes (CDS) ou à regulação transcricional de promotores (gerando variantes de promotores), ambos via NHEJ, é necessário que o gene-alvo esteja caracterizado quanto às sequências nucleotídicas que o compõem, incluindo seus elementos regulatórios. Nesse caso, é possível obter as sequências nucleotídicas no banco de dados anotados do National Center for Biotechnology Information (NCBI)<sup>1</sup>, utilizando termos que identificam a espécie e/ou a sequência, bem como números de acesso, quando possível. Outra possibilidade é obter a sequência completa do gene a partir de sequências menores (*query*), por meio de similaridade com sequências depositadas (*subject*) no banco de dados. Para isso, essa informação pode ser obtida com utilização das diferentes modalidades do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)<sup>2</sup> para diferentes tipos de sequência.

Entretanto, o recurso BLAST pode ser acessado indiretamente e de forma personalizada para muitas das principais espécies vegetais de importância econômica, como, por exemplo, no banco de dados Phytozome v12.1<sup>3</sup> (Figura 5).

Com a identificação da sequência-alvo (Figura 6), a composição nucleotídica pode ser detalhada na aba “Sequence”. A subseção “Transcript Sequence” dispõe os componentes do transcrito maduro diferenciados por cores entre 5'-UTR, CDS e 3'-UTR, o que pode ser útil para o delineamento de gRNAs para ambas as abordagens (CDS e elementos regulatórios). Da mesma forma que no NCBI, a sequência pode ser obtida no formato FASTA e armazenada para análise de gRNAs.

<sup>1</sup> Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>

<sup>2</sup> Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<sup>3</sup> Disponível em: <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>

Figura 5. Phytozome v12.1. Mecanismo de busca por seqüências ao longo do genoma de diferentes espécies vegetais possíveis. Uma barra de busca para a inserção da seqüência nucleotídica da espécie selecionada, à direita, é mostrada, possibilitando a busca mediada por BLAST, a partir da função “GO”.

Figura 6. Busca por seqüências de transcrito maduro no Phytozome v12.1. Etapa de diferenciação dos elementos genéticos que compõem a seqüência nucleotídica do gene após a transcrição, a qual servirá como modelo para similaridade na análise de gRNAs candidatos. Em verde, a seqüência relativa à região 5'-UTR (útil para a seleção de gRNAs visando à modulação transcricional de promotores). Em azul, as seqüências relativas dos éxons vizinhos (úteis para a seleção de gRNAs visando ao *knockout* do gene), separados por tons claros e escuros.

Paralelamente, é recomendado que, no caso de CDS como alvo, a sequência da cadeia polipeptídica também seja acessada e armazenada em qualquer ferramenta de edição de texto, para outro tipo de análise, como será mostrado a seguir. Nesse caso, no Phytozome é possível acessar a respectiva sequência na subseção “Peptide Sequence”, dentro da mesma aba “Sequence”, enquanto no NCBI as respectivas sequências são mostradas na página da tabela de características de cada acesso, na seção “CDS”.

## Desenho de gRNA

Possuindo o sítio-alvo delimitado *in silico* e contendo seus elementos genéticos, deve-se, dependendo da estratégia, desenhar um ou mais gRNAs complementares a um elemento regulatório ou à CDS, levando em conta a sequência-alvo em nível genômico. Com o objetivo de promover o *knockout* de um gene, deve-se eliminar a funcionalidade do produto da expressão por meio da truncagem da cadeia polipeptídica codificada. Portanto, deve-se partir de duas premissas fundamentais:

- a) O *knockout* deve ocorrer com base na mutagênese em regiões mais distais a 5'; isto é: quanto mais *upstream* da CDS ocorrer a clivagem, menor a probabilidade de que os domínios proteicos nativos e funcionais permaneçam sendo expressos com base na sequência remanescente *in frame*.
- b) O pareamento do gRNA com o genoma deve ocorrer em regiões restritas a éxons específicos e únicos, isto é: é crucial que a sequência PAM e o sítio de clivagem estejam localizados no mesmo éxon. Portanto, localizar essas sequências em íntrons ou em junções éxon-íntron pode tornar a sequência candidata irrelevante para uma edição genômica eficaz e com resultados concretos.

Considerando esses fatores para iniciar a segunda etapa, uma ferramenta bastante prática, intuitiva e ampla para a busca e predição de gRNAs candidatos é a CRISPOR<sup>4</sup> (Concordet; Haeussler, 2018), que será detalhada a seguir, instruindo o leitor a selecionar as melhores guias para os propósitos supracitados:

- 1) Ao acessar o CRISPOR (Figura 7), deve-se inserir a sequência-alvo na barra de sequência nucleotídica em “Step 1”. Caso prefira, é possível atribuir um nome à sequência, nessa mesma seção.

Obs.: a sequência a ser buscada pode ser genômica ou de cDNA. Em ambos os casos, deve-se atentar à segunda premissa exposta acima, descartando gRNAs candidatos que pareiem com íntrons ou que abranjam mais de 1 éxon, respectivamente.

---

<sup>4</sup> Disponível em: <http://crispor.tefor.net/>

- 2) Em seguida, selecionar, na seção “Step 2”, entre os 536 genomas disponíveis, o genoma do hospedeiro-alvo que se pretende editar. Caso o genoma da espécie não esteja disponível, é possível desabilitar a seleção de um genoma específico, selecionando a opção “No genome”. Nesse caso, o *output* terá menor riqueza de dados, sem detalhes de especificidade.
- 3) Por fim, na seção “Step 3”, selecionar o PAM correspondente à sequência PAM da nuclease com a qual se irá trabalhar na bancada e cuja abreviação é mostrada ao lado de cada sequência genérica. A seleção do PAM já inclui o comprimento padrão das sequências de gRNA a serem retornadas como *output*, o que varia conforme a nuclease utilizada na edição. Após isso, clicar em “Submit” para iniciar a busca.



CRISPOR (paper) is a program that helps design, evaluate and clone guide sequences for the CRISPR/Cas9 system. [CRISPOR Manual](#)  
 Apr 2020: [bugfixes](#), [ShCast enzymes](#), [21bp guides for Cpf1](#) [Full list of changes](#)

**Step 1**

Planning a lentiviral gene knockout screen? Use [CRISPOR Batch](#)

Sequence name (optional):

Enter a single genomic sequence, < 2000 bp, typically an exon

[Clear Box](#) - [Reset to default](#)

```

ATGGTAAAGTCCACCAACATTCCAGCCACACCAAGGCCGTGTCTCATCATCGAGCAACGGTTTC
ATAGGCCAAGTTGTCACTGAGGCAAGCCTCTCACCCGCACACCCCACTTACTGCTCTCAAGGCCACCA
CCCTTGTCCCTTCCAAGGATGCCATTGTTAAAACCTTCCAAGAAAAGGGTCCATGATCATTGATGGT
GTGATAAACCAACAAGACTTTGTGGAAAAGATTTTGAAGAGCATGAATAGACATTGTGATTTCTGCT
ATCGGGCTAAGAGCTTCTGGATCACTTATCTGGTGGSHGOCATGAAATCCGTTAAGCTATTAAAG
AGGTTTTGGCTTCAGAGTTGGACATGATGTGGACAGAGCTGATCCTGTGGAGCCAGGTCTAAACAATG
TACAAGGAAGCAATTGGTTAGGCCGTGGTTGAGCAATCTGGGGTCCATACACCAATATTTGTGTC
AATTCATTGCTTCATGGCCCTTACTATGACAATTGCCACCCATCTCAGCTTCTCCACCCCTGGATCAA
TTGCCAATATATGGTCATGGTAATGTCAAAAGCTTACTTTGTTGATGGCATGATATTGGAAAAGTTCACA
ATGAGGTTATTGATGATGTAAGACAATCAACAATAATGTTCAATTTGACCATCTAAGAAGCTGCTAC
AGCATCAATGAATCTGCTTCTCTGTGGGAAATGAAATTTGGCCGCAATCCCGAGAGTGAACATATCA
GAAGATGATCTCTAGCAGCAGCTGCAGAAAATGCAATCCCAAGTATTGTGGCATCATTCACTCAT
                    
```

Text case is preserved, e.g. you can mark ATGs with lowercase.  
 Instead of a sequence, you can paste a chromosome range, e.g. chr1:11,130,540-11,130,751

**Step 2**

Select a genome

We have 536 genomes, but not yours? Search [NCBI assembly](#) and send a GCF\_/GCA\_ID to [CRISPOR support](#).

**Step 3**

Select a Protospacer Adjacent Motif (PAM)

[SUBMIT](#)

**Figura 7.** Busca por gRNAs candidatos no CRISPOR. Janela de *input* da sequência-alvo para desenho dos gRNAs candidatos, detalhando as barras de inserção da sequência (Step 1), de seleção das opções de genomas-alvo (Step 2) e de seleção da sequência PAM (Step 3).

- 4) Logo após, novas informações serão mostradas em uma nova página (Figura 8). Primeiramente, a sequência-alvo será disponibilizada dentro de uma caixa de cor cinza, com resíduos identificados de 10 em 10 nucleotídeos. Sob os resíduos, aparecerão as sequências iniciais de gRNAs sobrepostos ao alvo. A depender da especificidade de cada gRNA, estes se apresentarão com três diferentes cores: verde (sequências com alta especificidade), amarelo (média especificidade) ou vermelho (baixa especificidade). Recomenda-se fortemente que apenas sequências com cor verde sejam selecionadas. As sequências podem estar alinhadas à sequência *Forward* (iniciando com nucleotídeos e

terminando com traços) ou *Reverse* (iniciando com traços e terminando com nucleotídeos) em relação à sequência-alvo do *input*.

Obs. 1: quando se trabalha com nucleases que clivam a sequência-alvo em ambas as fitas, é indiferente selecionar candidatos *Forward* ou *Reverse*.

Obs. 2: é possível clicar em cada sequência da caixa cinza para ser direcionado às informações respectivas na tabela que contém todos os gRNAs.

- 5) A tabela de informações, apresentada na seção *Predicted guide sequences for PAMs*, contém os principais dados sobre todos os gRNAs candidatos encontrados conforme os parâmetros estabelecidos. Essa tabela pode ser exportada e salva como arquivo com extensão .xls, ao se clicar nas diferentes opções logo acima dela (*Download as Excel tables*). Quanto aos parâmetros da tabela, os gRNAs listados são dispostos em ordem decrescente de especificidade (*on-target*, *MIT Specificity Score*, que varia de 0 a 100), sendo esta inversamente proporcional à probabilidade de ocorrência de efeitos *off-target* usando a respectiva guia. Na primeira coluna da tabela (*Position/Strand*), é informada a posição e a fita da sequência-alvo que contém complementariedade ao gRNA. Na segunda coluna (*Guide sequence + PAM + restriction enzymes*), são demonstradas as sequências de cada guia, contendo o PAM, bem como os sítios de restrição presentes e passíveis de clivar cada guia. Nessa coluna também é indicada, quando for o caso, uma observação de que a guia pode não ser adequada por conter sinais de terminação na forma de resíduos sequenciais de timina ( $T_n$ ). Também é possível restringir guias iniciadas com resíduos nucleotídicos específicos (essa restrição geralmente é utilizada ao se trabalhar com promotores U6 e U3 para dirigir a expressão do sgRNA, embora, mesmo ao se selecionarem tais promotores para dirigir a expressão, esses resíduos possam ser adicionados artificialmente à extremidade 5' de qualquer sgRNA para torná-los compatíveis ao respectivo promotor). As colunas *CFD* e *Specificity Score* são relativas aos *scores* de especificidade e de eficiência de clivagem, porém de menor utilidade para a escolha dos gRNAs. A coluna *Outcome* representa parâmetros relacionados ao resultado da clivagem, como *out-of-frame* e *frameshifts*, ocasionados por deleções e *indels*, respectivamente. Nesse caso, os valores também variam de 0 a 100, com o número representando a porcentagem teórica de eventos/clones a possuírem esses resultados de edição. A coluna *Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches* aponta o número de casos de sequências não alvo no genoma hospedeiro que contém de 0 a 4 *mismatches* (mal-pareamentos), nessa ordem, servindo de parâmetro crucial para definir as melhores guias que representem menor risco de gerar efeitos *off-target*. Quanto menor o número de casos, especialmente se houver

poucos ou nenhum caso com o menor número de *mismatches*, mais específica será a guia. É preferível que as guias selecionadas não possuam quaisquer casos com menos de 3 *mismatches*, especialmente na região *seed* do gRNA. A última coluna detalha a posição genômica de cada um dos casos *off-target*, detalhando o pareamento ao se passar o cursor do mouse sobre cada caso e marcando com asteriscos os *mismatches* entre os resíduos, o que facilita constatar se a ocorrência dos *mismatches* está dentro ou fora da *seed*.

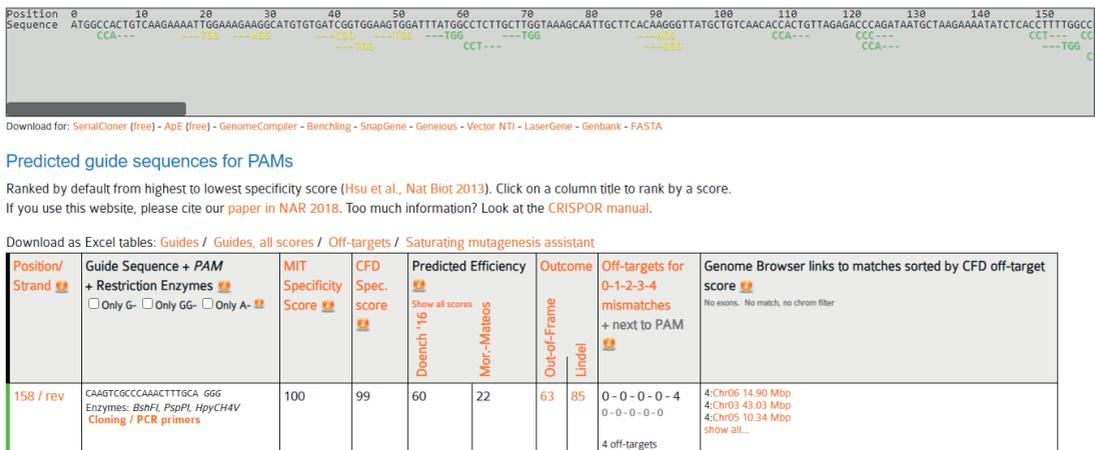


Figura 8. Resultado da predição de gRNAs candidatos no CRISPOR. Janela de *output* das seqüências de gRNAs candidatos, evidenciando a sobreposição de cada um na seqüência-alvo fornecida, sua composição nucleotídica, bem como localização na respectiva fita e parâmetros de *on-target* e *off-target*, detalhando cada um dos casos de potenciais *off-targets*.

Além do CRISPOR, para algumas espécies vegetais – especialmente as de grande importância econômica, como soja, arroz e milho –, é possível desenhar gRNAs com outras ferramentas computacionais, a exemplo da CRISPR-P v2.0<sup>5</sup> (Lei et al., 2014). Nesse caso, basta acessar a página principal do programa e clicar na aba *Submit*. Na nova janela (Figura 9), deve-se selecionar a espécie-alvo, a seqüência PAM, o promotor U6 ou U3 e o comprimento da seqüência desejada de gRNA a ser retornada (podendo variar de 15 a 22 resíduos conforme *default* do programa), também inserindo a seqüência nucleotídica a ser editada. A seqüência do *scaffold* de sgRNA já se encontra pré-estabelecida. Após isso, deve-se clicar em *Submit* para a busca de gRNAs.

Após a submissão, uma nova página (Figura 10) será aberta com o detalhamento das guias candidatas para seleção. Nessa página, os gRNAs estarão representados

<sup>5</sup> Disponível em: <http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/SCORE>

**CRISPR design**

PAM

snoRNA promoter  U6  U3

RNA Scaffold

Guide Sequence Length

Target Genome  Data from [Bolbase](#)

Locus Tag  eg: [Bol000102](#), (input % for some tips)

OR

Position  eg:  [Scaffold001737.614.785](#)

OR

Sequence

**Figura 9.** Busca por gRNAs candidatos no CRISPR-P v2.0. Janela de *input* da sequência-alvo para desenho dos gRNAs candidatos, na aba *Submit* da página, detalhando as barras de seleção da sequência PAM, do comprimento da guia, do genoma-alvo (espécie) e de inserção da sequência-alvo nucleotídica.

graficamente em alinhamento à sequência no painel superior, com as sequências *Forward* e *Reverse* em cores distintas. No painel inferior, são elencadas as sequências candidatas, com vários parâmetros informados à esquerda (%GC, *on-target score*, composição nucleotídica, presença ou não em região codante). À direita, o número de casos de *off-targets* é informado, com o detalhamento de cada um deles quanto à composição nucleotídica (com *mismatches* destacados em vermelho), número de *mismatches*, localização cromossômica e presença ou não em região codante (cada caso é classificado como *intergenic* ou CDS e, neste último caso, a ID do gene correspondente é apontada na coluna ao lado). Também são informados os sítios de restrição presentes na sequência de cada gRNA predito, os quais podem ser úteis na etapa de subclonagem das guias no vetor de expressão, por exemplo.

Adicionalmente, é possível desenhar mais de um gRNA para o mesmo gene-alvo, o que assegura maior probabilidade de ocorrência do *knockout* do referido gene, além de se poderem excisar fragmentos de grande comprimento devido à produção de pelo menos dois sítios de DSB. Indo mais além, gRNAs múltiplos podem ser desenhados e utilizados, geralmente clonados no mesmo vetor de expressão, e não necessariamente direcionados ao mesmo gene, mas a genes-alvo distintos (Cong et al., 2013), em uma estratégia denominada “engenharia de genoma multiplex”. A engenharia multiplex permite, portanto, modular a expressão de vários genes

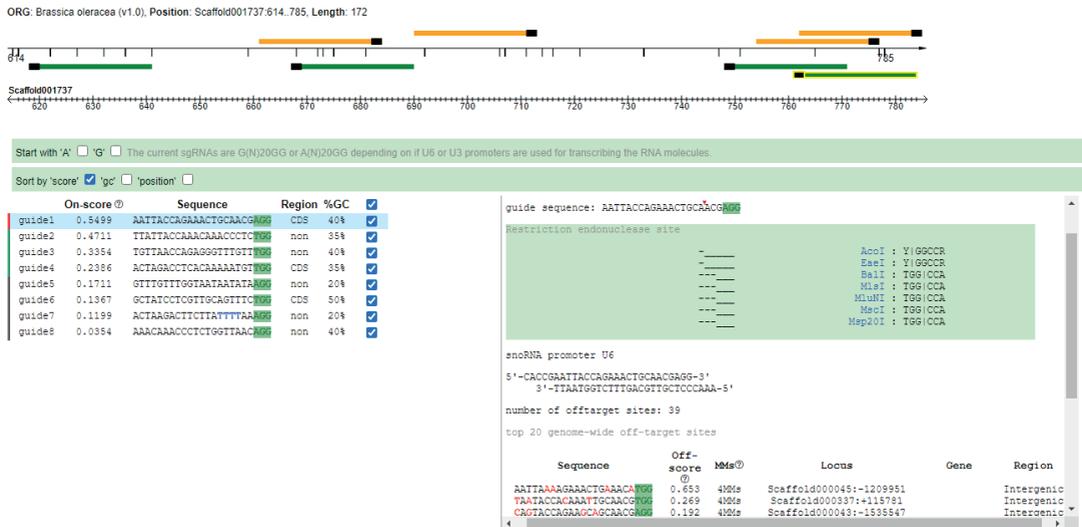


Figura 10. Resultado da predição de gRNAs candidatos no CRISPR-P v2.0. Janela de *output* das seqüências de gRNAs candidatos, evidenciando a sobreposição de cada um na seqüência-alvo fornecida, sua composição nucleotídica, bem como sítios de restrição presentes e parâmetros de *on-target* e *off-target*, detalhando cada um dos casos de potenciais *off-targets*.

associados a caracteres bastante discrepantes ou que estejam relacionados entre si convergindo para um caractere em comum.

Para conduzir a abordagem multiplex, é comum que os gRNAs desenhados sejam inseridos no vetor de expressão de forma que fiquem dispostos em cassetes policistrônicos. Para isso, além da configuração clássica de diferentes gRNAs dispostos em cassetes de expressão distintos (ou seja, de forma monocistrônica), com expressão dirigida pelos respectivos promotores, as unidades de gRNA podem ser intercaladas por seqüências de RNA transportador (RNAt), em uma estratégia que se baseia no processamento endógeno de moléculas de RNAt por RNases para excisão de transcritos em condições *in vivo*, promovendo a liberação dos gRNAs a elas fusionados e permitindo, assim, que, uma vez livres no núcleo, possam, paralelamente entre si, se associar à nuclease para guiá-la a sítios-alvo diversos no DNA genômico, também aumentando a eficiência da edição do genoma (Xie et al., 2015; Wolabu et al., 2020). Entretanto, o sistema de processamento baseado em RNAt-gRNA se fundamenta no uso de promotores para RNA Polimerase III para dirigir a expressão desses genes sintéticos (He et al., 2017). O uso desses promotores, entretanto, a exemplo das variantes de U6 e U3, possui algumas limitações (Zhang et al., 2017): são constitutivamente ativos e, portanto, ausentes de especificidade celular ou tecidual; são pouco caracterizados para alguns organismos; e não são passíveis de utilização na transcrição *in vitro* devido à falta de versões comerciais de RNA Polimerase III.

De modo a contornar esses obstáculos, uma forma alternativa de conduzir a engenharia multiplex é utilizar promotores para RNA Polimerase II. Esses promotores, a princípio, também possuem algumas limitações no uso para engenharia de genoma (Zhang et al., 2017), como: os transcritos por eles dirigidos na expressão passam por processamento pós-transcricional (capeamento, *splicing* e poliadenilação), cujas modificações no transcrito podem inativar funcionalmente o gRNA; o RNA maduro é transportado ao citosol, ficando confinado em um compartimento celular distinto de onde deve atuar juntamente com a nuclease Cas, o que constitui uma barreira física que bloqueia a atividade de edição. Entretanto, quando esses promotores são associados a uma segunda estratégia de processamento, eles podem se tornar suficientes para promover a edição. Essa estratégia, denominada "RGR" (*Ribozyme-gRNA-Ribozyme*), tem como princípio o uso de gRNAs flanqueados por ribozimas em ambas as extremidades 5' e 3' das guias (Lee et al., 2016), sendo geralmente as ribozimas *hammerhead* (HH) e do *Hepatitis D Virus* (HDV).

Com base nisso, o princípio desse mecanismo é similar ao princípio da estratégia RNAt-gRNA, embora se fundamente na atividade autocatalítica das ribozimas a partir do momento em que são transcritas, o que promove igualmente a liberação dos gRNAs no núcleo celular, contornando os processamentos que um RNA maduro receberia, como mencionado acima. Desse modo, torna-se possível produzir gRNAs a partir de quaisquer promotores em quaisquer organismos, tornando as escolhas de promotores para conduzir a edição de genoma virtualmente ilimitadas (He et al., 2017). Embora essa estratégia também possa ser utilizada para um único gRNA com expressão dirigida por promotores para RNA Polimerase II, por meio de cassetes monocistrônicos similares aos mencionados sobre promotores para RNA Polimerase III, ela é bastante conveniente para a abordagem multiplex, como mencionado anteriormente, em uma configuração policistrônica.

### Identificação de *off-targets* potenciais

Embora ambas as ferramentas apresentadas no tópico anterior sejam capazes de prever potenciais sítios *off-target* para cada gRNA desenhado, há ferramentas especializadas nessa tarefa e com maior acurácia. Entre elas, a ferramenta Cas-OFFinder<sup>6</sup> (Bae et al., 2014) é bastante completa, intuitiva, com layout simples e mais utilizada, sendo, portanto, recomendada pelos autores para esse procedimento, o qual é detalhado a seguir:

- 1) Acessando o Cas-OFFinder (Figura 11), deve ser realizado o *input* simultâneo das sequências de gRNA selecionadas na etapa anterior. Nessa janela,

---

<sup>6</sup> Disponível em: <http://www.rgenome.net/cas-offinder/>

a ferramenta é subdividida em 3 seções: (a) *PAM Type*: primeiramente, deve ser selecionada a sequência PAM correspondente à nuclease com a qual se irá trabalhar; (b) *Target Genome*: aqui deve ser selecionado o grupo de organismos dentro do qual a espécie que contém o genoma-alvo está localizada, sendo os grupos *Vertebrates*, *Insects*, *Plants*, *Others* e *Non-reference Vertebrates*, e depois deve ser selecionada a espécie com seu genoma de referência; (c) *Query Sequences*: nesta seção, as sequências de resíduos dos gRNAs são inseridas uma abaixo da outra (em linhas separadas), sem a sequência PAM, podendo se estabelecer um limite máximo de *mismatches*, dando maior objetividade à análise. Ao final, clicar em *Submit* para iniciar a busca.

- 2) Em seguida, novas informações serão mostradas em nova página (Figura 12). Nela são apresentadas duas seções: (a) *Summary*: apresenta, para cada sequência de gRNA, uma linha com o número de casos *on-target* e outra linha com o número de casos *off-target*, de acordo com o número de *mismatches*, de forma similar ao que é demonstrado no CRISPOR; (b) *Details*: tanto para os casos de *on-target* quanto de *off-target*, é apresentado o pareamento entre o gRNA e o alvo genômico, bem como indicado em qual cromossomo o alvo está localizado, além de sua posição de início em termos de resíduo nucleotídico e da orientação da sequência na fita (sense +, ou antissense -). Com essa informação, é possível voltar ao Phytozome e localizar a sequência do sítio *off-target*, caracterizando-a quanto à expressão. Nesse caso, é recomendado verificar primeiro se os sítios *off-target* se encontram em sequências intergênicas ou transcritas. Estando em sequências transcritas, é importante determinar a região da sequência, avaliando sua importância no desempenho do produto final, de modo que, uma vez realizado o *knockout*, o resultado não gere efeitos prejudiciais ao organismo ou que interfiram na análise. Por exemplo: clivagens em regiões 5'-UTR e éxons costumam ser críticas; portanto, um gRNA desenhado com um *off-target* potencial nessas clivagens não deve ser priorizado, ao contrário de outros localizados em regiões intrônicas (exceto em regiões de consenso que sejam preponderantes para o *splicing*).

### Simulação de *knockout* e predição de homologia

Uma vez verificados e filtrados apenas gRNAs com boa especificidade e sem atividade *off-target* crítica, quando houver sítios *off-target* potenciais, é importante simular o *knockout* resultante da edição, para que possa ser feita a predição de homologia com domínios proteicos funcionais a partir da cadeia polipeptídica remanescente, uma vez que se espera que ela seja truncada e sua atividade biológica seja abolida. É importante ressaltar que esse tipo de análise deve ser feita apenas

## Cas-OFFinder

A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases.

### PAM Type

**CRISPR/Cas-derived RNA-guided Endonucleases (RGENs)**

- SpCas9 from *Streptococcus pyogenes*: 5'-NGG-3'
- SpCas9 from *Streptococcus pyogenes*: 5'-NRG-3' (R = A or G)
- StCas9 from *Streptococcus thermophilus*: 5'-NNAGAAW-3' (W = A or T)
- NmCas9 from *Neisseria meningitidis*: 5'-NNNNGMTT-3' (M = A or C)
- SaCas9 from *Staphylococcus aureus*: 5'-NNGRR-3' (R = A or G)
- CJCas9 from *Campylobacter jejuni*: 5'-NNNRYAC-3' (V = G or C or A, R = A or G, Y = C or T)
- CJCas9 from *Campylobacter jejuni*: 5'-NNNNRYAC-3' (R=A or G, Y= C or T)
- AsCpf1 from *Acidaminococcus* or LbCpf1 from *Lachnospiraceae*: 5'-TTTN-3'
- AsCpf1 from *Acidaminococcus* or LbCpf1 from *Lachnospiraceae*: 5'-TTTV-3' (V = G or C or A)
- SpCas9 from *Streptococcus pasteurianus*: 5'-NNGTGA-3'
- FnCpf1 from *Francisella*: 5'-TTN-3'
- SaCas9 from *Staphylococcus aureus*: 5'-NNNRT-3' (R=A or G)
- FnCpf1 from *Francisella*: 5'-KYTV-3'
- VRER SpCas9 from *Streptococcus pyogenes*: 5'-NGCG-3'
- VQR SpCas9 from *Streptococcus pyogenes*: 5'-NGA-3'
- XCas9 3.7 (TLIKDIV SpCas9) from *Streptococcus pyogenes*: 5'-NGT-3'
- XCas9 3.7 (TLIKDIV SpCas9) from *Streptococcus pyogenes*: 5'-NG-3'
- BHCas12b from *Bacillus hisashii*: 5'-TTN-3'
- BHCas12b v4 from *Bacillus hisashii*: 5'-ATTN-3'
- BHCas12b v4 from *Bacillus hisashii*: 5'-DTTN-3'
- Spy-macCas9 from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus macacae*: 5'-NAAN-3'
- Nme2Cas9 from *Neisseria meningitidis*: 5'-NNNNCC-3'
- RR AsCpf1 from *Acidaminococcus*: 5'-TYCV-3'
- RVR AsCpf1 from *Acidaminococcus*: 5'-TATV-3'
- CcCas9 from *Clostridium cellulolyticum*: 5'-NNNNGNA-3'
- MAD7 nuclease: 5'-YTTV-3'

### Query Sequences

**Query sequences (5' to 3')**, one sequence per line.

Please write crRNA sequences **without PAM sequences** (e.g. without NGG for SpCas9). The length of each query sequence should be between **15 and 25 nt**, and **all be the same length!**

```
CAGCAACTCCAGGGGCCGC
AAAGGAAACCATTGTGTAA
```

**Mismatch Number** (eq or less than)

**DNA Bulge Size** (eq or less than)

**RNA Bulge Size** (eq or less than)

**Please note** that large number of bulge size will significantly increase the calculation time!

Mixed bases are allowed.

The count of query sequence must be less than 1000.

<DNA bulge>

<RNA bulge>

### Target Genome

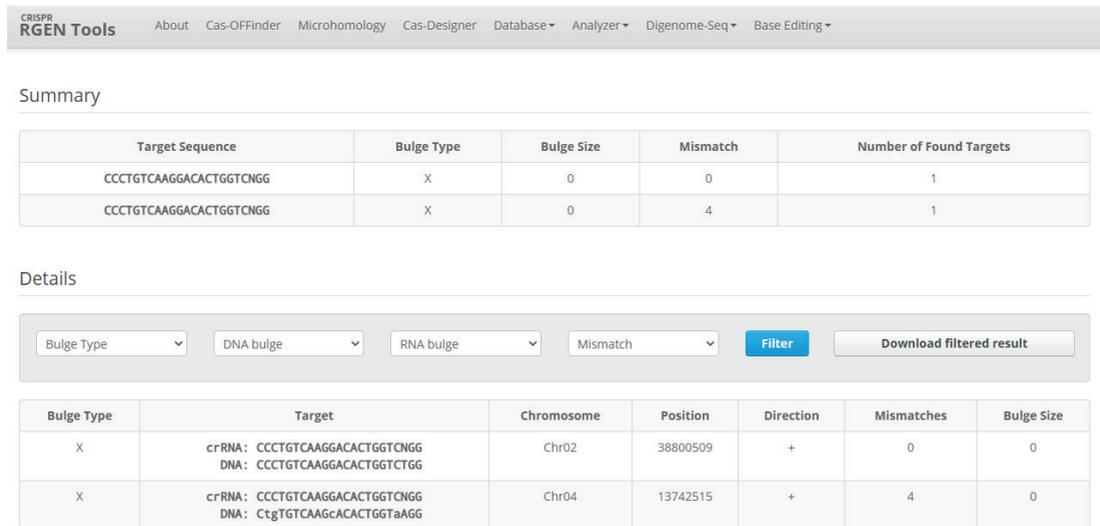
**Organism Type**

Plants

**Genomes**

- Arabidopsis thaliana* (TAIR10) - Thale cress
- Oryza sativa* (OSv4) - Rice
- Solanum lycopersicum* (SL2.4) - Tomato
- Zea mays* (AGPv3) - Corn
- Chlamydomonas reinhardtii* (Chlr4)
- Solanum tuberosum* (PGSC v4.03) - Potato
- Glycine max* (v1.0) - Soybean
- Vitis vinifera* (IGGP\_12X/Ensplant26) - European grapevine
- Manihot esculenta* (JGI 4.1) - Cassava
- Malus domestica* (JGI 1.0) - Apple
- Hordeum vulgare* (Ensembl Plants 28) - Barley
- Nicotiana benthamiana* (v1.0.1)
- Fragaria vesca* (1.0) - Wild strawberry
- Citrus sinensis* (1.0) - Sweet orange
- Theobroma cacao* (CIRAD 1.0) - Cacao
- Theobroma cacao* (CGD 1.1) - Cacao

**Figura 11.** Busca por potenciais sítios *off-target* no Cas-OFFinder. Janela de *input* dos gRNAs selecionados na etapa anterior, possibilitando a mudança de diferentes parâmetros em cada seção. *PAM Type*: seleção da sequência PAM associada à nuclease em experimentação; *Target Genome*: seleção da espécie que contém o genoma-alvo a ser analisado para as potenciais regiões não alvo, com as espécies segmentadas em grupos de organismos que também precisam ser selecionados; *Query Sequences*: inserção das sequências de gRNAs simultaneamente, atendendo às exigências dispostas nesta seção, também sendo possível estabelecer limite de número de *mismatches*.



**Figura 12.** Resultado da predição de potenciais sítios *off-target* no Cas-OFFinder. Janela de *output* dos gRNAs selecionados na etapa anterior, com a análise dos casos de sítios potenciais de *off-targets* encontrados no genoma de referência. A seção *Summary* resume, para o mesmo gRNA, casos *on-target* em uma linha (mostrado por 0 *mismatch*, sendo a própria sequência-alvo no genoma) e *off-target* em outra linha (mostrado por 1 caso com 4 *mismatches*, neste exemplo). Na seção *Details*, ambos os casos são detalhados quanto ao pareamento entre o gRNA e a sequência genômica similar, porém informando a localização cromossômica, nas colunas *Chromosome* e *Position*.

quando o objetivo almejado é o *knockout* por edição, via *indels*, das sequências codantes de proteínas-alvo. Para isso, o procedimento adequado deve ser realizado da seguinte maneira:

- 1) Deve ser conduzida uma tradução *in silico* a partir do resíduo nucleotídico onde teoricamente ocorrerá a clivagem pela nuclease, de modo que seja gerada uma cadeia polipeptídica truncada para posterior verificação de homologia. É possível conduzi-la na ferramenta online ExPASy Translate Tool<sup>7</sup>. A partir do ponto de clivagem, selecionar a sequência *upstream* e inseri-la na barra de sequência nucleotídica (Figura 13). Recomenda-se, como formato de *output*, manter a opção *Compact* selecionada, bem como os resultados mostrados em ambas as fitas, habilitando as duas opções, sem necessidade de selecionar o código genético específico. Por fim, deve-se clicar em *Translate!*. É importante lembrar que nem todo *indel* ocasionará a formação de um *stop codon* mais precoce ao longo da sequência-alvo ou, de modo mais amplo, uma *frameshift* que altere a cadeia polipeptídica a 3' do ponto de clivagem, modificando sua estrutura tridimensional secundária e/ou terciária e, com isso, inviabilizando

<sup>7</sup> Disponível em: <https://web.expasy.org/translate/>

a atividade biológica nativa. Isso porque é possível que ocorram inserções ou deleções de resíduos nucleotídicos em números múltiplos de 3, o que mantém o restante da sequência *in frame*, não necessariamente provocando este efeito deletério pela presença ou ausência de alguns poucos resíduos de aminoácido. Porém, devido à imprevisibilidade do tipo de *indel* a ocorrer em cada evento, deve-se trabalhar assumindo a ocorrência dos *indels* não múltiplos de 3, possibilitando a simulação.

**Translate** is a tool which allows the translation of a nucleotide (DNA/RNA) sequence to a protein sequence.

**DNA or RNA sequence**

```
ATGGCCACTGTC AAGAAAATTGGAAAGAAGGCATGTGTGATCGGTGGAAGTGGATTTATGGCCCTCTGCTTGGTAAAGC
AATTGCTTCA CAAGGGTTATGCTGTCAACCACTGTTAGAGACCCAGATAATGCTAAGAAAATATCTCACCTTTTGGC
CCTGCAAAAGTTGGGCGACTTGAACATATTTGGAGCAGATCTAACAGGTGAAAAGGGATTTTGTGCCCTATAGCAGGC
TGTGAACTTGTCTTCA GCTTGTACACCTGTGAACCTTGGCTTCTGAAAGATCCTGAGAAATGACACGATCAAGCCTGC AA
TCTCAGGAGTGTGAAATGTGTTGAAAGCATGTGCACGAGCAA
```

**Output format**

- Verbose: Met, Stop, spaces between residues
- Compact: M, -, no spaces
- Includes nucleotide sequence
- Includes nucleotide sequence, no spaces

**DNA strands**

- forward  reverse

**Genetic codes - See NCBI's genetic codes**

Standard

reset TRANSLATE!

**Figura 13.** Tradução in silico de sequências truncadas no ExPASy Translate Tool. Janela de *input* da sequência nucleotídica simulada quanto à truncagem, evidenciando diferentes formatos possíveis de *output* e a possibilidade de representação de 3 *frames* (apenas *Forward* ou *Reverse*) ou 6 *frames* (*Forward* e *Reverse*).

- 2) Com o resultado da análise, uma nova página é aberta (Figura 14), com os resultados da tradução in silico, em todas as 6 possíveis ORFs (*Open Reading Frames*). Como a sequência do *input* geralmente é inserida a partir do primeiro resíduo do *start codon* (ATG), todo resultado desse modo será encontrado na *Frame 1* (5'-3'), com a sequência truncada marcada continuamente em vermelho.

**Results of translation**

- Open reading frames are highlighted in red
- Select your initiator on one of the following frames to retrieve your amino acid sequence

[Download all the translated frames](#)

**5'3' Frame 1**

MAIVKIKKACVIGSGFMASCLVQLLHKGYAVNTTVRDPDPAKISHLALQSLGDLNIFGADLTGERDFDAPDIAGCELVQLATPVNFASEDPENDTIKPAI  
SGVLNVLRACARA

**5'3' Frame 2**

WPLSRKLERRHV-SVEVDLWPLAW-SNCFTRVMLSTPILLETQIMLRKYLTFWPCVKVWAT-TYLEQI-QVKGILMPL-QAVNLSFSLHL-TLLKILRMRSSLQS  
QEC-MC-KHVHEQ

**5'3' Frame 3**

GHCQENWKEGMDRQWKVIYGLLGAIASQGLCCQHHHC-RPR-C-ENISPFPGPAKFRLEHIWRSNR-KGF-CPYSRL-TCLSACYTCELCF-RS-E-HDQACNL  
RSVECVESMCTS

**3'5' Frame 1**

LLVHMLSTHSTLLRLQA-SCHSQDLQKSSQV-QAERQVHSLL-GHQNPFHLLDLLQICSSRPNFAGPKGEIFS-HYLGL-QWC-QHNPCETALPSKRP-IHFHR  
SHMPSFQFS-QWP

**3'5' Frame 2**

CSCTCFQHIQHS-DCRLDRVILRIFRSKVHRCCLKDKFTACYRGIKIPFTC-ICSKYVQVAQTLQGQKVRYFLSIIWVSNQVDSITLVKQLLYQARGHKSTST  
HTCLLSNFLDSGH

**3'5' Frame 3**

ARAHAFNIFNTPEIAGLIVSFGSGSEAKFTGVAS-KTSSQPAIGASKSLSPVRSAPMFKSPKLCRAKR-DIFLALSGSLTVVLA-PL-SNCFTRQEAINPLPPI  
THAFFPIFLTVA

Figura 14. Resultado da tradução in silico no ExPASy Translate Tool. Janela de *output* da sequência traduzida, em 6 diferentes ORFs (*Open Reading Frames*), com a sequência da cadeia polipeptídica, neste caso, presente na *Frame 1 5'-3'*.

- 3) Tendo a sequência polipeptídica truncada, é possível copiá-la e inseri-la na ferramenta on-line para predição de homologia com domínios proteicos funcionais, InterPro<sup>8</sup>. Nessa página (Figura 15), realiza-se o *input* da sequência no formato FASTA, conduzindo a busca e mantendo os parâmetros pré-estabelecidos. Logo após, uma página com o *output* da análise (Figura 16) será aberta, informando sobre a presença ou ausência de predição de famílias proteicas referentes à sequência polipeptídica remanescente. Não havendo predição, é provável que a sequência resultante não forme domínios funcionais que desempenhem atividade biológica residual, o que implica na deleção da função da proteína associada ao gene submetido ao *knockout*.

Uma vez confirmada ausência de homologia, o gRNA atende a todos os requisitos e propriedades de um candidato útil e com maior probabilidade de exercer sua função sem que efeitos indesejados ocorram, podendo ser validado in vitro e preparado para subclonagem em vetores de expressão (abordagem: uso de plasmídeos), ou então usado isoladamente (abordagem: IVT) ou complexado a uma nuclease (abordagem: RNP).

<sup>8</sup> Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>

InterPro Classification of protein families

Home Search Browse Results Release notes Download Help About

Search by sequence Search by text Search by Domain Architecture

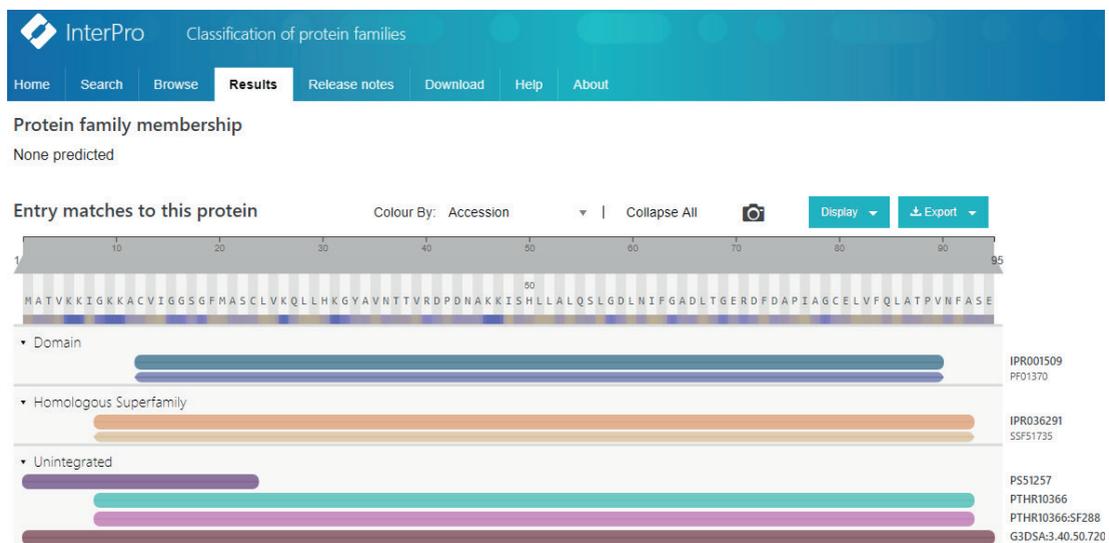
Sequence, in FASTA format

> Protein 1  
 MATVKKIIGKKAACVIGGSGFMASCLVQLLHKGYAVNTTVRDPNNAKTI SHLLALQSLGDLNIFGADLTGERDFDAP IAGCELVFQLATPVNFASE

Valid Sequence.

Choose file Example protein sequence

**Figura 15.** Busca por homologia proteica no InterPro. Janela de *input* da sequência polipeptídica truncada para predição de homologia com domínios proteicos funcionais por associação a famílias proteicas.



**Figura 16.** Resultado da predição de homologia com domínios funcionais no InterPro. Janela de *output* da sequência polipeptídica truncada, evidenciando ausência de homologia com famílias proteicas, indicando que a sequência remanescente não desempenha atividade biológica conhecida.

## Parte 2: in vitro

O segundo passo para realizar a edição genômica via CRISPR/Cas consiste na validação *in vitro* das moléculas isoladas e mediadoras do processo de edição, o que pode ser conduzido com utilização de kits comerciais. Devido ao fato de que os elementos genéticos que compõem um vetor de expressão (nas abordagens de

uso de plasmídeos) e de que os métodos de transfecção variam bastante de acordo com a espécie-alvo e o explante utilizado, não será detalhado aqui o delineamento dessas etapas, uma vez que isso deve ser estabelecido de forma particular em cada projeto de pesquisa. Entretanto, a validação *in vitro* dos guias desenhados e das nucleases associadas é um processo mais universal para os diferentes organismos que se pretende editar.

### Eficiência de clivagem e validação do complexo nuclease-sgRNA

É fundamental que o sgRNA seja capaz de guiar a nuclease ao sítio-alvo. Mais ainda, o processo somente será viável se, além dessa capacidade, a nuclease for eficiente em promover a clivagem da sequência no sítio de clivagem esperado. Dessa forma, é possível verificar a atividade de ambos por meio de um teste de eficiência de clivagem *in vitro*, no qual a sequência-alvo é amplificada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e o produto da PCR é clivado pelo complexo. A formação de fragmentos de digestão a partir do produto de PCR indica que tanto o sgRNA quanto a nuclease executam sua função normalmente, estando aptos a proceder à edição genômica *in vivo*. Caso contrário, a ausência de produtos de clivagem indica ausência de eficiência da função de pelo menos um desses componentes do complexo. Para isso, é necessário obter a RNP correspondente ao complexo que será formado *in vivo*. Nesse caso, a obtenção da nuclease e do sgRNA pode ocorrer conforme descrito no tópico RNPs: sistemas DNA-free, deste capítulo. Para trabalhos que utilizem o sistema de RNP para transfecção, após a validação o complexo já pode ser diretamente utilizado para proceder à edição. No caso de sistemas plasmidiais ou de transcritos, procede-se às sequências nucleotídicas correspondentes das moléculas validadas.

Um procedimento simples e sucinto (GenScript, 2018) para essa validação, baseado em kit de ensaio *in vitro*, pode ser seguido conforme descrito abaixo:

- 1) Realizar a amplificação da região-alvo por PCR (Nota: é possível desenhar pares de *primers* tanto para a região-alvo quanto para potenciais *off-targets* no CRISPOR, a partir da tabela de informações do *output* da busca). O produto de PCR será utilizado como substrato para a digestão com a nuclease da RNP. É recomendado que o produto contenha pelo menos 200 pb flanqueando a sequência com a qual o gRNA se pareia, tanto a 5' quanto a 3', sendo preferencial que o produto de PCR tenha cerca de 1 kb para melhor visualização da digestão.

- 2) Preparar 16  $\mu\text{L}$  de RNP em um tubo nuclease-free, conforme o seguinte sistema de reação, adaptado de GenScript (2018):

Componente	Volume/Quantidade de matéria
sgRNA	3,6 pmol
Nuclease Cas (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	1,5 pmol
Tampão de reação (Cas) (10X)	2 MI
H <sub>2</sub> O nuclease-free	13,6 $\mu\text{L}$
Volume final	16 $\mu\text{L}$

- 3) Conduzir o *assembly* da RNP incubando o tubo do sistema de reação a 37 °C por 10 minutos.
- 4) Adicionar 450 ng do produto de PCR ao mix de RNP montado no passo 2, completando o volume com água nuclease-free para 20  $\mu\text{L}$  e agitando levemente para promover a mistura.
- 5) Incubar a mistura produto-RNP por, no mínimo, 30 minutos a 37 °C.
- 6) Verificar a ocorrência ou não da digestão por meio de visualização baseada em eletroforese em gel de agarose.

### Parte 3: in vivo

Por último, após ter sido realizada a transfecção e regeneração de eventos candidatos a plantas editadas, é necessário caracterizar as edições ocorridas in vivo por meio de técnicas diversas, cada uma apresentando suas vantagens e desvantagens. Aqui não será detalhado um passo a passo de cada uma, mas o leitor será direcionado com literatura a respeito das mesmas, bem como com informações gerais pertinentes, para buscar sobre como conduzi-las conforme sua preferência, adequação ao desenho de seu estudo e disponibilidade de materiais, reagentes e equipamentos em seu laboratório.

#### Identificação de plantas editadas

Para que os eventos candidatos sejam caracterizados quanto à alteração da sequência genômica, é de grande interesse filtrar, quando possível, as plantas que apresentem fenótipo, reduzindo o volume de avaliações, visando a tornar a caracterização mais prática, simples e menos trabalhosa.

Ao se trabalhar com sistemas plasmidiais e integração genômica, é possível, com base no vetor de expressão utilizado e seus elementos genéticos, selecionar explantes que se regenerem em meio seletivo com resistência garantida pelo marcador com o qual se trabalha, ou que sejam visualmente observáveis quanto à característica que o gene repórter inserido confere. Entretanto, ao se trabalhar com IVTs ou RNPs, por exemplo, a seleção com base nessas características se torna inviável, já que geralmente não se aplica. Dessa forma, caso não seja possível conduzir uma triagem (*screening*) com base em agente seletivo, ou no próprio fenótipo resultante da edição genômica, a caracterização deve se proceder para a seleção de mutantes. Para essa seleção, os seguintes métodos são alguns dos que podem ser utilizados na genotipagem:

- Sequenciamento: bastante útil para detalhar o tipo e a composição do *indel* gerado após a clivagem e reparo, informando sobre cada uma das fitas a sequência exata dos resíduos nucleotídicos, podendo ser utilizados tanto o método de Sanger quanto abordagens de NGS (*Next-Generation Sequencing*). De forma geral, o sequenciamento costuma ser uma abordagem central ou complementar a outros métodos menos informativos em nível de sequência genômica, sendo usado, quando aplicado como método complementar, para caracterizar apenas os eventos previamente genotipados.
- PCR-RE (*PCR-restriction enzyme*): baseada em uma etapa de amplificação das regiões a serem avaliadas, que geralmente são as sequências-alvo e regiões de possível *off-target*. Em seguida, é realizada uma digestão com enzimas de restrição com sítio de reconhecimento englobando o sítio de clivagem pela nuclease da edição. Dessa forma, a digestão do produto de PCR revela que o sítio de restrição permanece intacto e, portanto, não houve edição; a ausência de digestão revela que o sítio de restrição foi eliminado devido ao *indel* resultante da edição de genoma. Embora frequentemente utilizada, a limitação dessa técnica reside na necessidade da existência de tais sítios de restrição, o que nem sempre ocorre, dada a reduzida diversidade de gRNAs candidatos que sejam apropriados. Para mais informações, ler o trabalho de Xie e Yang (2013).
- Ensaio T7E1/Surveyor™: baseado na capacidade de reconhecimento e clivagem de moléculas de DNA heteroduplex (derivadas dos *mismatches* entre as fitas) pelas enzimas T7 endonuclease e Surveyor. Essas enzimas reconhecem moléculas de DNA cujas fitas se encontram mal-pareadas. Por essa razão, são úteis na detecção de heteroduplexes, que correspondem a indivíduos heterozigotos para a edição. Trata-se de técnicas simples e baratas, quando comparadas ao sequenciamento, mas que não revelam a sequência nucleotí-

dica das regiões avaliadas. Também não possuem reprodutibilidade robusta e estão suscetíveis a gerar resultados falso-positivos quando há ocorrência de polimorfismos ou mutações randômicas nas sequências avaliadas, embora sua utilização seja relatada comumente na literatura. Além disso, apenas indivíduos heterozigotos para as edições podem ser detectados. Para mais informações, ler o trabalho de Vouillot et al. (2015).

- qPCR (PCR quantitativa): são inúmeras as variações da qPCR para genotipagem dos *indels* de eventos, tanto em nível genômico quanto em nível transcriptômico (via RT-qPCR), cujos *primers* desenhados se sobrepõem ao sítio-alvo a ser editado, de modo que o fundamento dessa técnica reside no fato de que a ocorrência ou não da mutagênese é indicada pelo insucesso ou sucesso, respectivamente, da amplificação. Isso porque a edição tende a anular o anelamento do *primer* na região editada, interferindo na geração de amplicon. Entretanto, *indels* menores tendem a interferir em menor grau na amplificação. Para isso, a técnica de HRM (*High Resolution Melting*) pode ser uma alternativa para identificar *indels* menores, pois consiste na alteração do padrão de fluorescência na análise da curva de *melting*, que é gerado durante a formação do duplex de DNA. Com isso, com base no perfil da curva, é possível distinguir nitidamente um indivíduo selvagem (*wild-type*, WT) de um mutante. De forma geral, a qPCR/RT-qPCR é uma técnica acurada, porém com custo relativo um pouco maior que algumas outras técnicas de genotipagem. Desse modo, recomendamos que o leitor compreenda os detalhes das principais vertentes metodológicas a partir dos trabalhos de Yu et al. (2014), Falabella et al. (2017) e Li et al. (2018).
- Western blot: técnica que consiste na marcação de uma proteína-alvo utilizando um anticorpo conjugado a uma molécula que produz um sinal visível após reação enzimática, sendo o anticorpo direcionado para reconhecer uma região específica da proteína-alvo. A proteína é detectada sobre uma membrana após a transferência a partir de um gel de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio). Havendo presença da proteína em sua forma completa, a região reconhecida pelo anticorpo permanece presente, resultando em sinal colorimétrico devido à reação catalisada; no caso de ausência da forma completa, nenhum sinal é teoricamente detectado. Trata-se de um método menos utilizado para a caracterização, já que além de ser mais trabalhoso e exigir maior tempo de trabalho, é possível realizar a caracterização em nível genômico ou transcriptômico, sem necessidade de avaliação em nível proteômico. Além disso, há a possibilidade de gerar falso-positivos, uma vez que pode ocorrer reação cruzada de ligação do anticorpo com proteínas estruturalmente similares à proteína-alvo, ainda que

esta já esteja truncada devido à edição. Normalmente, é conduzida a detecção da proteína Cas, verificando eventos que expressem a nuclease e, portanto, estão a princípio passando por um processo de edição (Endo et al., 2019).

- Gel de poliacrilamida (PAGE): o gel de poliacrilamida forma uma malha com propriedades que geram alta capacidade de resolução de moléculas de DNA, o que permite detectar diferenças de até cerca de 2 pb entre as fitas e entre diferentes amostras. Desse modo, é uma alternativa bastante acurada para detectar todas as faixas de comprimento dos *indels*, apesar de ser um pouco trabalhosa e não muito rápida. Para mais informações, conferir o trabalho de Zhu et al. (2014).
- Gel de agarose (AGE) 4%-6%: embora géis de agarose, em suas concentrações usuais de trabalho (1% a 3%) não sejam úteis para distinguir *indels* por CRISPR/Cas e, portanto, para genotipar eventos, Bhattacharya e Van Meir (2019) recentemente desenvolveram um método simples para genotipagem utilizando géis mais concentrados, com 4% a 6% de agarose. Nessa abordagem, *indels* de pelo menos 3 pb podem ser detectados visualmente com base na propriedade de mobilidade de moléculas heteroduplex ao longo da malha do gel. Inicialmente, heterozigotos podem ser diferenciados de homozigotos após serem submetidos a 34 ciclos de PCR. Em seguida, os homozigotos mutantes podem ser diferenciados dos homozigotos selvagens após um ciclo adicional de desnaturação/renaturação por meio da hibridização com um controle selvagem, o que leva à formação de homoduplexes no caso de homozigotos selvagens e de heteroduplexes no caso de homozigotos mutantes. A técnica é bastante vantajosa quanto à praticidade e simplicidade frente a outras como qPCR, PAGE, Western blot e ensaios T7E1/Surveyor, mas até o momento foi utilizada apenas para animais, sendo promissora para testar sua aplicação em plantas.

## Referências

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396 p.

AMIRKHANOV, R. N.; STEPANOV, G. A. Systems of delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes for genome editing. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 45, p. 431–437, Nov. 2019.

ANDERSSON, M.; TURESSON, H.; OLSSON, N.; FALT, A-S.; OHLSSON, P.; GONZALEZ, M. N.; SAMUELSSON, M.; HOFVANDER, P. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. **Physiologia Plantarum**, v. 164, n. 4, p. 378–384, Dec. 2018.

- ANDRES, S. N.; VERGNES, A.; RISTIC, D.; WYMAN, C.; MODESTI, M.; JUNOP, M. A human XRCC4-XLF complex bridges DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 4, p. 1868–1878, Feb. 2012.
- BAE, S.; PARK, J.; KIM, J. S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. **Bioinformatics**, v. 30, n. 10, p. 1473-1475, May 2014.
- BHATTACHARYA, D.; VAN MEIR, E. G. A simple genotyping method to detect small CRISPR-Cas9 induced indels by agarose gel electrophoresis. **Scientific Reports**, v. 9, article 4437, 2019.
- CAI, Y.; CHEN, L.; LIU, X.; SUN, S.; WU, C.; JIANG, B.; HAN, T.; HOU, W. CRISPR/Cas9- mediated genome editing in soybean hairy roots. **PLoS One**, v. 10, n. 8, e0136064, Aug. 2015.
- CARDONA, Y. T.; MORALES, M. A. M. Main repair mechanisms for damages in the DNA molecule. **Biosalud**, v. 13, n. 2, p. 95-110, jul./dic. 2014.
- CARROLL, D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. **Genetics**, v. 188, n. 4, p. 773-782, Aug. 2011.
- CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 179-204, Oct. 2010.
- CONCORDET, J.; HAEUSSLER, M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 242-245, July 2018.
- CONG, L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HABIB, N.; HSU, P. D.; WU, X.; JIANG, W.; MARRAFFINI, L. A.; ZHANG, F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819-823, Feb. 2013.
- COOK, E. H.; SCHERER, S. W. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 919-923, Oct. 2008.
- CORNU, T. I.; THIBODEAU-BEGANNY, S.; GUHL, E.; ALWIN, S.; EICHTINGER, M.; JOUNG, J. K.; CATHOMEN, T. DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 2, p. 352-358, Feb. 2008.
- CUI, Y.; DONG, H.; MA, Y.; ZHANG, D. Strategies for applying nonhomologous end joining-mediated genome editing in Prokaryotes. **ACS Synthetic Biology**, v. 8, n. 10, p. 2194–2202, 2019.
- CYRANOSKI, D. **CRISPR tweak may help gene-edited crops bypass biosafety regulation**. 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/news/crispr-tweak-may-help-gene-edited-crops-bypass-biosafety-regulation-1.18590>. Acesso em: 02 jun. 2020.
- DAVIS, A. J.; CHEN, B. P.; CHEN, D. J. DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. **DNA Repair (Amst)**, v. 17, p. 21–29, May 2014.
- DEMIRER, G. S.; ZHANG, H.; GOH, N. S.; GONZÁLEZ-GRANDÍO, E.; LANDRY, M. P. Carbon nanotube-mediated DNA delivery without transgene integration in intact plants. **Nature Protocols**, v. 14, p. 2954-2971, Oct. 2019.
- DERIANO, L.; ROTH, D. B. Modernizing the non-homologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. **Annual Review of Genetics**, v. 47, p. 433-455, 2013.
- DOWNS, J. A.; JACKSON, S. P. A means to a DNA end: the many roles of Ku. **Nature Reviews Molecular and Cell Biology**, v. 5, p. 367-378, May 2004.

DUAN, Y. B.; LI, J.; QIN, R. Y.; XU, R. F.; LI, H.; YANG, Y. C.; MA, H.; LI, L.; WEI, P. C.; YANG, J. B. Identification of a regulatory element responsible for salt induction of rice OsRAV2 through *ex situ* and *in situ* promoter analysis. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 1/2, p. 49-62, Jan. 2016.

ENDO, M.; MIKAMI, M.; ENDO, A.; KAYA, H.; ITOH, T.; NISHIMASU, H.; NUREKI, O.; TOKI, S. Genome editing in plants by engineered CRISPR-Cas9 recognizing NG PAM. **Nature Plants**, v. 5, p. 14-17, Jan. 2019.

FALABELLA, M.; SUN, L.; BARR, J.; PENA, A. Z.; KERSHAW, E. E.; GINGRAS, S.; GONCHAROVA, E. A.; KAUFMAN, B. A. Single-step qPCR and dPCR detection of diverse CRISPR-Cas9 gene editing events *in vivo*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 7, n. 10, p. 3533-3542, Oct. 2017.

GAJ, T.; SIRK, S. J.; SHUI, S. L.; LIU, J. Genome-editing technologies: principles and applications. **Cold Spring Harb Perspectives in Biology**, v. 8, n. 12, p. a023754, Dec. 2016.

GENSCRIPT. **CRISPR: Ribonucleoprotein (RNP) user manual**. New Jersey, 2018. p. 7.

GIL-HUMANES, J.; WANG, Y.; LIANG, Z.; SHAN, Q.; OZUNA, C. V.; SÁNCHEZ-LEÓN, S.; BALTES, N. J.; STARKER, C.; BARRO, F.; GAO, C.; VOYTAS, D. F. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. **The Plant Journal**, v. 89, n. 6, p. 1251-1262, Mar. 2017.

GLASS, Z.; LEE, M.; LI, Y.; XU, Q. Engineering the delivery system for CRISPR-based genome editing. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 173-185, Feb. 2018.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **An introduction to genetic analysis**. 7<sup>th</sup> KREBS, J. E; GOLDSTEIN, E. S.; KILPATRICK, S. T; LEWIN, B. **Lewin's Genes X**. 10

LEI, Y.; LU, L.; LIU, H. Y.; LI, S.; XING, F.; CHEN, L. L. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. **Molecular Plant**, v. 7, n. 9, p. 1494-1496, Sept. 2014.

LI, L.; HE, Z.; WEI, X.; GAO, G.; WEI, Y. Challenges in CRISPR/Cas9 delivery: potential roles of nonviral vectors. **Human Gene Therapy**, v. 26, n. 7, p. 452-462, July 2015.

LI, Q.; SAPKOTA, M.; VAN DER KNAAP, E. Perspectives of CRISPR/Cas-mediated *cis*-engineering in horticulture: unlocking the neglected potential for crop improvement. **Horticulture Research**, v. 7, n. 36, Mar. 2020.

LI, S.; LIU, S.; LIU, Y.; LU, H.; TAN, Y.; HUANG, J.; WEI, P.; SHU, Q. Y. HRM-facilitated rapid identification and genotyping of mutations induced by CRISPR/Cas9 mutagenesis in rice. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 184-191, Apr./June 2018.

LIANG, Z.; CHEN, K.; LI, T.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; ZHAO, Q.; LIU, J.; ZHANG, H.; LIU, C.; RAN, Y.; GAO, C. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. **Nature Communications**, v. 8, article 14261, Jan. 2017.

LIANG, Z.; CHEN, K.; ZHANG, Y.; LIU, J.; YIN, K.; QIU, J. L.; GAO, C. Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 *in vitro* transcripts or ribonucleoproteins. **Nature Protocols**, v. 13, p. 413-430, Mar. 2018.

LIANG, Z.; ZHANG, K.; CHEN, K.; GAO, C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 41, n. 2, p. 63-68, Feb. 2014.

LIEBER, M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. **Annual Review of Biochemistry**, v. 79, p. 181-211, 2010.

- LIU, W.; RUDIS, M. R.; CHEPLICK, M. H.; MILLWOOD, R. J.; YANG, J. P.; ONDZIGHI-ASSOUME, C. A.; MONTGOMERY, G. A.; BURRIS, K. P.; MAZAREI, M.; CHESNUT, J. D.; STEWART, C. N. Lipofection-mediated genome editing using DNA-free delivery of the Cas9/gRNA ribonucleoprotein into plant cells. **Plant Cell Reports**, v. 39, p. 245-257, 2020.
- MA, X.; ZHU Q.; CHEN Y.; LIU Y-G. CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. **Molecular Plant**, v. 9, n. 7, p. 961-974, July 2016.
- MALNOY, M.; VIOLA, R.; JUNG, M. H.; KOO, O. J.; KIM, S.; KIM, J. S.; VELASCO, R.; KANCHISWAMY, C. N. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1904, 2016.
- MALZAHN, A.; LOWDER, L.; QI, Y. Plant genome editing with TALEN and CRISPR. **Cell Bioscience**, v. 7, n. 21, Apr. 2017.
- MAO, C. Z.; ZHENG, L.; ZHOU, Y. M.; WU, H. Y.; XIA, J. B.; LIANG, C. Q.; GUO, X. F.; PENG, W. T.; ZHAO, H.; CAI, W. B.; KIM, S. K.; PARK, K. S.; CAI, D. Q.; QI, X. F. CRISPR/Cas9-mediated efficient and precise targeted integration of donor DNA harboring double cleavage sites in *Xenopus tropicalis*. **The FASEB Journal**, v. Online, Jun. 2018.
- MAO, Z.; BOZZELLA, M.; SELUANOV, A.; GORBUNOVA, V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. **DNA Repair (Amst)**, v. 7, n. 10, p. 1765–1771, Oct. 2008.
- MONTGOMERY, S. B.; GOODE, D. L.; KVIKSTAD, E. et al. The origin, evolution, and functional impact of short insertion-deletion variants identified in 179 human genomes. **Genome Research**, v. 23, n. 5, p. 749–761, May 2013.
- MOSCOU, M. J.; BOGDANOVA, A. J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. **Science**, v. 326, n. 5959, p. 1501, Dec. 2009.
- MUSHTAQ, M.; BHAT J. A.; MIR, Z. A.; SAKINA, A.; ALI, S.; SINGH, A. K.; TYAGI, A.; SALGOTRA, R. K.; DAR, A. A.; BHAT, R. CRISPR/Cas approach: a new way of looking at plant-abiotic interactions. **Journal of Plant Physiology**, v. 224–225, p. 156-162, May/June 2018.
- MUSSOLINO, C.; ALZUBI, J.; FINE, E. J.; MORBITZER, R.; CRADICK, T. J.; LAHAYE, T.; BAO, G.; CATHOMEN, T. TALENs facilitate targeted genome editing in human cells with high specificity and low cytotoxicity. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 10, p. 6762–6773, June 2014.
- NEMUDRYI, A. A.; VALETIDINOVA, K. R.; MEDVEDEV, S. P.; ZAKIAN, S. M. TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: tools of discovery. **Acta Naturae**, v. 6, n. 3, p. 19-40, July 2014.
- NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Genética médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 640 p.
- OTTO, S. P. The evolutionary consequences of polyploidy. **Cell**, v. 131, n. 3, p. 452-462, Nov. 2007.
- PANDIARAJAN, R.; GROVER, A. *In vivo* promoter engineering in plants: are we ready? **Plant Science**, v. 277, p. 132-138, Dec. 2018.
- PÂQUES, F.; DUCHATEAU, P. Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. **Current Gene Therapy**, v. 7, n. 1, p. 49–66, Feb. 2007.

PENG, A.; CHEN, S.; LEI, T.; XU, L.; HE, Y.; WU, L.; YAO, L.; ZOU, X. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 12, p. 1509–1519, Dec. 2017.

RAMIREZ, C. L.; FOLEY, J. E.; WRIGHT, D. A.; MULLER-LERCH, F.; RAHMAN, S. H.; CORNU, T. I.; WINFREY, R. J.; SANDER, J. D.; FU, F.; TOWNSEND, J. A.; CATHOMEN, T.; VOYTAS, D. F.; JOUNG, J. K. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. **Nature Methods**, v. 5, n. 5, p. 374–375, May 2008.

RICHES, L. C.; LYNCH, A. M.; GOODERHAM, N. J. Early events in the mammalian response to DNA double-strand breaks. **Mutagenesis**, v. 23, n. 5, p. 331–339, Sept. 2008.

ROUET, R.; THUMA, B. A.; ROY, M. D. et al. Receptor-mediated delivery of CRISPR-Cas9 endonuclease for cell-type-specific gene editing. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 21, p. 6596–6603, 2018.

SEHN, J. K. Insertions and deletions (Indels). In: KULKARNI, S.; PFEIFER, J. (Ed.). **Clinical genomics**. London: Academic Press, 2015. p. 129–150.

SILVA, E.; IDEKER, T. Transcriptional responses to DNA damage. **DNA Repair (Amst)**, v. 79, p. 40–49, July 2019.

SPENCER, N. Y. **Are you still using CRISPR plasmids? Consider ribonucleoprotein (RNP) instead!** IDT. Disponível em: [https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/are-you-still-using-crispr-plasmids-consider-ribonucleoprotein-\(rnp\)-instead!](https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/are-you-still-using-crispr-plasmids-consider-ribonucleoprotein-(rnp)-instead!). Acesso em: 02 jun. 2020.

STEINERT, J.; SCHIML, S.; PUCHTA, H. Homology-based double-strand break-induced genome engineering in plants. **Plant Cell Reports**, v. 35, n. 7, p. 1429–1438, July 2016.

STRAUSS, B. S. Mechanisms of mutation. In: WEISS, R. E.; REFETOFF, S. (Ed.). **Genetic diagnosis of endocrine disorders**. 2<sup>nd</sup> ed. Amsterdam: Academic Press, 2015. p. 3–18.

SUBBURAJ, S.; CHUNG, S. J.; LEE, C.; RYU, S.-M.; KIM, D. H.; KIM, J.-S.; BAE, S.; LEE, G.-J. Site-directed mutagenesis in *Petunia × hybrida* protoplast system using direct delivery of purified recombinant Cas9 ribonucleoproteins. **Plant Cell Reports**, v. 35, n. 7, p. 1535–1544, July 2016.

SVITASHEV, S.; SCHWARTZ, C.; LENDERTS, B.; YOUNG, J. K.; CIGAN, A. M. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. **Nature Communications**, v. 7, article 13274, Nov. 2016.

TORNEY, F.; TREWYN, B. G.; LIN, V. S.; WANG, K. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. **Nature Nanotechnology**, v. 2, p. 295–300, Apr. 2007.

TORRES, E. M.; WILLIAMS, B. R.; AMON, A. Aneuploidy: cells losing their balance. **Genetics**, v. 179, n. 2, p. 737–746, June 2008.

VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E. L. O sistema biobalístico. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015. p. 89–104.

VOUILLOT, L.; THÉLIE, A.; POLLET, N. Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 5, n. 3, p. 407–415, Mar. 2015.

WALKER, J. R.; CORPINA, R. A.; GOLDBERG, J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. **Nature**, v. 412, n. 6847, p. 607–614, Aug. 2001.

WANG, Y.; CHENG, X.; SHAN, Q.; ZHANG, Y.; LIU, J.; GAO, C.; QIU, J. L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 9, p. 947–951, Sept. 2014.

WILBIE, D.; WALTHER, J.; MASTROBATTISTA, E. Delivery aspects of CRISPR/Cas for in vivo genome editing. **Accounts of Chemical Research**, v. 52, n. 6, p. 1555-1564, Jun. 2019.

WOLABU, T. W.; CONG, L.; PARK, J.-J.; BAO, Q.; CHEN, M.; SUN, J.; XU, B.; GE, Y.; CHAI, M.; LIU, Z.; WANG, Z.-Y. Development of a highly efficient multiplex genome editing system in outcrossing tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*). **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 1063, July 2020.

WOLT, J. D.; WANG, K.; YANG, B. The regulatory status of genome-edited crops. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 2, p. 510–518, Feb. 2016.

WOO, J. W.; KIM, J.; KWON, S. I.; CORVALÁN, C.; CHO, S. W.; KIM, H.; KIM, S.-G.; KIM, S.-T.; CHOE, S.; KIM, J.-S. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. **Nature Biotechnology**, v. 33, p. 1162–1164, Oct. 2015.

XIE, K.; MINKENBERG, B.; YANG, Y. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 11, p. 3570-3575, Mar. 2015.

XIE, K.; YANG, Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. **Molecular Plant**, v. 6, n. 6, p. 1975–1983, Nov. 2013.

YANG, K.; GUO, R.; XU, D. Non-homologous end joining: advances and frontiers. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 48, n. 7, p. 632-640, July 2016.

YOUNG, J.; ZASTROW-HAYES, G.; DESCHAMPS, S. et al. CRISPR-Cas9 editing in maize: systematic evaluation of off-target activity and its relevance in crop improvement. **Scientific Reports**, v. 9, article 6729, Apr. 2019.

YU, C.; ZHANG, Y.; YAO, S.; WEI, Y. A PCR-based protocol for detecting indel mutations induced by TALENs and CRISPR/Cas9 in zebrafish. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, e98282, June 2014.

ZHANG, T.; GAO, Y.; WANG, R.; ZHAO, Y. Production of guide RNAs *in vitro* and *in vivo* for CRISPR using ribozymes and RNA polymerase II promoters. **Bio-Protocol**, v. 7, n. 4, e2148, Feb. 2017.

ZHANG, X.-H.; TEE, L. Y.; WANG, X.-G.; HUANG, Q.-S.; YANG, S.-H. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. **Molecular Therapy Nucleic Acids**, v. 4, e264, 2015.

ZHAO, X.; MENG, Z.; WANG, Y.; CHEN, W.; SUN, C.; CUI, B.; CUI, J.; YU, M.; ZENG, Z.; GUO, S.; LUO, D.; CHENG, J. Q.; ZHANG, R.; CUI, H. Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers. **Nature Plants**, v. 3, p. 956-964, Nov. 2017.

ZHU, X.; XU, Y.; YU, S.; LU, L.; DING, M.; CHENG, J.; SONG, G.; GAO, X.; YAO, L.; FAN, D.; MENG, S.; ZHANG, X.; HU, S.; TIAN, Y. An efficient genotyping method for genome-modified animals and human cells generated with CRISPR/Cas9 system. **Scientific Reports**, v. 4, n. 6420, Sept. 2014.

ZURIS, J. A.; THOMPSON, D. B.; SHU, Y.; GUILINGER, J. P.; BESSEN, J. L.; HU, J. H.; MAEDER, M. L.; JOUNG, J. K.; CHEN, Z. Y.; LIU, D. R. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 73-80, Jan. 2015.

# Edição de genoma por CRISPR/Cas via recombinação homóloga

Nathalia Volpi e Silva  
Jéssika Angelotti-Mendonça  
Elton Gargjoni Grisoste Barbosa  
Larissa Giroto  
Mayla Daiane Correa Molinari  
Liliane Marcia Mertz-Henning  
Alexandre Lima Nepomuceno

## Introdução

Ao longo do desenvolvimento celular, o DNA pode sofrer danos que ameaçam a integridade do genoma e a sobrevivência das células. A quebra da dupla fita de DNA (em inglês, *Double-Strand Break*, DSB) é uma das mais sérias lesões que o DNA pode sofrer. Essa quebra pode ocorrer naturalmente durante o metabolismo celular ou ser desencadeada por fatores externos (Deriano; Roth, 2013). Após sua quebra, o reparo da dupla-fita de DNA ocorre principalmente por meio de duas vias: a união de extremidades não homólogas (em inglês, *Non-Homologous End Joining*, NHEJ) ou o reparo direcionado por homologia (em inglês, *Homology-Directed Repair*, HDR). Diferentemente do reparo via NHEJ, no qual ocorre apenas a união das extremidades do DNA clivado (ver Capítulo 2), a via de reparo por HDR exige a presença de uma fita-molde para que o reparo seja realizado (Heyer et al., 2010). A presença dessa fita-molde representa o elemento-chave para a edição gênica via recombinação homóloga (em inglês, *Homologous Recombination*, HR), que pode ser uma entre várias técnicas inovadoras de melhoramento de precisão (TIMPs).

Naturalmente, o HDR ocorre com a utilização, como molde, da fita de DNA da cromátide-irmã da sequência danificada. Porém, desde que haja homologia com as regiões que flanqueiam o local onde ocorreu a clivagem do DNA, é possível fornecer qualquer sequência como molde. Dessa forma, o sistema de reparo utiliza uma fita exógena como molde em vez da cromátide-irmã, levando à modificação genômica via HDR, conhecida como *gene targeting* (GT) (Paszkowski et al., 1988; Voytas, 2013; Puchta; Fauser, 2013). Essa forma de reparo é menos propensa ao erro em relação à NHEJ, uma vez que copia de forma exata no genoma a sequência de DNA fornecida na fita-molde (Puchta, 2005). A edição gênica via HDR tem sido utilizada para promover inserções no DNA, por meio da adição de novas sequências no genoma; da troca de bases específicas para promover alterações pontuais na sequência de nucleotídeos e, conseqüentemente, de aminoácidos; e da substituição de sequên-

cias por meio da deleção seguida de inserção da sequência de interesse (Huang; Puchta, 2019).

Para isso, as DSBs podem ser induzidas com o uso de ferramentas que utilizam nucleases de origem exógena, como os sistemas baseados em *Zinc Finger nucleases* (ZFNs), *Transcription Activator-like Effector nucleases* (TALENs) e *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR). Essa indução da DSB com base no uso de nucleases é primordial para a aplicação de técnicas de edição de genomas como CRISPR. A importância da DSB para as técnicas de edição gênica foi primeiramente demonstrada em milho (Athma; Peterson, 1991; Lowe et al., 1992), porém os autores nem imaginavam a sua aplicação atual. Na época, eles observaram que a DSB induziu a recombinação homóloga a partir de estudos com elementos transponíveis. Esse estudo foi posteriormente replicado com uma endonuclease em tabaco (*I-SceI*), em que os autores puderam observar o aumento da frequência de HDR em até 100 vezes devido à indução de DSBs (Puchta et., 1996). Dessa forma, podemos intencionalmente explorar o mecanismo de reparo de DNA via HDR, induzindo quebras direcionadas da dupla fita de DNA por meio de nucleases.

Apesar do grande potencial da GT na Biotecnologia, seu uso ainda é limitado devido à baixa frequência em que o HDR ocorre em células somáticas, um evento a cada 10 mil (Puchta, 2005). Um dos fatores que justificam essa baixa frequência se deve ao fato de o reparo do DNA em células somáticas acontecer majoritariamente via NHEJ, pois este mecanismo transcorre em todas as etapas do ciclo celular. Diferentemente, o HDR ocorre apenas durante as fases S e G2 da intérfase, quando sequências homólogas de DNA (cromátides-irmãs) estão disponíveis para serem usadas como modelo para o reparo (Tamura et al., 2002). Dessa forma, algumas abordagens para o aumento da frequência de HDR têm sido desenvolvidas. Como exemplo, algumas técnicas buscam aumentar a disponibilidade de fita-molde de DNA com utilização de replicons virais, favorecendo a via HDR devido à grande disponibilidade de fitas para o reparo (Baltes et al., 2014). Por outro lado, outras estratégias buscam a superexpressão de genes envolvidos no HDR ou o silenciamento de genes envolvidos na via NHEJ, consequentemente aumentando a frequência relativa de edição por HDR (Shaked et al., 2005; Qi et al., 2013; Endo et al., 2016).

Neste capítulo, descreveremos como implementar uma estratégia de edição gênica via HR por CRISPR, abordando desde o funcionamento geral do mecanismo, passando por exemplos práticos de edições e pelas estratégias a serem consideradas antes de iniciar um projeto, até finalmente dar um direcionamento prático de como executar o experimento visando obter a edição gênica.

## Quebra da dupla fita de DNA e reparo via HR

Para entendermos melhor como funciona a técnica de GT, é importante explicar como funciona o sistema de reparo via HR. Em eucariotos, o sistema de reparo do DNA é ativado após a ocorrência da DSB. Em seguida, devido à ocorrência de alterações estruturais da cromatina, uma série de complexos é recrutada nessa região, culminando na paralisação do ciclo celular (em inglês, *cell cycle arrest*) (Kastan; Bartek, 2004). A fase do ciclo celular em que essa paralisação ocorre é crucial para determinar qual via o sistema de reparo irá priorizar. A presença de determinadas proteínas é crucial nesse processo, e a paralisação nas fases S ou G2 favorece a ocorrência do HDR (Vu et al., 2019). Em animais, existem dois complexos proteicos (complexos KU70/80 e DNA-PK) que levam à paralisação nas fases S/G2. Entretanto, nas células vegetais apenas um desses complexos (complexo KU) está presente, o que pode contribuir para a baixa frequência desse tipo de reparo em plantas (West et al., 2002).

Após a paralisação do ciclo celular, assim que todas as condições ideais para que o HDR esteja estabelecido, incluindo a presença de uma fita-molde de DNA, diferentes mecanismos de HDR podem ocorrer em células eucarióticas, como: a conversão gênica ou anelamento de fita dependente de síntese (em inglês, *Synthesis-Dependent Strand Annealing*, SDSA); o anelamento de fita simples (em inglês, *Single-Stranded Annealing*, SSA); ou o *crossing-over/noncrossing-over* via formação de junção dupla de Holliday (em inglês, *double Holliday junction*, dHj). Porém, apenas a recombinação homóloga via SDSA, principal via de HDR em células somáticas de plantas, pode gerar produtos com sequências precisas, que é o objetivo da edição gênica via CRISPR (Szostak et al., 1983; Puchta et al., 1996)

O mecanismo via HDR pode ser conceitualmente dividido em três fases: pré-sinapse, sinapse e pós-sinapse (Heyer et al., 2010). Durante a pré-sinapse, ocorre a ligação de um complexo heterotrimérico (MRN; revisado em Manova; Gruska, 2015) às extremidades livres do DNA (Figura 1A). Em seguida, as extremidades clivadas da dupla-fita sofrem uma ressecção por nucleases, que digerem o DNA no sentido 5'-3', deixando as extremidades 3' em fita simples (em inglês, *single-stranded DNA*, ssDNA). O DNA danificado é então reestruturado para formar o complexo ssDNA-RPA, a partir da ligação de uma proteína de replicação (*replication protein A*, RPA) ao ssDNA (Figura 1B). Em seguida, o complexo ssDNA-RPA recruta a proteína RAD51, assim formando filamentos nucleoproteicos ou filamentos pré-sinápticos (Figura 1C). Na fase de sinapse, esses filamentos da RAD51 fazem a busca pela sequência homóloga (cromátide-irmã ou DNA doador exógeno) e, ao encontrarem-na, ocorre a invasão da fita-molde pelo complexo ssDNA-RAD51, que se anela à

fita-molde formando um *loop* de deslocamento (em inglês, *Displacement loop*, D-loop) (Figura 1D). Por fim, na fase pós-sináptica, a síntese de DNA-molde dependente é processada (Figura 1E) (Puchta, 1998; Puchta, 2005; Heyer et al., 2010; Renkawitz et al., 2014). Nesse caso, após a formação do D-loop, o reparo por SDSA ocorre devido à atividade de iniciador/*primer* da extremidade 3' do ssDNA, iniciando o processo de polimerização do DNA (*primer*) para replicação da sequência presente na fita-molde do DNA doador (Puchta, 1998).

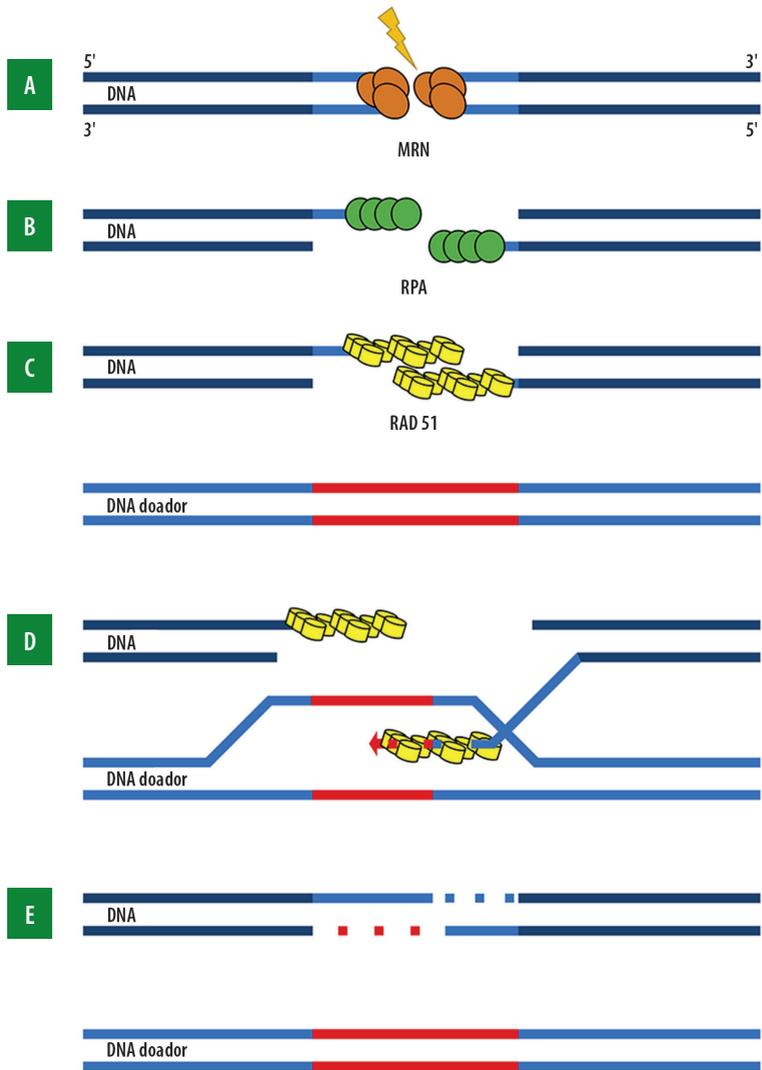
Apesar de o reparo por SDSA ser predominante, o DNA de células somáticas também pode ser reparado via SSA. Isso ocorre se houver uma ressecção estendida, e neste caso outra recombinase (RAD52) irá facilitar o desacoplamento da RPA, direcionando o sistema de reparo para a via SSA (Renkawitz et al., 2014). As estratégias de edição gênica por CRISPR via HR descritas neste capítulo consideram o reparo do DNA pelo mecanismo de SDSA, pois, como mencionamos, é a única que irá editar a região de interesse com precisão (Puchta, 2005).

## Aplicações e exemplos práticos

O entendimento a respeito do mecanismo de reparo via SDSA é um ponto-chave para o avanço de tecnologias que buscam aumentar a eficiência de GT em eucariotos. Pelo fato de sua aplicação na edição de genoma ser uma tecnologia relativamente nova, o seu aperfeiçoamento tem potencial para revolucionar a área de melhoramento genético de plantas. Isso se deve à capacidade dessa técnica de edição promover mudanças altamente precisas e específicas no genoma-alvo. Neste tópico, descreveremos exemplos de estudos que demonstram a aplicação da GT em espécies de interesse agrônomo, como arroz (Butt et al., 2017; Wang et al., 2017; Li et al., 2019), milho (SHI et al., 2017) e tomate (Vu et al., 2019).

A edição de genomas por CRISPR via HR pode ser usada para atingir diversos objetivos, como promover deleções, inserções e troca de sequências de fragmentos pequenos ou até de genes inteiros (Gil-Humanes et al., 2017; Shi et al., 2017; Wang et al., 2017; Au et al., 2019; Huang et al., 2019; Li et al., 2019; Vu et al., 2020; Weisheit et al., 2020). Em arroz, objetivando validar a estratégia para inserção de sequências codificadoras (CDS), Wang et al. (2017) inseriram o gene *gfp*, que codifica a proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) em células de arroz. Para isso, foi utilizado o sistema de edição de genoma CRISPR/Cas9 associado à estratégia de entrega de DNA doador em vetores de geminivírus (*Wheat Dwarf Virus*, WDV). Dois loci foram selecionados como alvos de inserção: *actina 1* (*ACT1*) e *glutathiona S-transferase* (*GST*). Dessa forma, a CDS da GFP foi inserida nos genes-alvo e, como resultado, foram formadas as proteínas ACT1-GFP e GST-GFP. As plantas transgênicas, chamadas de

WDV2-ACT1-SG1 e WDV2-GST-SG2, incorporaram o cassete de expressão com eficiências de 19,4% e 7,7%, respectivamente.



**Figura 1.** Mecanismos de reparo via HR por SDSA. A) O reparo por HDR se inicia com a ligação de um complexo heterotrimérico (MRN) na dupla fita de DNA danificada. B) Proteínas de replicação (RPA) se ligam ao DNA após sua ressecção e minimizam a formação de estruturas secundárias para facilitar o acoplamento da recombinase RAD51. C) A RAD51 forma o filamento pré-sináptico na ssDNA, que, na presença de um DNA doador, faz a busca por homologia. D) Os filamentos identificam a sequência homóloga, formando o D-loop, e a síntese do DNA se inicia a partir da extremidade 3' da fita-molde. E) A polimerização do DNA ocorre no sentido 5'-3', e a extremidade 3' da fita-molde atua como um iniciador desse processo; após o reparo, ocorre a união das extremidades do DNA e a fita é reparada sem a perda de informação genética.

Fonte: adaptado de Renkawitz et al. (2014).

Também realizando a edição gênica por CRISPR via HR em arroz, os trabalhos de Butt et al. (2017) e de Li et al. (2019) utilizaram RNA como fita doadora. Em ambos os trabalhos, foram geradas, com sucesso, plantas de arroz tolerantes aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase (ALS). No primeiro estudo, foi adicionada a sequência do RNA guia (gRNA) juntamente com a sequência do RNA doador. Já no segundo estudo, os autores testaram duas estratégias, uma na qual adicionaram ribozimas flanqueando a fita-alvo e outra na qual exploraram a atividade de exonuclease da Cas12a. Dessa forma, ambos os trabalhos conseguiram viabilizar a utilização de RNA como fita-molde para GT.

O uso da estratégia de edição por CRISPR via HR também foi utilizada na geração de genótipos de milho com tolerância à seca tanto por meio da inserção quanto pela substituição da região promotora do gene *Auxin regulated gene involved in organ size (ARGOS8)*, uma vez que a expressão constitutiva desse gene aumenta o rendimento de grãos no milho sob condições de estresse hídrico (Shi et al., 2015). Dessa forma, os autores utilizaram a ferramenta CRISPR/Cas para gerar novas variantes do promotor *ARGOS8*, levando a um aumento na atividade transcricional do gene (Shi et al., 2017). Duas estratégias foram utilizadas: na primeira, o promotor constitutivo *GOS2* de milho foi inserido, com 3% de eficiência, na região 5'-UTR do promotor nativo do gene *ARGOS8* e, na segunda, o promotor *GOS2* foi utilizado para substituir inteiramente o promotor nativo do gene *ARGOS8*, com eficiência de 1%. Os eventos *ARGOS8* gerados aumentaram o rendimento de grãos sob condições de estresse. Esses resultados são semelhantes aos resultados anteriores obtidos com plantas transgênicas superexpressando *ARGOS8* (Shi et al., 2015). Mas nesse estudo, os autores mostraram como a ferramenta de edição de genoma via CRISPR pode ser usada para criação de variabilidade genética objetivando o desenvolvimento de cultivares tolerantes à seca (Shi et al., 2017).

A geração de variabilidade gênica para tolerância a estresses via edição de genoma também foi obtida por Vu et al. (2020) em plantas de tomate. Os autores demonstraram a aplicabilidade da edição por CRISPR via HR também utilizando vetores baseados em replicon do geminívirus *Bean yellow dwarf virus (BeYDV)*, com o intuito de obter plantas de tomate com tolerância ao estresse osmótico. Para isso, foram definidos como alvo os genes das proteínas transportadoras de potássio ( $K^+$ ) de alta afinidade 1 e 2 (*HKT1* e *HKT2*), que desempenham papel importante na manutenção da captação de  $K^+$  sob estresse salino. Assim, foi induzida uma mutação (N217D) nos genes *HKT1* e *HKT2* de tomate, por meio de uma construção livre de marcadores de seleção. As plantas editadas mostraram estabilidade de herança da mutação e tolerância à salinidade na presença de 100 mM de NaCl durante a germinação. Apesar da baixa eficiência de mutação obtida (0,66%), a estratégia utilizada

se mostrou promissora ao utilizar um sistema livre de marcadores de seleção na edição de genoma em tomate (Vu et al., 2020).

Além da estratégia de mutações pontuais, Hayut et al. (2017) utilizaram o sistema CRISPR/Cas9 para induzir recombinação homóloga de cromossomos de forma específica. O trabalho mostrou grande potencial para uso no melhoramento de plantas, tendo em vista que valida o uso de uma ferramenta que permite induzir *crossing-over* de forma direcionada. O gene-alvo foi o *phytoene synthase (PSY1)*, envolvido na biossíntese de carotenoides em tomate. O alelo *yellow fresh* possui um códon de parada prematuro, e sua ocorrência resulta em frutos amarelos, enquanto outro alelo, o *yellow fresh bicolor locus r*, possui uma deleção de aproximadamente 3,7 Kb na região promotora, que promove a geração de frutos com fenótipo vermelho-amarelado. Com isso, foram produzidas duas linhagens de plantas transgênicas. As plantas da linhagem *yellow fresh* foram transformadas com um cassete de transformação contendo o gene da nuclease Cas9 com expressão dirigida pelo promotor CaMV 35S, e as plantas da linhagem *yellow fresh Bicolor* foram transformadas com o cassete de expressão contendo um gRNA tendo como alvo o gene *PSY*, com transcrição dirigida pelo promotor U6-26 e capaz de causar mutações em ambos os alelos. As plantas foram submetidas a cruzamento e era esperado que a ocorrência de reparo via HR gerasse plantas vermelhas ou com pontos vermelhos. No entanto, os fenótipos das plantas geradas foram bicolores, amarelas e amarelas com pontos vermelhos, diferentemente das plantas controle, as quais apresentaram fenótipo amarelo. Esses resultados apontam que as nucleases Cas podem ser usadas para o rearranjo preciso de segmentos cromossômicos entre cromossomos homólogos em células somáticas (Hayut et al., 2017).

Os exemplos citados acima mostram algumas das muitas possibilidades de aplicabilidade do GT em plantas. Nos próximos tópicos abordaremos as vantagens e limitações da técnica e as principais estratégias que têm sido utilizadas a fim de otimizá-las.

## Fatores que afetam a HR: o que levar em conta antes de começar?

Ao optar por fazer a edição de genoma via HDR, deve-se levar em conta suas limitações e adotar estratégias para superá-las. A maior limitação da edição via HDR é sua baixa eficiência, e isso ocorre devido a dois fatores: a competição entre os sistemas de reparo NHEJ e HDR quando ocorre a quebra da dupla fita de DNA; e a disponibilidade de fita-molde a ser usada na HR. Nesse sentido, algumas estratégias

podem ser utilizadas, como a escolha da nuclease, promotor, o desenho adequado do gRNA e como ocorrerá a entrega da fita-molde doadora (Ran et al., 2013; Yang et al., 2013; Baltes et al., 2014; Wolter; Puchta, 2019; Vu et al., 2020).

## Tipos de nucleases e recomendações de uso para HR

Para a edição de genoma via CRISPR, duas nucleases são comumente utilizadas, a Cas9 e a Cas12a (previamente denominada Cpf1). A nuclease Cas9 tem sido utilizada na maioria dos estudos, uma vez que foi a primeira enzima a ser descrita como ferramenta para a edição gênica (Ran et al., 2013). Essa nuclease vem sendo utilizada na geração de plantas editadas por GT em espécies como *Arabidopsis thaliana* (Hahn et al., 2018), tomate (Dahan-Meir et al., 2018; Čermák et al., 2015), arroz (Butt et al., 2017) e milho (Shi et al., 2017). Apesar de sua utilização ampla, o corte abrupto do DNA criado pela nuclease Cas9 impõe algumas limitações quanto à eficiência de HDR (Huang; Puchta 2019; Zetsche et al., 2015; Swarts; Jinek, 2018), uma vez que a formação de extremidades de DNA fita simples geradas por cortes coesivos é mais favorável à ocorrência de reparo via HR, em detrimento da via NHEJ. Para que ocorra o HDR, é necessário que a extremidade 3' de uma das fitas de DNA que sofreram clivagem invada o DNA doador (Zetsche et al., 2015). Essa extremidade fita simples precisa ser longa o suficiente para permitir o anelamento com a sequência homóloga. Após o anelamento, essa extremidade fita simples atua como um *primer*/iniciador para dar início à polimerização do DNA e, conseqüentemente, ao reparo da dupla fita (Puchta, 1998; Huang; Puchta, 2019).

Outro fator que torna o uso da nuclease Cas12a favorável à HR, em detrimento da Cas9, é o local da clivagem, que ocorre distante da região PAM, cerca de 23 nucleotídeos distante na fita não alvo e a 18 nucleotídeos de distância na fita-alvo, permitindo a conservação da PAM após a DSB (Zetsche et al., 2015). Dessa forma, a PAM é mantida até que o reparo utilizando a sequência de fita doador como molde aconteça (Huang; Puchta, 2019). Por outro lado, diferente da Cas12a, a nuclease Cas9 cria um DSB de apenas 3-4 nucleotídeos da PAM, que pode levar a geração de *indels* na região *seed* do gRNA, fazendo com que esse local-alvo deixe de ser reconhecido, inviabilizando outra edição nesse ponto (Swarts; Jinek, 2018). Uma terceira vantagem do uso da Cas12a como nuclease é o tamanho do gRNA, que é menor do que o usado pela nuclease Cas9. O gRNA maduro da nuclease Cas12a possui cerca de 43 nucleotídeos. Os 19 nucleotídeos da extremidade 5' compõem o segmento *directed repeated* altamente conservado, e os ~24 restantes compõem o segmento *spacer-derived*, uma sequência variável que é utilizada para direcionar o corte da nuclease. Por fim, a nuclease Cas12a dispensa o *transactivating* crRNA

(tracrRNA) e o processamento do gRNA, essenciais para a atividade da Cas9 (Zetsche et al., 2015; Swarts; Jinek, 2018).

Apesar de todas as vantagens de uso da nuclease Cas12a para edição via HDR, essa enzima apresenta limitações térmicas para uso, pois é mais sensível a alterações de temperatura do que a Cas9 (Schindele; Puchta, 2019). Entre as 16 famílias de Cas12a, as três mais utilizadas para edição de genomas são as derivadas de *Francisella novicida* (FnCas12a), *Lachnospiraceae bacterium* ND2006 (Lb/Cas12a) e *Acidaminococcus* sp. BV3L6 (AsCas12a), cuja sensibilidade à alteração de temperatura é variável, e a AsCas12a é a mais sensível (Moreno-Mateos et al., 2017; Malzahn et al., 2019; Schindele; Puchta, 2019). Buscando verificar o efeito da temperatura na atividade nuclease das enzimas Cas12a, Moreno-Mateos et al. (2017) observaram que a atividade de nuclease da enzima AsCas12a em *Danio rerio* a 28 °C era praticamente nula, mas aumenta proporcionalmente até que se chegue à temperatura ótima de 37 °C. Os autores concluíram que essa melhora na atividade de AsCas12a se deve ao fato de o aumento da temperatura reduzir o enovelamento da cromatina, facilitando o acesso da nuclease ao DNA (Moreno-Mateos et al., 2017). Essa exigência de altas temperaturas para sua atividade tem limitado o uso de AsCas12a na edição de plantas, uma vez que, durante o processo de transformação e regeneração das plantas, estas são submetidas usualmente a temperaturas entre 20 °C e 25 °C (Malzahn et al., 2019).

Por outro lado, as nucleases FnCas12a e LbCas12a têm apresentado menor sensibilidade a variações de temperatura, mostrando-se promissoras para uso na edição de genoma de plantas, sendo a nuclease LbCas12a mais comumente utilizada devido à sua maior eficiência de edição (Endo et al., 2016; Malzahn et al., 2019; Schindele; Puchta, 2019). Malzahn et al. (2019) mostraram que as nucleases AsCas12a, FnCas12a e LbCas12a apresentam variações na sensibilidade à temperatura de acordo com a espécie estudada. Em arroz, as três nucleases apresentaram atividade crescente em função do aumento da temperatura, sendo a atividade ótima encontrada a partir de 28 °C. Porém, com o incremento de temperatura a níveis superiores a 32 °C, a atividade das nucleases foi reduzida. Em transformação estável de *Arabidopsis*, cuja temperatura de cultivo é de aproximadamente 22 °C, foi possível observar atividade de nuclease da enzima LbCas12a apenas a 29 °C, enquanto a atividade da enzima AsCas12a não foi detectada em nenhuma das temperaturas utilizadas (Malzahn et al., 2019). Essas observações evidenciam que o uso das nucleases AsCas12a e LbCas12a em *A. thaliana* é inviável, sendo recomendado o uso da nuclease Cas9 (Malzahn et al., 2019).

Apesar de a temperatura ótima para atividade nuclease das Cas12a ser uma limitação para algumas espécies, em outros casos o estresse térmico moderado

conferido pelo uso de temperaturas mais elevadas pode aumentar a eficiência da recombinação homóloga, uma vez que o desenvolvimento das plantas em condições subótimas de temperatura induz a recombinação intracromossomal (Boyko et al., 2005). Além disso, temperaturas mais elevadas podem aumentar o acesso da nuclease ao DNA (Moreno-Mateos et al., 2017). Pensando nessas vantagens, Vu et al. (2020) testaram o efeito da temperatura na eficiência de HR em tomate utilizando a nuclease LbCas12a. Os autores observaram que um estresse térmico moderado de 31 °C por 10 dias foi suficiente para aumentar a eficiência da HR e não prejudicar a regeneração das plantas.

## Ocorrência via HDR

Além de fatores como escolha da nuclease e temperatura de cultivo da planta, para a definição da estratégia de edição gênica, é importante levar em conta que a ocorrência de HDR nas células está condicionada a dois fatores principais: a presença de DSB durante as fases S e G2 do ciclo celular e a disponibilidade de fita doadora. Esta pode ser a cromátide-irmã ou uma outra fita-molde inserida no núcleo da célula (Puchta et al., 1996; Baltes et al., 2014; Vu et al., 2020). Dessa forma, esses fatores devem ser analisados na adoção de estratégias para melhorar a eficiência da edição por HR.

Com o objetivo de favorecer a ocorrência de HDR, estudos têm sido realizados buscando-se bloquear a atividade de enzimas-chave do mecanismo de reparo por NHEJ. Em mutantes de *A. thaliana* nos quais proteínas Ku70 e Lig4, que estão diretamente envolvidas no reparo por NHEJ, foram silenciadas, a eficiência da edição por HR aumentou em 19 vezes (Qi et al., 2013). De modo similar, a edição de mutantes de arroz livres da proteína Lig4 via CRISPR mostrou um incremento na eficiência da edição por HR em comparação a plantas não mutantes editadas (Endo et al., 2016). Esses trabalhos mostraram que a manipulação da via de reparo pode ser uma alternativa para o aumento da eficiência da edição por HR. Por outro lado, o silenciamento de genes *FAS1* e *FAS2* responsáveis pelo maior enovelamento da cromatina também foi testado como forma de aumentar a eficiência da HR. Nesse caso, nos mutantes de *A. thaliana*, observou-se um aumento na frequência de HR em células somáticas de até 40 vezes (Endo et al., 2006). Porém, existem alternativas de incremento de eficiência de edição que não envolvem mais de uma etapa de transformação, como a aplicação de estresse térmico moderado nos explantes, o uso de nucleases com corte coesivo, como a Cas12a, e o fornecimento de muitas cópias de fita-molde.

Como mencionado, a disponibilidade de uma fita homóloga ao DNA danificado é essencial para que ocorra HDR. Porém, uma das grandes limitações do uso do GT está relacionada com a eficiência de entrega da fita-molde para ser utilizado durante o reparo. Atualmente, existem algumas alternativas de entrega da fita-molde que podem ser utilizadas para potencializar o número de moléculas disponíveis no momento da HR e, conseqüentemente, aumentar a eficiência de edição.

## Estratégias de entrega da fita-molde

Atualmente, existem diferentes tipos de fita-molde que podem ser utilizados para a edição de genoma por CRISPR via HR, desde ssDNA, dsDNA (Baltes et al., 2014; Shi et al., 2017) e até mesmo RNA (Butt et al., 2017; Li et al., 2019). Por exemplo, Li et al. (2019), visando a geração de plantas de arroz resistentes a herbicidas inibidores de ALS geradas por meio de edição gênica, realizaram a entrega da fita doadora na forma de RNA mensageiro, aproveitando a atividade exonuclease da Cas12a. No caso de fitas doadoras do tipo ssDNA, oligos de fita simples são recomendados em caso de edições de regiões menores que 50 pb (Ran et al., 2013). O uso de ssDNA não tem sido muito reportado para a edição de genomas de plantas, sendo mais aplicado em células animais (Bai et al., 2020). Por outro lado, a utilização de dsDNA foi realizada com sucesso na edição de genomas de plantas, principalmente na forma de plasmídeo (Shi et al., 2017; Hahn et al., 2018; Hayut et al., 2017; Schiml et al., 2014; Svitashv et al., 2015).

De forma geral, para o desenvolvimento de plantas editadas utilizando o sistema CRISPR/Cas via HR, os componentes do sistema de edição podem ser entregues para a planta tanto via agrobactéria, quanto via bombardeamento de partículas, na forma de vetor de transformação para integração no genoma ou pela técnica de partículas ribonucleoproteicas (RNP; ver Capítulo 2). A entrega de fita-molde na forma de dsDNA foi realizada com sucesso na forma de plasmídeo via bombardeamento de partículas, sendo entregues, no momento da transformação, um plasmídeo contendo o vetor de transformação para expressão da nuclease e do gRNA e outro para atuar como molde (Shi et al., 2017; Hahn et al., 2018). Utilizando esta estratégia, Shi et al. (2017) fizeram com sucesso a troca do promotor do gene *ARGOS8* em milho, e Hahn et al. (2018) reestabeleceram a formação de tricomas em mutantes glabros de *A. thaliana*.

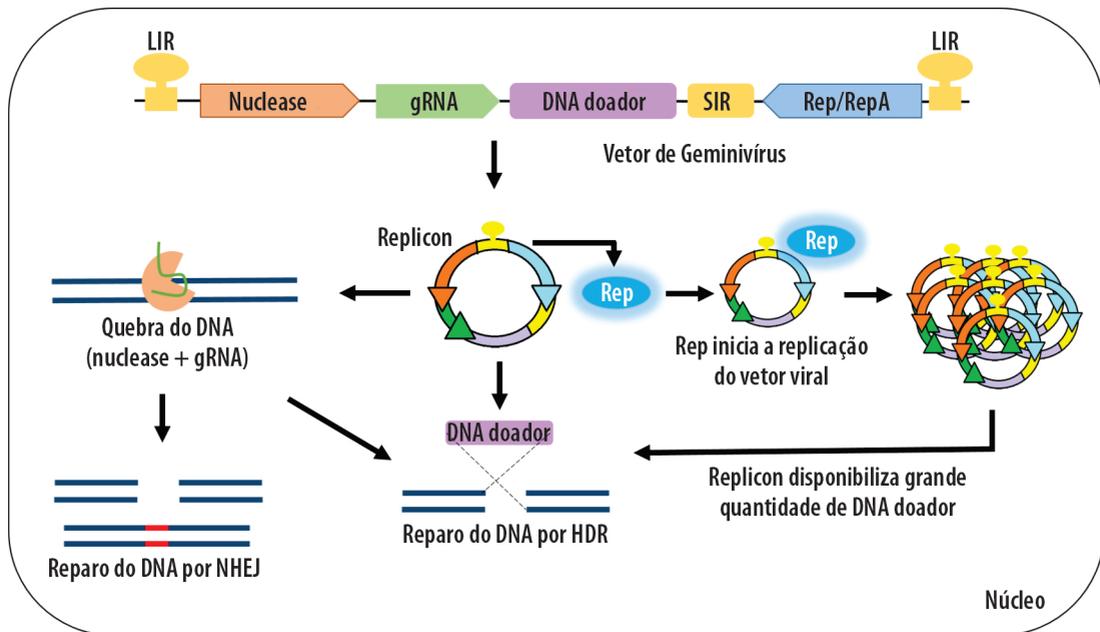
Entre as estratégias que se baseiam majoritariamente em transformação de plantas, a desenvolvida por Baltes et al. (2014) tem ganhado destaque para edição de genoma visando HR por aumentar significativamente a quantidade de fita doadora disponível durante o reparo do DNA, favorecendo a via HDR. Os autores

desenvolveram um vetor baseado em replicon de geminivírus (GVR) para entrega da fita-molde. Essa estratégia é baseada na forma de infecção viral do vírus da família *Geminiviridae*. Esse vírus é constituído de ssDNA, com genoma de aproximadamente 2,8 Kb contendo as ORFs (*Open Reading Frames*) que codificam as proteínas responsáveis pela replicação do vírus; e também das proteínas da capa viral, responsáveis pela distribuição do vírus dentro do hospedeiro (Zaidi; Mansoor, 2017).

Para o uso desses vetores baseados em replicons de GVR, as sequências responsáveis pela proteína do capsídeo viral (CP, do inglês *coat protein*) e pelas proteínas de movimento (MP, do inglês *movement protein*) são deletadas, de modo a permitir a inserção da sequência de interesse. Uma vez dentro das células do hospedeiro, o replicon de geminivírus (ssDNA) é convertido em fita dupla por polimerases intracelulares, e esse genoma fita dupla é utilizado para a transcrição e tradução das proteínas responsáveis pela formação de novos GVRs. Para que ocorra a formação do GVR, são necessárias duas proteínas de replicação (Rep e RepA), codificadas pela mesma sequência genômica. As proteínas Rep/RepA identificam duas regiões repetidas desse dsDNA viral, denominadas LIR (*Large Intergenic Region*), que flanqueiam as sequências que compõem o replicon. Além disso, para a formação do replicon viral circular, é necessária também a presença da sequência SIR (*Short Intergenic Region*), localizada entre as sequências LIR (Baltes et al., 2014). Após a formação do replicon circular, as proteínas Rep/RepA atuam amplificando o número de cópias desse replicon. Há relatos de que se pode aumentar em até 80 vezes o nível de expressão de proteínas exógenas em plantas, em comparação ao uso de plasmídeos convencionais (Zhang; Mason, 2006; Baltes et al., 2014). O mecanismo de ação de GVR é esquematizado na Figura 2.

Além do fornecimento de um grande número de cópias de DNA doador, o uso de geminivírus na edição de genomas apresenta outras vantagens (Baltes et al., 2014; Zaidi; Mansoor, 2017):

- 1) Os geminivírus são capazes de infectar uma grande variedade de espécies vegetais, o que os torna potenciais vetores para a edição de uma ampla gama de vegetais.
- 2) Necessitam apenas das proteínas Rep/RepA para iniciar a replicação dentro das células hospedeiras, e essa replicação pode ser expressa por meio de seu promotor nativo de geminivírus, ou engenheirado com um promotor de interesse.



**Figura 2.** Mecanismo de ação do vetor de geminivírus para entrega de componentes necessários na edição de genomas de plantas via CRISPR. Uma vez no núcleo da célula, e após a tradução das proteínas Rep/RepA, toda a sequência presente entre as duas LIR dará origem ao replicon de geminivírus, por meio da circularização do DNA. O replicon circular é então amplificado pelas proteínas Rep/RepA, tornando disponível grande número de cópias das sequências que o compõe, nesse caso de nuclease, gRNA e de DNA doador. Após a quebra do DNA induzida pelo complexo nuclease+gRNA, o DNA pode ser reparado via NHEJ ou HDR, usando o DNA doador como molde. LIR - Large Intergenic Region; SIR – Short Intergenic Region; Rep/RepA – proteínas de replicação.

Fonte: adaptado de Zaidi e Mansoor (2017).

- 3) O replicon viral se multiplica dentro da célula via replicação dependente de HR, ou seja, induz as células a saírem do estado de repouso e passarem para a fase S e G2 do ciclo celular.
- 4) O número de cópias do replicon viral é eficientemente aumentado, permitindo que se tenha uma grande quantidade de DNA doador disponível no momento do HDR, o que tem potencial de aumentar a eficiência da edição por HR.

Diversos trabalhos têm sido realizados utilizando GVR nas mais diversificadas espécies. Em dicotiledôneas, é comum o uso de vetores baseados no vírus *Bean Yellow Dwarf Virus* (BeYDV) (Čermák et al., 2015; Butler et al., 2016; Dahan-Meir et al., 2018; Vu et al., 2020). Já em monocotiledôneas, o vetor baseado na sequência do vírus *Wheat Dwarf Virus* (WDV) é o mais utilizado (Wang et al., 2017; Vu et al., 2019). Čermák et al. (2015) utilizaram um vetor baseado em replicon de BeYDV para

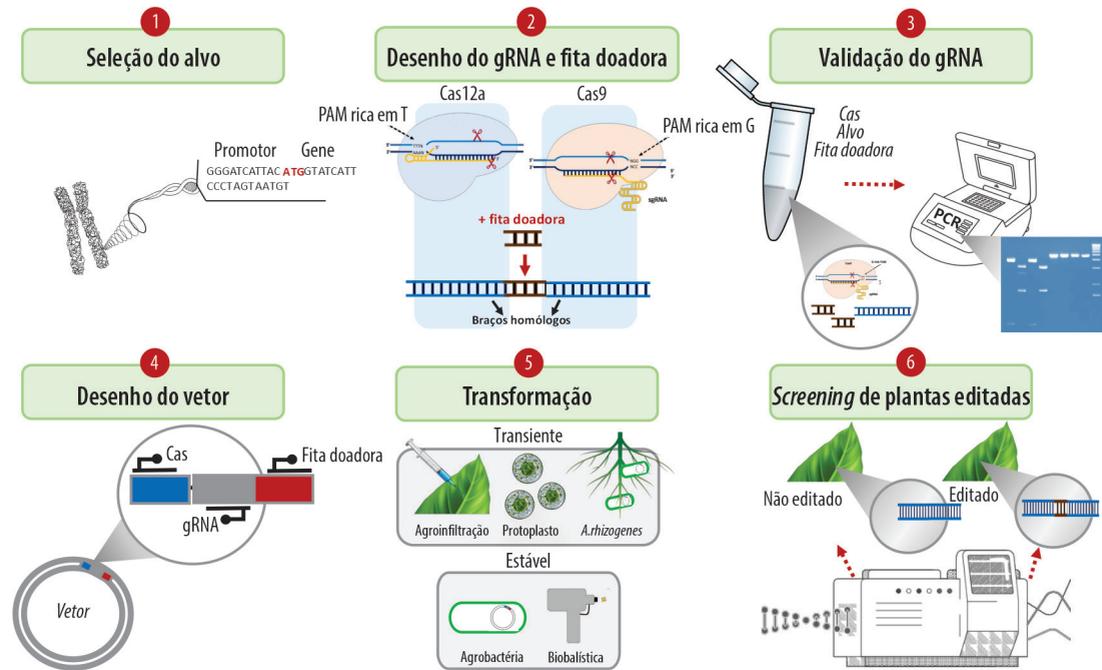
obter plantas de tomate capazes de acumular grande quantidade do pigmento antocianina, obtendo eficiências de HR 10 vezes maiores que as obtidas utilizando T-DNA convencional para entrega dos componentes necessários à edição. De forma semelhante, o uso de alvos que permitam a seleção visual de plantas editadas, dispensando o uso de agentes seletivos no processo de regeneração das plantas, tem sido comum. Por exemplo, Dahan-Meir et al. (2018) buscaram substituir o gene *carotenoid isomerase* (*CRTISO*), tornando os frutos das plantas editadas alaranjados. Vu et al. (2020), por sua vez, geraram plantas de tomate com coloração arroxeada, por meio de edição visando o acúmulo de antocianinas.

Para otimizar o uso de replicon de geminivírus na edição de genomas via CRISPR, estratégias que permitem o desenvolvimento de replicons menores também têm sido adotadas, uma vez que, quanto menor o tamanho do replicon, maior será a eficiência das proteínas Rep/RepA em amplificá-los (Vu et al., 2020). Algumas estratégias utilizam o replicon viral para produzir todos os componentes necessários para a edição de genoma – Cas9, sgRNA e fita doadora –, evitando assim a inserção no genoma (Čermák et al., 2015). Entretanto, essa estratégia, apesar de eficiente, gera um replicon de tamanho grande. Assim, para aumentar ainda mais a disponibilidade de fita doadora disponível no meio intracelular, é possível utilizar o GVR para carrear apenas a fita doadora (Dahan-Meir et al., 2018), ou ainda utilizar múltiplos replicons, de modo a entregar todos os componentes necessários para edição sem perda de eficiência devido ao tamanho do GVR formado (Vu et al., 2020).

Apesar de a entrega do DNA doador via GVR ter se mostrado promissora em várias espécies, o sucesso dessa técnica depende da susceptibilidade da espécie-alvo ao geminivírus. Em *A. thaliana*, por exemplo, Hahn et al. (2018) fizeram estudo comparando a eficiência de HR em função da forma de entrega do DNA doador, tanto via plasmídeos baseados em replicons de geminivírus quanto via plasmídeos binários. Nesse estudo, ficou claro que o uso de replicons virais em *A. thaliana* não promove a edição por HR, tornando-se recomendável o uso de outros métodos de entrega da fita doadora, como a partir de plasmídeos tradicionalmente utilizados em transformação de plantas (Hahn et al., 2018).

## Passo a passo – Um pipeline de como montar sua estratégia de GT

A obtenção de uma planta por meio da ferramenta CRISPR via HR envolve uma série de etapas, que compreendem desde a seleção do alvo genômico até a seleção de plantas editadas (Figura 3). O primeiro passo é a definição da espécie-alvo, bem como



**Figura 3.** Esquema das etapas a serem consideradas para desenvolver uma estratégia de recombinação homóloga via CRISPR.

Fonte: adaptado de Shan et al. (2020).

o delineamento do tipo de edição e do alvo genômico. Uma vez definidos, pode-se seguir para o desenho do gRNA e da fita doadora. A fim de verificar a eficiência dos gRNAs desenhados, é possível realizar uma etapa opcional de validação in vitro para seleção dos gRNAs que apresentem maior eficiência. Em paralelo, realiza-se a síntese do vetor, no caso estratégias baseadas em plasmídeos, ou síntese dos sgRNAs e Cas no caso de estratégias *transgene-free* (para mais detalhes, ver Capítulo 2). Com esses componentes em mãos, é possível realizar a entrega do sistema CRISPR/Cas pelo método de transformação desejado. Por fim, após a obtenção das plantas transformadas, a última etapa é a seleção das plantas que contêm uma edição de interesse, a qual é uma etapa comumente baseada em sequenciamento.

### 1º passo – Definir alvo, tipo e local de edição

O primeiro passo para se executar um projeto de edição de genomas com a ferramenta CRISPR via HDR é a definição da espécie a ser estudada. Características como ploidia e duração de ciclo de vida (anual ou perene), por exemplo, podem

afetar a eficiência de edição gênica em plantas e, portanto, devem ser consideradas nessa etapa (Shan et al., 2020). Uma vez definida a espécie-alvo, pode-se considerar a susceptibilidade da espécie à transformação genética e definir se será utilizada uma estratégia *transgene-free*, como RNP, ou baseada em transformação estável via plasmídeo.

Tendo em mente o tipo de edição que se deseja obter (inserção, deleção ou substituição) e o alvo, caso o objetivo seja realizar a edição na região promotora ou na CDS, alguns cuidados devem ser tomados distintamente. Ao desenhar uma estratégia para edição da região promotora via HDR, como, por exemplo, a inserção ou a troca de sequências ou alteração de nucleotídeos pontuais, o primeiro passo a se considerar é se a região-alvo não apresenta sobreposição (do inglês *overlap*) com outras regiões adjacentes (Kumar, 2009). Para isso, podem-se utilizar *softwares* específicos, como o RSATplant (Contreras-Moreira et al., 2016).

A região promotora pode ou não se sobrepôr à CDS de um gene adjacente ou, ainda, a um transcrito alternativo do mesmo gene, apresentar mudança de fase de leitura (em inglês, *frameshift*) e passar a ser 5'-UTR e não mais região promotora (Ho et al., 2012). Na Figura 4, mostramos um exemplo de como observar essas características. No exemplo, é possível visualizar a região promotora do gene de soja Glyma.15G061400, que apresenta três transcritos alternativos com regiões promotoras diferentes. Em azul claro, está representada a região que se deve considerar para edição, ou seja, que corresponde à região promotora sem sobreposição. No exemplo, pode-se observar que, embora a sequência de DNA tenha a mesma fase de leitura, para cada transcrito alternativo se observa alteração na região promotora, e a de alguns passou a ser região 5' UTR.

Além disso, deve-se atentar à presença de motivos conservados na região da edição. Para isso, pode-se utilizar *softwares* como o PLACE (Higo et al., 1999) e PlantCARE (Lescot et al., 2002), de modo a identificar esses motivos regulatórios.

A edição por CRISPR via HDR na CDS pode visar à inserção de sequências de nucleotídeos e até mesmo de genes inteiros, como um gene-repórter (Wang et al., 2017), ou pode visar ainda à substituição de sequências ou alterações pontuais de nucleotídeos, como realizado para obtenção de plantas de arroz resistentes a herbicidas inibidores de ALS (Butt et al., 2017). Ao se fazer a edição nessas regiões, é relevante observar o grau de enovelamento da cromatina na região escolhida, uma vez que a edição de genes localizados em região heterocromática é dificultada devido ao menor acesso da nuclease para criar as DSBs (Dillon; Festenstein, 2002; Noman et al., 2016).



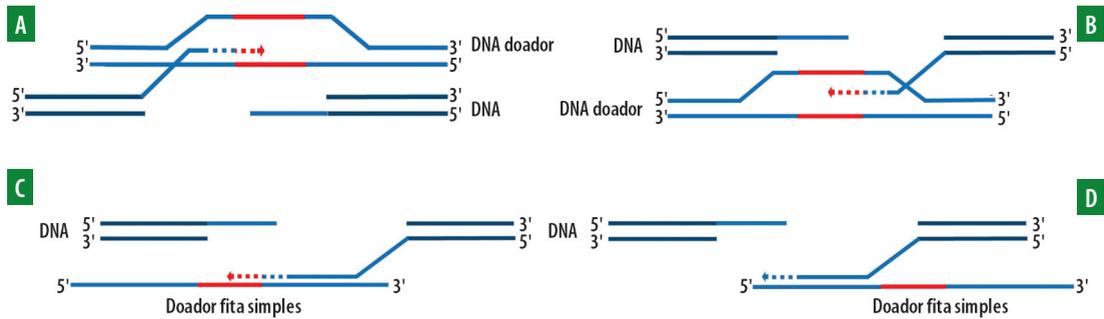
## 2º passo – Desenho do gRNA e da fita doadora

O desenho dos gRNAs e da fita doadora pode ser realizado por meio de softwares específicos ou de forma manual. A maior parte dos parâmetros utilizados para desenho de gRNA no caso de edição via NHEJ se aplica para HR (ver Capítulo 2). No caso de GT, entretanto, além desses parâmetros, ainda se deve considerar a distância entre a DSB do gRNA e o local de inserção da edição. Devido às limitações da execução de edição via HR em plantas, muitos dos parâmetros utilizados para desenho de gRNA e de fita doadora para essa finalidade são baseados em parâmetros estabelecidos em outras espécies de eucariotos, como mamíferos. Nesse caso, estudos mostram que quando o gRNA direciona que o corte pela nuclease ocorra entre 10 e 30 nucleotídeos de distância do local da edição, esta é a distância mais eficiente (Yang et al., 2013). Para distâncias entre 30 e 100 nucleotídeos, ainda é possível que ocorra a recombinação homóloga. Entretanto, quanto maior for a distância entre a DSB e o sítio de inserção, menor será a eficiência de GT (Ran et al., 2013; Yang et al., 2013; Singh et al., 2015), o que, portanto, afeta a definição do posicionamento do gRNA em relação ao local da edição. Isso é importante, pois a maior parte do HDR ocorrerá via SDSA; ou seja, ao ser danificado, o DNA passará pela etapa de ressecção da extremidade 5', permitindo a formação de extremidade 3' fita simples, responsável pelo pareamento com a fita doadora e pelo início da polimerização do DNA. Dessa forma, apenas uma das fitas do molde será capaz de fazer o pareamento perfeito com o DNA, permitindo a polimerização, assim como a mutação da PAM e a edição (Huang; Puchta, 2019). Portanto, como a polimerização do DNA ocorre apenas no sentido 5'–3', é recomendado que se tome cuidado adicional ao desenhar a fita-molde ssDNA ou RNA, a fim de garantir que a edição seja inserida durante o reparo. No caso de a fita homóloga ser a fita antissenso, recomenda-se posicionar a edição a montante (em inglês, *upstream*) do corte, de forma que, após a invasão pela extremidade 3' do DNA, a edição seja incorporada (Figura 5C) (Huang; Puchta, 2019). Por outro lado, no caso de a fita doadora ser dsDNA, isso não é um problema, pois ambas as fitas podem ser utilizadas como molde durante o reparo (Figura 5A e 5B) (Huang; Puchta, 2019).

Outro ponto a se considerar é o fato de diferentes gRNAs apresentarem diferentes eficiências de direcionamento da nuclease na criação de DSBs, podendo afetar diretamente a eficiência de GT. Esse fato pode ser mitigado por meio do teste com mais de um gRNA para o mesmo alvo e, após validação, proceder apenas com o que apresentar melhor eficiência (Zhang et al., 2019). Na Tabela 1 estão descritos softwares disponíveis gratuitamente para o desenho de gRNAs e de fita doadora, bem como os genomas disponíveis no banco de dados desses softwares para verificar *off-targets*.

Tabela 1. Softwares web-based para desenho do gRNA e fita doadora, evidenciando para quais espécies de destaque há disponibilidade de banco de dados genômicos para referência, assim como a possibilidade de desenho de guias para Cas9 e/ou Cas12a.

Software	<i>A. thaliana</i>	Soja	Milho	Sorgo	Cana	Trigo	Arroz	Felção	Cas9	Cas12a	Fita doadora	Link	Referência
ATUM	●	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	●	✗	✗	<a href="https://www.atum.bio/eCommerce/cas9/input">https://www.atum.bio/eCommerce/cas9/input</a>	ATUM, CA
Benchling	●	●	●	●	✗	✗	✗	✗	●	●	●	<a href="https://www.benchling.com">https://www.benchling.com</a>	Benchling, CA
Breaking-Cas	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	✗	<a href="https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas">https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas</a>	Oliveros et al. (2016)
CC-TOP	●	●	✗	✗	●	✗	●	✗	●	●	✗	<a href="https://crispr.cos.uni-heidelberg.de">https://crispr.cos.uni-heidelberg.de</a>	Stemmer et al. (2015)
CHOPCHOP	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	✗	<a href="https://chopchop.cbu.uib.no">https://chopchop.cbu.uib.no</a>	Labun et al. (2019)
CRISPOR	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	✗	<a href="http://crispor.tefor.net">http://crispor.tefor.net</a>	Concordet e Haeussler (2018)
CRISPRdirect	●	●	●	●	✗	●	●	✗	●	●	✗	<a href="https://crispr.dbcls.jp">https://crispr.dbcls.jp</a>	Naito et al. (2015)
Crispr-GE	●	●	●	●	✗	✗	●	✗	●	●	✗	<a href="http://skl.scau.edu.cn">http://skl.scau.edu.cn</a>	Xie et al. (2017)
CRISPR-P	●	●	●	●	✗	●	●	✗	●	●	✗	<a href="http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2">http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2</a>	Liu et al. (2017)
E-CRISP	●	✗	●	✗	✗	●	●	✗	●	●	✗	<a href="http://www.e-crisp.org/E-CRISP">http://www.e-crisp.org/E-CRISP</a>	Heigwer et al. (2014)
GT-Scan	●	●	●	✗	✗	●	●	✗	●	●	✗	<a href="https://gt-scan.csiro.au">https://gt-scan.csiro.au</a>	O'Brien e Bailey (2014)
Horizon Discovery	✗	●	●	✗	✗	✗	●	✗	●	●	●	<a href="https://horizondiscovery.com/en/products/tools">https://horizondiscovery.com/en/products/tools</a>	Horizon Discovery, UK
RGEN	●	●	●	●	●	✗	●	●	●	●	✗	<a href="http://www.rgenome.net">http://www.rgenome.net</a>	Bae et al. (2014)
Synthego	●	✗	●	✗	✗	●	✗	✗	●	✗	✗	<a href="https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-design-tool">https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-design-tool</a>	Synthego, CA



**Figura 5.** Diferença entre uso de fita doadora dupla fita e fita simples quanto ao posicionamento da edição, para que esta seja incorporada pelo mecanismo de reparo SDSA. A-B) Fita doadora dupla-fita, independentemente do local haverá incorporação da edição. C) Incorporação da edição pela fita doadora homóloga à fita antissense de DNA, pois esta está a montante do local do corte. D) Não há incorporação da edição, apenas reparo via HDR.

Fonte: adaptado de Huang e Puchta (2019).

Além do desenho do gRNA, o desenho da fita doadora também é essencial para que ocorra a HR de modo eficiente. A fita doadora é constituída de um segmento de nucleotídeos, que pode ser fita simples ou dupla-fita, construída de forma a conter a sequência da edição desejada flanqueada por regiões de homologia à região-alvo no genoma, chamadas de braços homólogos (Rozov et al., 2019). Após a edição ocorrer com sucesso, é desejável evitar a contínua geração de DSBs no DNA-alvo. Para isso, duas estratégias podem ser utilizadas, uma baseada na estratégia de desenho do gRNA e outra na fita doadora. Na primeira, posiciona-se o gRNA de tal forma que a edição, ao ser incorporada, inviabilize o pareamento do gRNA com o DNA por meio da eliminação da complementariedade, garantida pela sequência do novo inserto (Figura 6A); na segunda, pode-se incluir na fita doadora uma mutação silenciosa na região PAM, tornando a região-alvo do DNA agora irreconhecível pela nuclease (Figura 6B) (Huang; Puchta, 2019). As duas estratégias mostradas na Figura 6 podem ser empregadas utilizando diferentes nucleases, sejam elas geradoras de extremidades abruptas ou coesivas.

Com relação ao desenho da fita doadora, outra questão também a se considerar é a extensão dos braços homólogos, que pode variar de acordo com o tamanho da edição a ser feita. De forma semelhante ao desenho do gRNA, não se tem informações específicas para edição de células vegetais, e os parâmetros utilizados são baseados em edições por HR realizadas em outros tipos de células eucarióticas (Renaud et al., 2016; Rozov et al., 2019). Nesse sentido, para alterações menores que 50 pb, e que a fita doadora seja fita simples, recomenda-se que os braços homólogos possuam entre 50 pb e 80 pb, e o tamanho total da fita doadora não deve exceder

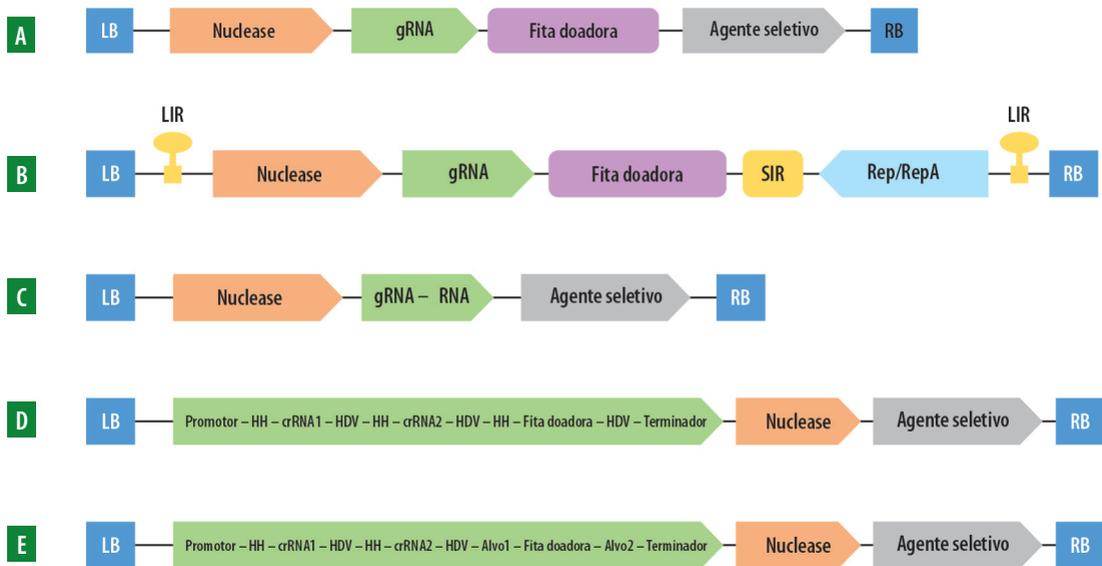


Porém, em se tratando de GT, além das sequências que codificam a nuclease, o gRNA e os agentes seletivos, faz-se necessário incluir a sequência da fita doadora, que pode estar presente no mesmo vetor (Figura 7A) ou ser entregue em um vetor separado. Como a fita doadora geralmente é utilizada pela célula em formato de dsDNA, não há presença de promotor e terminador flanqueando essa região, uma vez que ela não será transcrita (Figura 7A) (Schiml et al., 2014; Svitashv et al., 2015). Entretanto, a utilização dessa estratégia tem a limitação de entregar baixa quantidade de fita doadora, o que dificulta a ocorrência de edição via HR (Čermák et al., 2015). Por essa razão, atualmente a estratégia de entrega de fita doadora baseada em GVR tem sido utilizada com maior frequência, pois permite a disponibilização de maior quantidade de fita-molde durante o reparo via HR.

Os vetores baseados em GVRs foram desenvolvidos por Baltés et al. (2014), e sua estrutura foi montada por meio da remoção dos genes relacionados com a infecção viral, deixando-se apenas a sequência que codifica as proteínas iniciadoras de replicação (Rep/RepA) flanqueadas pelas sequências de DNA de regiões intergênicas LSL (LIR-SIR-LIR), que são essenciais para a circularização e autorreplicação do GVR. Essa estrutura foi construída em formato de T-DNA para ser entregue para a planta via agrobactéria. A sequência LIR funciona como um promotor bidirecional, que pode induzir a altas taxas de replicação do vetor devido à ativação do promotor LIR pelas proteínas Rep/RepA. Além disso, para garantir alta taxa de replicação circular, pode-se posicionar um promotor forte a montante da sequência da LIR, considerando o vetor circularizado. Geralmente, a Rep/RepA é posicionada a jusante (*downstream*) da sequência senso complementar do promotor LIR, posição em que essa proteína é encontrada naturalmente em geminivírus (Baltés et al., 2014) (Figura 7B). Com utilização de GVRs, é possível traçar mais de uma estratégia de construção de vetor. Vu et al. (2020), por exemplo, entregaram todas as partes do vetor via GVR, enquanto Dahan-Meir et al. (2018) entregaram apenas a fita doadora com essa estratégia.

Outra estratégia que apresenta uma estrutura de vetor que merece ser detalhada é quando se utiliza RNA como fita doadora. Nesses casos, a estrutura dos vetores utilizados é parecida com a dos vetores binários tradicionais, porém contém algumas modificações. Butt et al. (2017) utilizaram uma estrutura de vetor que difere da tradicional (Figura 7A) apenas pela localização da fita doadora, pois esta foi fusionada ao gRNA (gRNA - RNA) e com expressão dirigida pelo promotor *OsU3* (Figura 7C).

No trabalho em que Li et al. (2019) utilizam RNA como fita-molde, a estrutura do vetor difere do vetor binário tradicional apenas na forma de entrega da fita doadora. Foram desenhadas duas estratégias de entrega. Na primeira estratégia, foram utilizadas duas unidades denominadas RCR (Ribozima – crRNA – Ribozima)



**Figura 7.** Exemplos de tipos de vetores utilizados em plantas. A) Vetor binário de agrobactéria com fita doadora sendo entregue como DNA fita dupla – vetor baseado na estratégia utilizada por Schiml et al. (2014). B) Vetor baseado em replicon viral de Geminivírus (GVR) – desenho baseado na estratégia de Baltés et al. (2014). C) Vetor binário de agrobactéria com fita doadora de RNA fusionado ao gRNA - RNA – desenho baseado na estratégia de Butt et al. (2017). D) Vetor binário de agrobactéria com fita doadora de RNA flanqueado por ribozima – desenho baseado na estratégia de Li et al. (2019). E) Vetor binário de agrobactéria com fita doadora de RNA flanqueado, alvos de crRNA – desenho baseado na estratégia de Li et al. (2019).

e uma unidade denominada RDR (Ribozima – Fita Doadora – Ribozima) in tandem sob o controle do promotor de *OsUbi3* e terminador NOS (Figura 7D). Na segunda estratégia, foram utilizadas duas unidades RCR in tandem com uma unidade denominada TDT, onde a fita doadora é flanqueada por dois alvos de crRNAs (alvo 1 – fita doadora – alvo 2; Figura 7E). Dessa forma, a segunda estratégia aproveitou a capacidade da Cas12a de processar pre-crRNA para produzir os RNAs-molde. Ambas as estratégias utilizadas foram montadas a fim de garantir que os RNAs-molde fossem mantidos no núcleo e utilizados como molde para edição via HDR. Esse trabalho de Li et al. (2019) mostra de forma elegante que o RNA pode ser utilizado de forma eficiente como fita doadora para reparo via HDR.

#### 4º passo – validação do guia e da fita doadora

Com o vetor em mãos, o próximo passo é verificar se o gRNA está conseguindo guiar a enzima até a sequência-alvo e se o material entregue para a planta é capaz

de induzir a mutação desejada. Para isso, é possível validar os sgRNAs por meio de ensaio de expressão transiente ou com utilização de kits comerciais como o *Guide-it™ sgRNA Screening* (Takara Bio, 2018) (Figura 8).



Figura 8. Esquema das etapas para síntese e validação do gRNA in vitro (Takara Bio, 2018).

Como vantagem, o uso de expressão transiente para validação de sgRNA é econômico e conduzido in vivo, o que garante uma maior reprodutibilidade na transformação genética. Além disso, com essa metodologia, geralmente é possível ainda verificar a circularização de vetores GVR, necessária para que ocorra a autor-replicação (Baltes et al., 2014). Os resultados podem ser obtidos em alguns dias, variando de 3 a 6 dias, dependendo da espécie (Shan et al., 2018). Para plantas, existem duas abordagens principais de ensaios transientes: a agroinfiltração de células foliares (Bortesi; Fischer, 2015) e a transfecção de protoplastos, que podem ainda ser utilizados para regeneração da planta em algumas espécies, caso haja protocolo desenvolvido para cultura de tecidos (Woo et al., 2015; Andersson et al., 2017; Collonnier et al., 2017; Osakabe et al., 2018). Para leguminosas, existe ainda o método de transformação transiente de raízes fasciculadas mediada por *Agrobacterium rhizogenes* (Jacobs et al., 2015; Iaffaldano et al., 2016; Wang et al., 2016; Li et al., 2017; Bernard et al., 2019; Yuan et al., 2019).

## 5º passo – Transformação estável

Um passo crucial e muitas vezes limitante no processo de GT é a cultura de tecidos. Para algumas espécies vegetais, a cultura de tecidos é um gargalo para o desenvolvimento da tecnologia, por serem recalcitrantes a regeneração e/ou a transformação (Altpeter et al., 2005). Os tipos de explantes mais utilizados são calos (massa celular totipotente) e cortes de folhas e embriões zigóticos (Duclercq et al., 2011). Geralmente as metodologias de regeneração de plantas via cultura de tecidos podem ocorrer via organogênese somática ou via embriogênese somática, e a

disponibilidade de utilização de cada metodologia varia de acordo com a espécie trabalhada (Kamle et al., 2011; Phillips; Garda, 2019). Apesar de a organogênese somática ser uma metodologia muito utilizada, a embriogênese somática é especialmente vantajosa para a edição de genoma via CRISPR, por ter menor chance de gerar plantas quiméricas para o transgene quando comparada à organogênese, porém nem todas as espécies têm protocolos otimizados e eficientes para esse procedimento (Duclercq et al., 2011; Kamle et al., 2011). De maneira geral, as metodologias de transformação utilizadas para GT são as mesmas normalmente utilizadas para obtenção de transgênicos tradicionais e para edição de genoma via NHEJ, sendo as principais as vias agrobactéria e biobalística (Schmil et al., 2014; Svitashv et al., 2015; Shi et al., 2017).

Uma forma de otimizar a eficiência de GT via protocolo de cultura de tecidos é por meio de regulações de fatores externos que possam induzir a planta a entrar em um estado de estresse moderado, como a aplicação de pequenos períodos de estresse térmico (Boyko et al., 2005). Vu et al. (2020) demonstraram que a aplicação de um estresse térmico a 31 °C por 10 dias foi capaz de otimizar a eficiência de HR em tomate. O uso desse tipo de otimização pode ser especialmente interessante quando se utiliza a nuclease Cas12a, por esta possuir atividade ótima nessa mesma temperatura e pelo fato de a ocorrência de HR ser ainda mais favorecida nesse contexto. Entretanto, é importante salientar que a temperatura ideal para aplicação de estresse moderado em plantas pode variar de acordo com a espécie. Além disso, fatores como fotoperíodo podem influenciar a expressão de transgenes no funcionamento de nucleases; Cas12a, por exemplo, funciona melhor em condições de fotoperíodo, tanto curto – 8 horas de luz e 16 horas de escuro – quanto longo – 16 horas de luz e 8 horas de escuro – (Vu et al., 2020), e o promotor CaMV 35S funciona melhor especificamente em fotoperíodo longo – 16 horas de luz e 8 horas de escuro (Boyko et al., 2005). Em contrapartida, em *Arabidopsis* foi demonstrado que a recombinação intracromossomal acontece com maior frequência em condição de fotoperíodo curto (Boyko et al., 2005). Entretanto, é provável que essas observações variem de acordo com a espécie de estudo. Dessa forma, apesar das limitações relativas a cada espécie, existem algumas estratégias de cultura de tecido que podem ser testadas para a espécie de interesse e têm potencial de ajudar no aumento da eficiência de GT em plantas.

## 6º passo – Seleção das plantas editadas

Após regeneração das plantas por cultura de tecidos, duas etapas devem ser conduzidas para garantir o sucesso do GT: identificar as plantas transformadas e,

entre essas, as plantas efetivamente editadas. É importante ressaltar que o fato de se obter uma planta transformada não significa que essa planta terá sido necessariamente editada. A identificação das plantas transformadas geralmente é feita via Reação em Cadeia da Polimerase (em inglês, *Polymerase Chain Reaction*, PCR) convencional de genes presentes no cassete de transformação, como o que codifica Cas, promotor ou genes de resistência. Já para verificar a edição, é possível utilizar diferentes ferramentas dependendo do tamanho do inserto. Além disso, é necessário verificar a zigosidade da edição (monoalélica, bialélica, quimera, heterozigota e homozigotas). Identificar a zigosidade é importante, pois, dependendo do tipo de edição em cada alelo, mesmo que plantas sejam mutantes, os fenótipos podem apresentar variabilidade do traço desejado. Plantas transgênicas podem ser quimeras para a mutação, assim algumas células serão mutantes e outras não, levando a planta a apresentar características fenotípicas não desejadas.

Com relação a inserções muito pequenas ou SNPs, devido à impossibilidade de se identificar a ocorrência de edição pelo tamanho da banda em gel de eletroforese, é possível utilizar a estratégia de PCR baseada em perda de sítios de restrição – PCR-RE (Nekrasov et al., 2013). O uso da estratégia nesse contexto é igual à metodologia para inserções via NHEJ, em que após a PCR-RE é feito o sequenciamento das amostras a fim de confirmar a presença da mutação e caracterizá-la quanto à sequência selvagem. No caso de HR, é importante lembrar que os *primers* de amplificação, tanto para o sequenciamento quanto para a PCR, precisam ser desenhados de forma a ficar fora dos braços homólogos, para evitar falso-positivos derivados da amplificação da fita doadora (Ran et al., 2013). Esses métodos apresentam limitações relacionadas ao tamanho da edição. Para identificação de mutações pontuais como SNPs, a técnica *High Resolution Melt* e o sequenciamento (Sanger ou NGS) são as melhores opções (Fauser et al., 2014; Ma et al., 2015; Svtashev et al., 2015; Zhang et al., 2019).

Inserções maiores podem ser identificadas por PCR convencional e visualização do tamanho de banda no gel de agarose. Após essa etapa, entretanto, costuma-se sequenciar os fragmentos amplificados para identificar se realmente obteve-se a mutação esperada, caracterizando o loco em nível de estrutura nucleotídica e garantindo que não se trata de um falso-positivo (Zhou et al., 2014; Zhang et al., 2019). Outra estratégia, recentemente descrita para identificação de *indels* acima de dois pb, é o uso de géis de agarose de 4-6% (Bhattacharya; Van Meir, 2019). Essa estratégia se mostrou um método simples e barato e está descrita detalhadamente no Capítulo 2.

Além disso, para facilitar a identificação de homozigotos e heterozigotos, algumas técnicas podem ser empregadas. O método mais amplamente utilizado é o sequenciamento, que, além de identificar mutações de base única, viabiliza a

identificação de diferentes tipos de alelos, a partir do cromatograma Sanger e NGS com a ajuda de softwares como o DSDecode (Liu et al., 2015), TIDE, Hi-TOM (Liu et al., 2019), MaGeCK-VISPR, MaGeCKFlute PinaPI-Py, CRISPRCloud2, CRISPRanalyzeR (Hanna; Doench, 2020) e scripts como Cris.py (Connelly; Pruett-Miller, 2019).

## Conclusões e perspectivas

O uso da tecnologia CRISPR/Cas via HDR para edição de genomas tem se mostrado bastante promissora. Porém, seu uso ainda se limita em grande parte a estudos em plantas-modelo. Isso ocorre devido à baixa frequência de HDR nas células somáticas, o que se deve principalmente a dois fatores: ao fato de HDR não ser o mecanismo preferencial de reparo do DNA em células vegetais; e à dificuldade em manter a fita doadora em quantidade suficiente para que ela seja utilizada como molde durante o reparo no lugar da cromátide-irmã. Entretanto, à medida que o uso dessa tecnologia avança, surgem novas formas de otimizá-la. O uso da nuclease Cas12a em vez da Cas9 é uma dessas formas de otimização (Zetsche et al., 2015; Huang; Puchta, 2020), e outras incluem a aplicação de um estresse térmico moderado, que pode induzir a planta a entrar em um estágio celular que favoreça a HR (Boyko et al., 2005; Vu et al., 2020). Nessa linha, o uso de GVRs também tem se mostrado uma estratégia promissora, tanto como forma de aumentar a disponibilidade de fita-molde de DNA, como pela presença das proteínas Rep/RepA, capazes de induzir a célula a entrar nas fases S e G2 do ciclo celular, favorecendo assim o sistema de HDR (Baltés et al., 2014).

Por ser uma área relativamente nova, a edição de genoma visando GT ainda tem um enorme potencial e deve avançar muito nos próximos anos, tornando essa técnica ainda mais precisa e eficiente. Nesse aspecto, diversos estudos têm sido conduzidos tanto em células de origem animal quanto em leveduras e plantas (Gil-Humanes et al., 2017; Shi et al., 2017; Au et al., 2019; Liu et al., 2019; Yan et al., 2019; Jin et al., 2020; Vu et al., 2020). Uma aplicação ainda pouco explorada em plantas é a deleção de genes inteiros. Apesar de mais desafiadora, certamente será realizada com maior frequência num futuro próximo, visto que estudos estão sendo desenvolvidos nos mais diversos organismos com essa finalidade (Au et al., 2019; Huang et al., 2019; Weisheit et al., 2020). Além disso, outro ponto crucial para o sucesso da tecnologia é o avanço no desenvolvimento de protocolos eficientes de transformação e regeneração de plantas, que, para muitas espécies, ainda é um dos pontos limitantes para que a tecnologia GT seja aplicada de forma rotineira. Dessa forma, acredita-se que, nos próximos anos, ocorrerão muitos avanços a fim de tornar a edição de genoma por CRISPR/Cas via HR uma técnica de uso corriqueiro em laboratórios de melhoramento de plantas.

## REFERÊNCIAS

- ALTPETER, F.; BAISAKH, N.; BEACHY, R.; BOCK, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; DANIELL, H.; DATTA, K.; DATTA, S.; DIX, P. J.; FAUQUET, C.; HUANG, N.; KOHLI, A.; MOOIBROEK, H.; NICHOLSON, L.; NGUYEN, T. T.; NUGENT, G.; RAEMAKERS, K.; ROMANO, A.; SOMERS, D. A.; STOGER, E.; TAYLOR, N.; VISSER, R. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. **Molecular Breeding**, v. 15, n. 3, p. 305-327, 2005.
- ANDERSSON, M. TURESSON, H.; NICOLIA, A.; FÄLT, A-S.; SAMUELSSON, M.; HOFVANDER, P. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. **Plant cell reports**, v. 36, n. 1, p. 117-128, 2017.
- ATHMA, P.; PETERSON, T. Ac induces homologous recombination at the maize *P* locus. **Genetics**, v. 128, p. 163-173, 1991.
- AU, V. LI-LEGER, E.; RAYMANT, G.; FLIBOTTE, S.; CHEN, G.; MARTIN, K.; FERNANDO, L.; DOELL, C.; ROSELL, F. I.; WANG, S.; EDGLEY, M. L.; ROUGVIE, A. E.; HUTTER, H.; MOERMAN, D. G. CRISPR/Cas9 methodology for the generation of knockout deletions in *Caenorhabditis elegans*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 9, n. 1, p. 135-144, 2019.
- BAI, H.; LIU, L.; AN, K.; LU, X.; HARRISON, M.; ZHAO, Y.; YAN, R.; LU, Z.; LI, S.; LIN, S.; LIANG, F.; QIN, W. CRISPR/Cas9-mediated precise genome modification by a long ssDNA template in zebrafish. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2020.
- BALTES, N. J.; GIL-HUMANES, J.; CERMAK, T.; ATKINS, P. A.; VOYTAS, D. F. DNA replicons for plant genome engineering. **Plant Cell**, v. 26, n. 1, p. 151-163, 2014.
- BHATTACHARYA, D.; VAN MEIR, E. G. A simple genotyping method to detect small CRISPR-Cas9 induced indels by agarose gel electrophoresis. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2019.
- BORTESI, L.; FISCHER, R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 1, p. 41-52, 2015.
- BOYKO, A.; FILKOWSKI, J.; KOVALCHUK, I. Homologous recombination in plants is temperature and day-length dependent. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 572, n. 1-2, p. 73-83, 2005.
- BUTLER, N. M.; BALTES, N. J.; VOYTAS, D. F.; DOUCHES, D. S. Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum* L.) using sequence-specific nucleases. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-13, 2016.
- BUTT, H.; EID, A.; ALI, Z.; ATIA, M. A. M.; MOKHTAR, M. M.; HASSAN, N.; LEE, C. M.; BAO, G.; MAHFOUZ, M. M. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing using a chimeric single-guide RNA molecule. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-8, 2017.
- ČERMÁK, T.; BALTES, N. J.; ČEGAN, R.; ZHANG, Y.; VOYTAS, D. F. High-frequency, precise modification of the tomato genome. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, 2015.
- COLLONNIER, C.; EPERT, A.; MARA, K.; MACLOT, F.; GUYON-DEBAST, A.; CHARLOT, L.; WHITE, C.; SCHAEFER, D. G.; NOGUÉ, F. CRISPR-Cas9-mediated efficient directed mutagenesis and RAD 51-dependent and RAD 51-independent gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. **Plant biotechnology journal**, v. 15, n. 1, p. 122-131, 2017.

- CONNELLY, J. P.; PRUETT-MILLER, S. M. CRIs.py: A Versatile and High-throughput Analysis program for CRISPR-based Genome editing. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.
- CONTRERAS-MOREIRA, B. ; CASTRO-MONDRAGON, J. A. ; RIOUALEN, C. ; CANTALAPIEDRA, C. P. ; HELDEN, J. V. RSAT: Plants: Motif discovery within clusters of upstream sequences in plant genomes. In: HEHL, R. (Ed.). **Plant Synthetic Promoters**. New York: Humana Press, 2016. p. 279-295.
- DAHAN-MEIR, T.; FILLER-HAYUT, S.; MELAMED-BESSUDO, C.; BOCOBZA, S.; CZOSNEK, H.; AHARONI, A.; LEVY, A. A. Efficient in planta gene targeting in tomato using geminiviral replicons and the CRISPR/Cas9 system. **Plant Journal**, v. 95, n. 1, p. 5-16, 2018.
- DERIANO, L.; ROTH, D. B. Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. **Annual Review of Genetics**, v. 47, p. 433-455, 2013.
- DILLON, N.; FESTENSTEIN, R. Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. **TRENDS in Genetics**, v. 18, n. 5, p. 252-258, 2002.
- DUCLERCQ, J.; SANGWAN-NORREEL, B.; CATTEROU, M.; SANGWAN, R. S. De novo shoot organogenesis: from art to science. **Trends in plant science**, v. 16, n. 11, p. 597-606, 2011.
- ENDO, A.; ISHIKAWA, Y.; OSAKABE, K. NAKAYAMA, S.; KAYA, H.; ARAKI, T.; SHIBAHARA, K.; ABE, K.; ICHIKAWA, H.; VALENTINE, L.; HOHN B.; TOKI, S. Increased frequency of homologous recombination and T-DNA integration in Arabidopsis CAF-1 mutants. **European Molecular Biology Organization**, v. 25, n. 23, p. 5579-5590, 2006.
- ENDO, M.; MIKAMI, M.; TOKI, S. Biallelic gene targeting in rice. **Plant Physiology**, v. 170, n. 2, p. 667-677, 2016.
- FAUSER, F.; SCHIML, S.; PUCHTA, H. Both CRISPR/C as-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in Arabidopsis thaliana. **The Plant Journal**, v. 79, n. 2, p. 348-359, 2014.
- GIL-HUMANES, J.; WANG, Y.; LIANG, Z.; SHAN, Q.; OZUNA, C. V.; SÁNCHEZ-LEÓN, S.; BALTES, N. J.; STARKER, C.; BARRO, F.; GAO, C.; VOYTAS, D. F. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. **Plant Journal**, v. 89, n. 6, p. 1251-1262, 2017.
- HAHN, F.; EISENHUT, M.; MANTEGAZZA, O.; WEBER, A. P. M. Homology-directed repair of a defective glabrous gene in arabidopsis with cas9-based gene targeting. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-13, 2018.
- HANNA, R. E.; DOENCH, J. G. Design and analysis of CRISPR–Cas experiments. **Nature Biotechnology**, p. 1-11, 2020.
- HAYUT, S. F.; BESSUDO, C. M.; LEVY, A. Targeted recombination between homologous chromosomes for precise breeding in tomato. **Nature Communication**, v. 8, 15605, 2017.
- HEYER, W. D.; EHMSSEN, K. T.; LIU, J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. **Annual review of genetics**, v. 44, p. 113-139, 2010.
- HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 1, p. 297-300, 1999.
- HO, M. R.; TSAI, K. W.; LIN, W-C. A unified framework of overlapping genes: Towards the origination and endogenic regulation. **Genomics**, v. 100, n. 4, p. 231-239, 2012.

- HORIZON DISCOVERY LTD. **Homology-directed repair (HDR) with a DNA donor oligo**. c2020. Disponível em: <<https://horizondiscovery.com/en/applications/crispr-cas9/homology-directed-repair-with-a-dna-donor-oligo>>. Acesso em: jul. 2020.
- HUANG, H.; SONG, X.; YANG, S. Development of a RecE/T-Assisted CRISPR–Cas9 Toolbox for *Lactobacillus*. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 7, p. 1-12, 2019.
- HUANG, T. K.; PUCHTA, H. CRISPR/Cas-mediated gene targeting in plants: finally, a turn for the better for homologous recombination. **Plant cell reports**, v. 38, n. 4, p. 443-453, 2019.
- IAFFALDANO, B.; ZHANG, Y.; CORNISH, K. CRISPR/Cas9 genome editing of rubber producing dandelion *Taraxacum kok-saghyz* using *Agrobacterium rhizogenes* without selection. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 356-362, 2016.
- JACOBS, T. B.; LAFAYETTE, P. R.; SCHMITZ, R. J.; PARROTT, W. A. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. **BMC biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 16, 2015.
- JIN, Y.; SHEN, Y.; SU, X.; WEINTRAUB, N. L.; TANG, Y. Effective restoration of dystrophin expression in iPSC Mdx-derived muscle progenitor cells using the CRISPR/Cas9 system and homology-directed repair technology. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 765-773, 2020.
- KAMLE, M.; BAJPAI, A.; CHANDRA, R.; KALIM, S.; KUMAR, R. Somatic embryogenesis for crop improvement. **GERF Bulletin of Biosciences**, v. 2, n. 1, p. 54-59, 2011.
- KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316-323, 2004.
- KUMAR, A. An overview of nested genes in eukaryotic genomes. **EUKARYOTIC CELL**, v. 8, n. 9, p. 1321-1329, 2009.
- LESCOT, M.; DÉHAIS, P.; THIJS, G.; MARCHAL, K.; MOREAU, Y.; DE PEER, Y. V.; ROUZÉ, P.; ROMBAUTS, S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 1, p. 325-327, 2002.
- LI, B.; CUI, G.; SHEN, G.; ZHAN, Z.; HUANG, L.; CHEN, J.; QI, X. Targeted mutagenesis in the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza*. **Scientific reports**, v. 7, p. 43320, 2017.
- LI, S.; LI, J.; HE, Y.; XU, M.; ZHANG, J.; DU, W.; ZHAO, Y.; XIA, L. Precise gene replacement in rice by RNA transcript-templated homologous recombination. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 445-450, 2019.
- LIU, Q.; WANG, C.; JIAO, X.; ZHANG, H.; SONG, L.; LI, Y.; GAO, C.; WANG, K. Hi-TOM: a platform for high-throughput tracking of mutations induced by CRISPR/Cas systems. **Science China Life Sciences**, v. 62, n. 1, p. 1-7, 2019.
- LIU, W.; XIE, X.; MA, X.; LI, J.; CHEN, J.; LIU, Y. G. DSDecode: a web-based tool for decoding of sequencing chromatograms for genotyping of targeted mutations. **Molecular plant**, v. 8, n. 9, p. 1431-1433, 2015.
- LOWE, B.; MATHERN, J.; HAKE, S. Active mutator elements suppress the knotted phenotype and increase recombination at the Kn1-O tandem duplication. **Genetics**, v. 132, p. 813-822, 1992.
- MA, X.; ZHANG, Q.; ZHU, Q.; LIU, W.; CHEN, Y.; QIU, R.; WANG, B.; YANG, Z.; LI, H.; LIN, Y.; XIE, Y.; SHEN, R.; CHEN, S.; WANG, Z.; CHEN, Y.; GUO, J.; CHEN, L.; ZHAO, X.; DONG, Z.; LIU, Y-G. A robust CRISPR/

Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. **Molecular plant**, v. 8, n. 8, p. 1274-1284, 2015.

MALZAHN, A. A.; TANG, X.; LEE, K.; REN, Q.; SRETENOVIC, S.; ZHANG, Y.; CHEN, H.; KANG, M.; BAO, Y.; ZHENG, X.; DENG, K.; ZHANG, T.; SALCEDO, V.; WANG, K.; ZHANG, Y.; QI, Y. Application of CRISPR-Cas12a temperature sensitivity for improved genome editing in rice, maize, and Arabidopsis. **BMC Biology**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2019.

MANOVA, V.; GRUSZKA, D. DNA damage and repair in plants - from models to crops. **Frontiers in plant science**, v. 6, n. 885, 2015.

MORENO-MATEOS, M. A.; FERNANDEZ, J. P.; ROUET, R.; VEJNAR, C. E.; LANE, M. A.; MIS, E.; KHOKHA, M. K.; DOUDNA, J. A.; GIRALDEZ, A. J. CRISPR-Cpf1 mediates efficient homology-directed repair and temperature-controlled genome editing. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2017.

NEKRASOV, V.; STASKAWICZ, B.; WEIGEL, D.; JONES, J. D. G.; KAMOUN, S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 691, 2013.

NOMAN, A.; AQEEL, M.; HE, S. CRISPR-Cas9: tool for qualitative and quantitative plant genome editing. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1740, 2016.

OSAKABE, Y.; LIANG, Z.; REN, C.; NISHITANI, C.; OSAKABE, K.; WADA, M.; KOMORI, S.; MALNOY, M.; VELASCO, R.; POLI, M.; JUNG, M.-H.; KOO, O.-J.; VIOLA, R.; KANCHISWAMY, C. N. CRISPR-Cas9-mediated genome editing in apple and grapevine. **Nature protocols**, v. 13, n. 12, p. 2844-2863, 2018.

PASZKOWSKI, J.; BAUR, M.; BOGUCKI, A.; POTRYKUS, I. Gene targeting in plants. **The EMBO Journal**, v. 7, p. 4021-4026, 1988.

PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 55, n. 3, p. 242-257, 2019.

PUCHTA H.; FAUSER F. Gene targeting in plants: 25 years later. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 57, p. 629-637, 2013.

PUCHTA, H. Repair of genomic double-strand breaks in somatic plant cells by one-sided invasion of homologous sequences. **The Plant Journal**, v. 13, n. 3, p. 331-339, 1998.

PUCHTA, H. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 1-14, 2005.

PUCHTA, H.; DUJON, B.; HOHN, B. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 10, p. 5055-5060, 1996.

QI, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, F.; BALLER, J. A.; CLELAND, S. C.; RYU, Y.; STARKER, C. G.; VOYTAS, D. F. Increasing frequencies of site-specific mutagenesis and gene targeting in Arabidopsis by manipulating DNA repair pathways. **Genome Research**, v. 23, n. 3, p. 547-554, 2013.

RAN, F. A.; HSU, P. D.; WRIGHT, J.; AGARWALA, V.; SCOTT, D. A.; ZHANG, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281-2308, 2013.

RENAUD, J. B.; BOIX, C.; CHARPENTIER, M.; DE CIAN, A.; COCHENNEC, J.; DUVERNOIS-BERTHET, E.; PERROUAULT, L.; TESSON, L.; EDOUARD, J.; THINARD, R.; CHERIFI, Y.; MENORET, S.; FONTANIERE, S.; DE CROZE, N.; FRAICHARD, A.; SOHM, F.; ANEGON, I.; CONCORDET, J-P.; GIOVANNANGELI, C. Improved Genome Editing Efficiency and Flexibility Using Modified Oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 Nucleases. **Cell Reporter**, v. 14, n. 9, p. 2263-2272, 2016.

RENKAWITZ, J.; LADEMANN, C. A.; JENTSCH, S. Mechanisms and principles of homology search during recombination. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 369-383, 2014.

ROZOV, S. M.; PERMYAKOVA, N. V.; DEINEKO, E. V. The Problem of the Low Rates of CRISPR/Cas9-Mediated Knock-ins in Plants: Approaches and Solutions. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 13, p. 3371, 2019.

SCHIML, S.; FAUSER, F.; PUCHTA, H. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in Arabidopsis resulting in heritable progeny. **Plant Journal**, v. 80, n. 6, p. 1139-1150, 2014.

SCHINDELE, P.; PUCHTA, H. Engineering CRISPR/LbCas12a for highly efficient, temperature-tolerant plant gene editing. **Plant Biotechnology Journal**, p. 1-3, 2019.

SHAKED, H.; MELAMED-BESSUDO, C.; LEVY, A. A. High-frequency gene targeting in Arabidopsis plants expressing the yeast RAD54 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 34, p. 12265-12269, 2005.

SHAN, S.; MAVRODIEV, E. V.; LI, R.; ZHANG, Z.; HAUSER, B. A.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; YANG, B. Application of CRISPR/Cas9 to Tragopogon (Asteraceae), an evolutionary model for the study of polyploidy. **Molecular ecology resources**, v. 18, n. 6, p. 1427-1443, 2018.

SHAN, S.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; YANG, B. Considerations in adapting CRISPR/Cas9 in nongenetic model plant systems. **Applications in Plant Sciences**, v. 8, n. 1, e11314, 2020.

SHI, J.; HABBEN, J. E.; ARCHIBALD, R. L.; DRUMMOND, B. J.; CHAMBERLIN, M. A.; WILLIAMS, R. W.; LAFITTE, H. R.; WEERS, B. P. Overexpression of ARGOS genes modifies plant sensitivity to ethylene, leading to improved drought tolerance in both Arabidopsis and maize. **Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 266-282, 2015.

SHI, J.; GAO, H.; WANG, H.; LAFITTE, H. R.; ARCHIBALD, R. L.; YANG, M.; HAKIMI, S. M.; MO, H.; HABBEN, J. E. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 2, p. 207-216, 2017.

SINGH, P.; SCHIMENTI, J. C.; BOLCUN-FILAS, E. A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. **Genetics**, v. 199, n. 1, p. 1-15, 2015.

SVITASHEV, S.; YOUNG, J. K.; SCHWARTZ, C.; GAO, H.; FALCO, S. C.; CIGAN, A. M. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. **Plant Physiology**, v. 169, n. 2, p. 931-945, 2015.

SWARTS, D. C.; JINEK, M. Cas9 versus Cas12a/Cpf1: Structure–function comparisons and implications for genome editing. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 9, n. 5, p. 1-19, 2018.

SZOSTAK, J. W.; ORR-WEAVER, T. L.; ROTHSTEIN, R. J.; STAHL, F. W. The double-strand-break repair model for recombination. **Cell**, v. 33, n. 1, p. 25-35, 1983.

- TAKARA BIO. **Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription and Screening Systems User Manual**. Mountain View, 2018. Disponível em: <[https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/Guide-it%20sgRNA%20In%20Vitro%20Transcription%20and%20Screening%20Systems%20User%20Manual\\_040618.pdf](https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/Guide-it%20sgRNA%20In%20Vitro%20Transcription%20and%20Screening%20Systems%20User%20Manual_040618.pdf)>. Acesso em: jul. 2020.
- TAMURA, K.; ADACHI, Y.; CHIBA, K.; OGUCHI, K.; TAKAHASHI, H. Identification of Ku70 and Ku80 homologues in *Arabidopsis thaliana*: evidence for a role in the repair of DNA double-strand breaks. **The Plant Journal**, v. 29, n. 6, p. 771-781, 2002.
- VU, T. V.; SIVANKALYANI, V.; KIM, E. J.; DOAN, D. T. H.; TRAN, M. T.; KIM, J.; SUNG, Y. W.; PARK, M.; KANG, Y. J.; KIM, J. Y. Highly efficient homology-directed repair using CRISPR/Cpf1-geminiviral replicon in tomato. **Plant Biotechnology Journal**, p. 1-11, 2020.
- VU, T. V.; SUNG, Y. W.; KIM, J.; DOAN, D. T. H.; TRAN, M. T.; KIM, J. Y. Challenges and Perspectives in Homology-Directed Gene Targeting in Monocot Plants. **Rice**, v. 12, n. 1, p. 1-29, 2019.
- WANG, L.; WANG, L.; TAN, Q.; FAN, Q.; ZHU, H.; HONG, Z.; ZHANG, Z.; DUANMU, D. Efficient inactivation of symbiotic nitrogen fixation related genes in *Lotus japonicus* using CRISPR-Cas9. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1333, 2016.
- WANG, M.; LU, Y.; BOTELLA, J. R.; MAO, Y.; HUA, K.; ZHU, J. kang. Gene Targeting by Homology-Directed Repair in Rice Using a Geminivirus-Based CRISPR/Cas9 System. **Molecular Plant**, v. 10, n. 7, p. 1007-1010, 2017.
- WEISHEIT, I.; KROEGER, J. A.; MALIK, R.; KLIMMT, J.; CRUSIUS, D.; DANNERT, A.; DICHGANS, M.; PAQUET, D. Detection of deleterious on-target effects after HDR-mediated CRISPR editing. **Cell Reports**, v. 31, n. 8, 2020.
- WEST, C. E.; WATERWORTH, W. M.; STORY, G. W.; SUNDERLAND, P. A.; JIANG, Q.; BRAY, C. M. Disruption of the *Arabidopsis* AtKu80 gene demonstrates an essential role for AtKu80 protein in efficient repair of DNA double-strand breaks in vivo. **The Plant Journal**, v. 31, n. 4, p. 517-528, 2002.
- WOLTER, F.; PUCHTA, H. In planta gene targeting can be enhanced by the use of CRISPR/Cas12a. **The Plant Journal**, v. 100, n. 5, p. 1083-1094, 2019.
- WOO, J. W.; KIM, J.; KWON, S. I.; CORVALAN, C.; CHO, S. W.; KIM, H.; KIM, S-G.; KIM, S-T.; CHOE, S.; KIM, J-S. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. **Nature biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 1162-1164, 2015.
- YAN, N.; SUN, Y.; FANG, Y.; DENG, J.; MU, L.; XU, K.; MYMRYK, J. S.; ZHANG, Z. A Universal Surrogate Reporter for Efficient Enrichment of CRISPR/Cas9-Mediated Homology-Directed Repair in Mammalian Cells. **Molecular Therapy Nucleic Acids**, v. 19, p. 775-789, 2019.
- YANG, L.; GUELL, M.; BYRNE, S.; YANG, J. L.; DE LOS ANGELES, A.; MALI, P.; AACH, J.; KIM-KISELAK, C.; BRIGGS, A. W.; RIOS, X.; HUANG, P. Y.; DALEY, G.; CHURCH, G. Optimization of scarless human stem cell genome editing. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 19, p. 9049-9061, 2013.
- ZAIDI, S. S.; MANSOOR, S. Viral vectors for plant genome engineering. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 2012-2017, 2017.
- ZETSCHKE, B.; GOOTENBERG, J. S.; ABUDAYYEH, O. O.; SLAYMAKER, I. M.; MAKAROVA, K. S.; ESSLETZBICHLER, P.; VOLZ, S. E.; JOUNG, J.; VAN DER OOST, J.; REGEV, A.; KOONIN, E. V.; ZHANG, F.

Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. **Cell**, v. 163, n. 3, p. 759-771, 2015.

ZHANG, X.; MASON, H. Bean yellow dwarf virus replicons for high-level transgene expression in transgenic plants and cell cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, n. 2, p. 271-279, 2006.

ZHANG, Z.; HUA, L.; GUPTA, A.; TRICOLI, D.; EDWARDS, K. J.; YANG, B.; LI, W. Development of an Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing. **Plant biotechnology journal**, v. 17, n. 8, p. 1623-1635, 2019.

ZHOU, H.; LIU, B.; WEEKS, D. P.; SPALDING, M. H.; YANG, B. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. **Nucleic acids research**, v. 42, n. 17, p. 10903-10914, 2014.

# Modulação da expressão gênica em plantas via tecnologia CRISPR/dCas9

Carolina Vianna Morgante  
Fabrício Barbosa Monteiro Arraes  
Clidia Eduarda Moreira-Pinto  
Bruno Paes de Melo  
Maria Fatima Grossi-de-Sa

## Introdução

A regulação da expressão gênica inclui uma diversidade de processos celulares que ocorrem de forma coordenada e em múltiplas etapas para desencadear o aumento ou a redução de um produto gênico específico. A expressão gênica pode ser induzida por estímulos endógenos e ambientais e modulada em diferentes níveis celulares, como na iniciação da transcrição, no processamento do RNA e na modificação pós-traducional da proteína.

A manipulação de genes-alvo é de primordial importância para o entendimento da função gênica e reprogramação das atividades celulares, tanto para o aprofundamento dos conhecimentos básicos sobre processos bioquímicos e moleculares, como para a intensificação de características de interesse agrônomo. Neste ponto, a precisão é essencial para que se obtenha o êxito necessário em aplicações da engenharia genética e da biologia sintética.

Nas últimas décadas, tecnologias envolvendo nucleases sítio específicas para a manipulação precisa do DNA sofreram um profundo avanço, surgindo como alternativas promissoras para a indução de mutações sítio-dirigidas e controle fino da expressão gênica. Entre essas tecnologias, destacam-se as de edição de genomas, como a da nuclease dedo de zinco (ZFN, do inglês *Zinc Finger Nuclease*), a de nucleases com efetores do tipo ativador transcricional (TALENs, do inglês *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) e, mais recentemente, a tecnologia CRISPR/Cas (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) associada à nuclease Cas. Esta última tem seu caráter revolucionário, sobretudo pela sua especificidade, universalidade e relativa simplicidade (Pickar-Oliver; Gersbach, 2019). Além disso, CRISPR/Cas é uma ferramenta flexível, passível de modificações, o que contribui para seu contínuo aprimoramento e diversifica suas aplicações nos estudos das funções celulares e na biotecnologia.

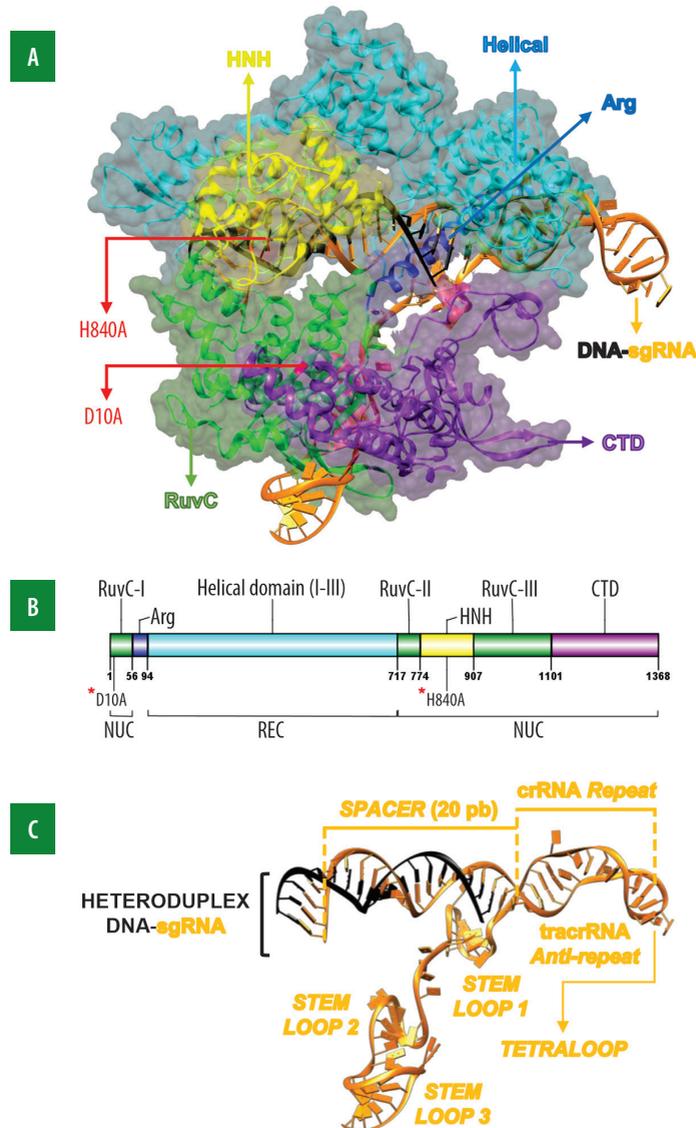
Este capítulo aborda a tecnologia CRISPR pelo uso da variante *dead Cas9* (CRISPR/dCas9), com ênfase no seu uso para a modulação da expressão gênica em plantas. São apresentadas e discutidas as principais estratégias atualmente utilizadas, para as quais foi proposto um roteiro, considerando os principais aspectos para um bom desenho experimental.

## O sistema dCas9

O sistema CRISPR/Cas9 foi identificado primeiramente em *Streptococcus pyogenes* e, posteriormente, em muitas outras bactérias, assim como na maioria das arqueias, como um sofisticado sistema imunológico adaptativo, guiado por RNAs codificados pelo locus CRISPR e pelas proteínas Cas (do inglês *CRISPR associated protein*), a fim de fornecer “imunidade adquirida”, principalmente, contra bacteriófagos (Hsu et al., 2014; Zhang et al., 2014). Sua aplicação na engenharia genética foi possível, principalmente, pela profunda elucidação da estrutura da Cas9, em conjunto com o RNA guia (gRNA).

Estruturalmente, a Cas9 de *S. pyogenes* pode ser considerada uma proteína multifuncional grande (1.368 resíduos de aminoácidos) formada por cinco domínios e com atividade nucleásica (Jiang; Doudna, 2017). A estrutura da apoenzima Cas9 é formada pelo lóbulo de reconhecimento alfa-helicoidal (REC) e pelo lóbulo nucleásico (NUC). Este último contém os domínios nucleásicos HNH conservado e RuvC tripartido, além de um domínio C-terminal mais variável (CTD) (Figura 1) (Jinek et al., 2014; Nishimasu et al., 2014).

No sistema CRISPR/Cas9 nativo, o gRNA maduro é composto por duas moléculas independentes de pequenos RNAs não codificadores, que interagem entre si por complementaridade de bases: 1) crRNA (do inglês *CRISPR RNA*), região onde ocorre o reconhecimento da sequência de DNA-alvo; e 2) tracrRNA (do inglês *transactivating crRNA*), importante para o ancoramento do gRNA na Cas9 (Jinek et al., 2012). Estudos in vitro determinaram a sequência mínima necessária, tanto do crRNA quanto do tracrRNA (sendo denominado também de RNA scaffold), para sua utilização em modelos sintéticos. Essas duas sequências mínimas foram unidas, criando assim o sgRNA (do inglês *single guide RNA*) (Figura 1) (Anders et al., 2014; Dang et al., 2015; Hsu et al., 2013; Jinek et al., 2012; Nishimasu et al., 2014). Após o reconhecimento da sequência de DNA-alvo, por meio da sua complementariedade ao gRNA/sgRNA, a Cas9 cliva o DNA dupla fita (dsDNA) em três pares de base a montante da sequência PAM (do inglês *Protospacer Adjacent Motif*), por meio de seus dois domínios nucleásicos distintos.



**Figura 1.** Estrutura da Cas9/dCas9 e do sgRNA. Modelo estrutural (A) e representação em diagrama (B) dos domínios funcionais da Cas9/dCas9 associada com sgRNA interagindo com a fita do DNA-alvo (fita complementar somente, representada em preto). Além do domínio C-terminal variável CTD, são apresentados no lóbulo NUC (sigla para *nucleásico*), os domínios RuvC (tripartido) e HNH, essenciais para a clivagem das duas fitas do DNA-alvo. São representados em vermelho (A) e com asterisco (B) mutações tanto no domínio RuvC (D10A) quanto no domínio HNH (H840A), características da dCas9. Isoladas, essas mutações conferem atividade nicase para a Cas9, mas juntas abolem completamente a sua atividade nucleásica. O lóbulo REC (sigla para *reconhecimento*) é representado exclusivamente pelo domínio Helical. A estrutura do sgRNA (C) é composta pelo crRNA (*spacer* + *crRNA repeat*) e RNA scaffold ou *tracrRNA* (neste esquema, o *tracrRNA anti-repeat* é ligado a *crRNA repeat* por um *tetraloop*, seguido de três *stem loops*). As representações estruturais apresentadas são baseadas em modelos depositados em banco de dados públicos (PDB ID: 4008), disponível em: <https://www.rcsb.org/>

Enquanto o domínio HNH cliva a fita de DNA complementar à sequência de sgRNA (fita-alvo), o domínio RuvC é responsável pela clivagem da fita de DNA oposta à fita complementar (fita não alvo) (Jiang; Doudna, 2017). Estudos mostraram que mutações específicas nos domínios HNH (a exemplo, H840A) ou RuvC (a exemplo, D10A) são capazes de converter a Cas9 em uma nicase (enzima que cliva um dsDNA em somente uma das fitas), enquanto mutações em ambos os domínios extinguem a sua atividade endonucleásica, sem interferir na sua capacidade de reconhecimento específico do DNA guiado por RNA, sendo assim designada *dead Cas9* ou dCas9 (Tabela 1) (Jiang; Doudna, 2017; Jinek et al., 2014, 2012).

## Aplicações do sistema dCas9 em plantas

As aplicações do sistema CRISPR vão além daquelas relacionadas à indução de mutações sítio-dirigidas no DNA pela clivagem da fita dupla do DNA e ativação do sistema de reparo. A proteína dCas9 oferece uma plataforma única, multifuncional e dinâmica para o recrutamento de proteínas com funções diversas a locais específicos do genoma para promover, por exemplo, o controle da regulação da transcrição, a edição epigenômica, a edição de bases e o imageamento do genoma.

A edição de bases vem se tornando uma potente ferramenta na biotecnologia vegetal para a indução de mutações pontuais direcionadas. O desenvolvimento de variedades tolerantes a herbicidas para as culturas do trigo, arroz, milho e melancia, por exemplo, foi possível pela introdução de mutações pontuais nos genes que codificam as enzimas acetolactato sintase e/ou da acetil-coenzima A, de forma que o produto final não é transgênico (Kuang et al., 2020; Li et al., 2019; Tian et al., 2018; Zhang et al., 2019b). Sistemas editores de bases requerem a fusão de variantes da Cas9, dCas9 ou nCas9, guiadas por um sgRNA, fusionadas a uma citosina (C) desaminase, que induz a conversão de C-G (Guanina) para T-A (Timina-Adenina) (CBE, do inglês *cytosine base editor*), ou a uma A desaminase, que promove a conversão de A-T para G-C (ABE, do inglês *adenine base editor*) (Gaudelli et al., 2017; Komor et al., 2016; Nishida et al., 2016). Esses sistemas foram adaptados com sucesso para uso em plantas, inclusive em sistemas multiplex, em que mais de um gene é alvo para indução da mutação simultaneamente, com alta eficiência, especificidade e sem ocorrência de *indels* no local da edição. Resultados mais satisfatórios foram obtidos com o uso da nCas9 (Hua et al., 2018; Kang et al., 2018; Zong et al., 2017).

Outra potente aplicação de CRISPR/dCas9 é o imageamento de genoma, usado para a visualização da organização espacial e de interações temporais da cromatina em tempo real. Para tanto, a proteína dCas9 é fusionada a proteínas fluorescentes, como a GFP (do inglês *Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente),

**Tabela 1.** Sumário de ensaios de mutagênese com a nuclease Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) (UniProtKB - Q99ZW2).

Posição	Mutação <sup>(1)</sup>	Consequência(s)	Referência
10	D → A	DNA-alvo não complementar ao crRNA não é clivado; atividade nicase	Nishimasu et al. (2014)
15	S → A	Redução da eficiência de clivagem do DNA-alvo	Nishimasu et al. (2014)
66	R → A	Redução significativa da eficiência de clivagem do DNA-alvo	Nishimasu et al. (2014)
70	R → A	Ausência de clivagem do DNA-alvo	Nishimasu et al. (2014)
74	R → A	Redução significativa da eficiência de clivagem do DNA-alvo	Nishimasu et al. (2014)
78	R → A	Redução moderada da eficiência de clivagem do DNA-alvo	Nishimasu et al. (2014)
97 – 150	Deleção	Ausência de atividade nucleásica	Nishimasu et al. (2014)
165	R → A	Redução moderada da eficiência de clivagem do DNA-alvo	Nishimasu et al. (2014)
175 – 307	Deleção	Perda de 50% da atividade nucleásica	Nishimasu et al. (2014)
302 – 409	Deleção	Ausência de atividade nucleásica	Nishimasu et al. (2014)
475 – 477	PWN → AAA	Leve redução na clivagem e na interação com o DNA-alvo	Jinek et al. (2014)
762	E → A	Clivagem de somente uma das fitas do DNA-alvo, provavelmente a não complementar ao crRNA	Nishimasu et al. (2014)
840	H → A	DNA-alvo complementar ao crRNA não é clivado; atividade nicase	Anders et al. (2014)
854	N → A	Redução da eficiência de clivagem do DNA-alvo	Nishimasu et al. (2014)
863	N → A	Clivagem de somente uma das fitas do DNA-alvo, provavelmente a complementar ao crRNA	Nishimasu et al. (2014)
982 – 983	HH → AA	Processamento correto o sgRNA	Fonfara et al. (2014)
982	H → A	Redução da eficiência de clivagem do DNA-alvo	Nishimasu et al. (2014)
983	H → A	Clivagem de somente uma das fitas do DNA-alvo, provavelmente a não complementar ao crRNA	Nishimasu et al. (2014)
986	D → A	Clivagem de somente uma das fitas do DNA-alvo, provavelmente a não complementar ao crRNA	Nishimasu et al. (2014)

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Posição	Mutação <sup>(1)</sup>	Consequência(s)	Referência
1099 – 1368	Deleção	Nenhuma atividade nucleásica é detectada	Nishimasu et al. (2014)
1125 – 1127	DWD → AAA	Nenhuma mudança na eficiência de clivagem, mas uma leve redução na interação com o DNA-alvo	Jinek et al. (2014)
1132	G → C	Inativação da proteína (provavelmente)	Jiang et al. (2013)
1133 – 1135	RKR → AKA	Quase perda completa da atividade nucleásica	Anders et al. (2014)
1133	R → A	Redução drástica da interação com o DNA-alvo, mas uma leve redução na eficiência de clivagem	Anders et al. (2014)
1135	R → A	Redução drástica da interação com o DNA-alvo, mas uma leve redução na eficiência de clivagem	Anders et al. (2014)

<sup>(1)</sup> Abreviação dos aminoácidos: A – alanina; D – ácido aspártico; E – ácido glutâmico; G – glicina; H – histidina; K – lisina; N – asparagina; P – prolina; R – arginina; S – serina; W – triptofano.

resultando, por exemplo, em uma visualização robusta de repetições teloméricas e suas movimentações ou de múltiplos locus genômicos em células vivas, além de permitir a visualização de interações proteínas-DNA (Chen et al., 2013; Dreissig et al., 2017). Em uma otimização do método, Khosravi et al. (2020) fusionaram proteínas fluorescentes a proteínas capazes de se ligar a aptâmeros inseridos no sgRNA, de forma a recrutar um maior número de proteínas repórteres, o que resultou em maior qualidade da marcação quando comparada à do sistema original.

O sistema CRISPR/dCas9 é uma ferramenta em potencial no contexto de regulação transcricional de genes codificadores e não codificadores de proteínas. Trata-se de uma ferramenta flexível, que pode ser usada tanto para a ativação (CRISPRa, ativador) como para a repressão (CRISPRi, interferente) da transcrição, reversível, pois não modifica permanentemente o genoma, e com capacidade de regulação em escala multigênica, uma vez que diversos genes podem ter sua expressão modulada simultaneamente e em sentidos opostos. Nessa metodologia, a dCas9 e/ou o sgRNA são fusionados a moduladores transcricionais (ModT), que atuam tanto na ativação quanto na repressão da transcrição. São proteínas ou domínios de proteínas capazes de se ligar ao DNA e recrutar elementos transcricionais-chave para o controle da expressão de genes.

A alternativa de fusão de ModT à dCas9 surgiu como necessidade de potencializar os efeitos da tecnologia CRISPRi (CRISPR interferente), inicialmente desenvolvida a partir da obstrução da transcrição, pela interferência física na ligação da RNA polimerase e de fatores de transcrição ao sítio de iniciação da transcrição (TSS,

do inglês *Transcription Start Site*), ou no processo de alongação (Qi et al., 2013) (Figura 2A). A estratégia de fusão de ModT à dCas9 não só permitiu a otimização da repressão transcricional, como também viabilizou o desenvolvimento de metodologia para a ativação (Gilbert et al., 2013). Dessa forma, CRISPR/dCas9 pode ser vista como uma plataforma genérica e universal, uma vez que é capaz de promover a ativação e repressão transcricional em diferentes níveis, além de ser transponível a diferentes espécies. Nesse sentido, um mesmo repressor ou ativador transcricional pode ser usado para a regulação da transcrição em células de diferentes espécies, com eficiências variando em função da região-genômica-alvo, desenho do sgRNA, estratégia de entrega (método de transformação) e do sistema biológico estudado.

Quando ModT atuam na regulação epigenética da cromatina, como é o caso de acetil e metiltransferases, a técnica é denominada de edição epigenômica (Hilton et al., 2015; Thakore et al., 2015). Em plantas, esse método foi utilizado para a indução da tolerância à seca em *Arabidopsis thaliana*, pela superexpressão do gene *AtAREB1* (do inglês *Abscisic Acid-Responsive Element Binding Protein 1*), utilizando a dCas9 fusionada a uma acetiltransferase 1 (Roca Paixão et al., 2019) e também para a alteração do tempo de floração, por meio da regulação epigenética do gene *AtFT* (do inglês *Flowering Locus T*) em *A. thaliana*, utilizando o sistema CRISPR/dCas9 associado a uma acetiltransferase ou a uma metiltransferase (Lee et al., 2019).

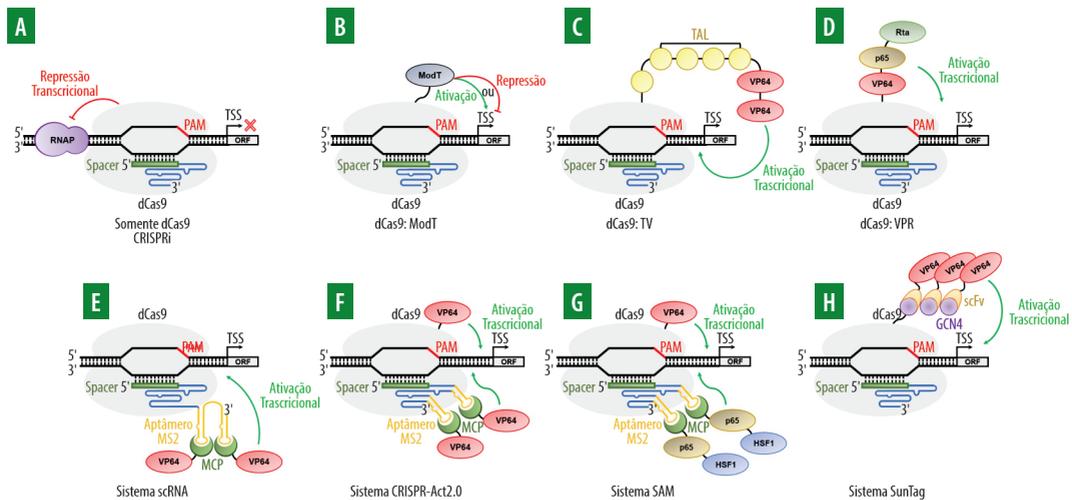
A seguir são apresentados os principais ModT, incluindo ativadores transcricionais (AtvT) e repressores transcricionais (RepT), e as principais estratégias para a modulação da expressão gênica por meio do sistema CRISPR/dCas9.

## Estratégias para a modulação da expressão gênica via CRISPR/dCas9

### Aumento da expressão gênica (CRISPRa)

#### Fusão de ativadores transcricionais à proteína dCas9 (dCas9:AtvT)

Esta pode ser considerada a estratégia pioneira para a ativação da transcrição em plantas pelo sistema CRISPR/dCas9. A sequência de um ativador transcricional (AtvT) é fusionada in tandem à região C-terminal da proteína dCas9. Esse complexo é direcionado especificamente a uma região promotora do gene-alvo pelo sgRNA (Figura 2B). Ativadores como o VP64, EDLL, TAD e HAT (Tabela 2) foram utilizados



**Figura 2.** Estratégias de uso da tecnologia CRISPR/dCas9 na modulação da expressão gênica. (A) Repressão (CRISPRi, interferente) via obstrução da RNA Polimerase (RNAP) pelo complexo dCas9-sgRNA; (B) Ativação ou repressão pela fusão em tandem de moduladores transcricionais (ModT) à dCas9; (C) Ativação pela combinação de ModTs (VP64 e TAD) fusionados à dCas9 (dCas9:VT); (D) Ativação pela combinação de ModTs (VP64:p65:Rta, VPR) fusionados à dCas9; (E) Sistema RNA *scaffold* (scRNA), em que o sgRNA contendo um aptâmero MS2 em sua extremidade 3' recruta ModT (VP64) via fusão a MCP (MS2 Coat Protein); (F) Sistema CRISPR-Act2.0 em que dCas9:VP64 é utilizada em combinação a um sgRNA modificado com dois aptâmeros MS2 que recrutam ModT via MCP; (G) Sistema SAM, otimização do sistema CRISPR-Act2.0, em que dCas9 é fusionada a uma combinação de ModTs (p65-HSF1); (H) Sistema SunTag que consiste na fusão da dCas9 a repetições in tandem do peptídeo GCN4 que recruta ModT (VP64) via anticorpo (scFv) que se liga a GCN4. Siglas: TSS – *transcription start site*; ORF – *open reading frame*; PAM – *protospacer adaptor motif*.

com sucesso para o aumento da expressão de genes codificadores e não codificadores (microRNAs) em plantas, podendo ser potencializada com o uso de múltiplos sgRNAs, para diferentes regiões de uma mesma região promotora (Lowder et al., 2015; Piatek et al., 2015; Roca Paixão et al., 2019; Vazquez-Vilar et al., 2016). No entanto, o número ideal de sgRNAs varia em função do sistema dCas9:AtvT utilizado, e seu uso excessivo pode levar ao aumento de alvos não específicos (*off-targets*). Ademais, o número de sgRNAs e dCas9 pode chegar ao ponto de saturação e levar à atenuação da transcrição devido à interferência estrutural da ligação física de múltiplos complexos dCas9-sgRNA a uma mesma região do DNA-alvo (Piatek et al., 2015; Roca Paixão et al., 2019).

Outro ponto a ser considerado é a posição dos sgRNAs. Em geral, os sgRNAs direcionados à região a montante do TATA box e do TSS correlacionam-se positivamente com a ativação gênica mediada por dCas9, provavelmente devido à interferência com o complexo de iniciação transcricional, enquanto o posicionamento da dCas9 a jusante ou nas proximidades do TATA box afeta negativamente a expressão de

Tabela 2. Principais moduladores transcricionais utilizados no sistema CRISPR/dCas em plantas.

Modulador	Tipo <sup>(1)</sup>	Origem	Referência
VP64	AtvT	Repetição tetramérica artificial do domínio mínimo de ativação da proteína VP16 do Herpes-Vírus Simples	Beerli et al. (1998)
EDLL	AtvT	Domínio do ativador transcricional AtERF98 (fator de resposta ao etileno) de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Tiwari et al. (2012)
TAD	AtvT	Domínio de ligação ao DNA do tipo ativador transcricional Hax3 de <i>Xanthomonas campestris</i>	Mahfouz et al. (2011)
TV	AtvT	6x TAD + 2x VP64	Li et al. (2017)
VPR	AtvT	Ativador tripartido contendo VP64, p65 (subunidade <i>trans</i> -ativadora NF-kB) e Rta	Chavez et al. (2015)
HAT	AtvT	Núcleo catalítico da histona acetiltransferase 1 de <i>A. thaliana</i>	Roca Paixão et al. (2019)
p65-HSF	AtvT	Subunidade <i>trans</i> -ativadora NF-kB fusionada ao domínio de ativação do fator heat-shock (HSP1) de humanos	Konermann et al. (2015)
SRDX	RepT	Domínio de repressão do motivo EAR (motivo anfífilo de repressão associado a ERF)	Ohta et al. (2001)
KYP	RepT	Domínio SET da metiltransferase H3K9 KRYPTONITE (KYP) de <i>A. thaliana</i>	Jackson et al. (2002)
BRD	RepT	Domínio de repressão B3 de fatores de transcrição de <i>A. thaliana</i>	Ikeda e Ohme-Takagi (2009)
KRAB	RepT	Domínio repressor de fatores de transcrição que contém o motivo do tipo <i>Krüppel</i> dedo de zinco de tetrápodes	Mark et al. (1999)

<sup>(1)</sup> AtvT – Ativador Transcricional; RepT- Repressor Transcricional

genes, provavelmente devido ao impedimento físico da maquinaria de transcrição pela dCas9 (Deaner; Alper, 2017; Farzadfard et al., 2013). No entanto, a distância ótima do sgRNA a montante do TSS para o máximo de ativação gênica pode variar em função do tipo de AtvT utilizado (Piatek et al., 2015).

A escolha da fita de DNA (senso ou antissenso) também influencia a eficiência do método. Apesar de não haver um consenso, sgRNAs situados na fita senso e próximos ao sítio de início da transcrição geralmente são mais eficientes em ativar a transcrição, uma vez que aqueles localizados na fita antissenso podem impedir a ligação da RNA polimerase e o início da transcrição ou levarem a uma terminação prematura da transcrição (Howe et al., 2017; Piatek et al., 2015).

Dessa forma, quanto maior for o conhecimento teórico e experimental a respeito da estrutura e funcionalidade da região promotora-alvo (composição e participação de *cis*-elementos, recrutamento de fatores de transcrição, posição do TSS, entre outros), maior será a probabilidade de sucesso experimental da tecnologia dCas9. Por isso, sugere-se fortemente que, em um primeiro momento, diferentes sgRNAs, em diferentes combinações, posições e orientações, sejam testados em sistemas de expressão transiente.

Outra variação dessa estratégia é a fusão de múltiplos ativadores à sequência dCas9. No sistema dCas9:VP, por exemplo, a proteína dCas9 foi fusionada a seis módulos TAD seguidos de dois VP64, o que proporcionou um aumento de expressão de até 190 vezes em comparação à expressão basal do gene endógeno, tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas (Figura 2C). O sistema dCas9:VP mostrou-se eficiente em um sistema multiplex, promovendo o aumento da expressão simultânea de três genes, e também foi eficaz em um sistema *DNA-free*, utilizando complexos de ribonucleoproteínas (RNP), porém com menor nível de ativação gênica (Tabelas 2 e 3) (Li et al., 2017). No entanto, os efeitos da fusão de mais de um ativador à dCas9 nem sempre são aditivos. A fusão dCas9:VP64:EDLL, por exemplo, resultou em uma modesta ativação de genes endógenos, inferior ao clássico sistema dCas9:VP64, muitas vezes considerado fraco e ineficiente em células vegetais (Tabela 3) (Li et al., 2017; Lowder et al., 2018). Deve-se levar em consideração que a fusão de um número excessivo de ativadores pode desencadear a degradação de mRNAs em função do alto número de sequências repetitivas (Li et al., 2017).

Uma observação interessante é a de que existe uma correlação negativa entre a expressão endógena basal do gene e a magnitude do aumento da expressão via dCas9:AtvT, uma vez que genes endógenos com expressão basal menor são mais passíveis de serem mais fortemente induzidos por esse sistema, em comparação com aqueles com transcrição basal mais intensa (Li et al., 2017; Lowder et al., 2018).

### Modificação da estrutura de sgRNAs para o recrutamento de ativadores

Mesmo com todos os aperfeiçoamentos, a estratégia de fusão de ModT à proteína dCas9 pode não ser capaz de modular satisfatoriamente os níveis de expressão de genes-alvo. Além disso, a relação um para um, inerente em um sistema dCas9-sgRNA, restringe a programação de circuitos de genes, baseados em transcrição multigênica a apenas uma direção de regulação: repressão ou ativação. Isso não corresponde à complexidade e sofisticação subjacentes às redes de transcrição nativas. No entanto, em analogia à fusão de ModTs com a dCas9, a engenharia do próprio sgRNA provou ser uma plataforma modular e regulável para diversificar

Tabela 3. Estratégias de uso do sistema CRISPR/dCas9 para a ativação da expressão gênica em plantas.

Espécie vegetal	Gene-alvo	Estratégia CRISPR/dCas9	Sistema de transformação	Nível de ativação	Referência	
<i>A. thaliana</i>	AtPAP1	dCas9:VP64		7,0 x		
		dCas9:VP64-EDLL		4,0 x	Lowder et al. (2015)	
		dCas9:VP64-MS2-VP64	Plantas transgênicas	45,0 x	Lowder et al. (2018)	
		dCas9:VP64-MS2-EDLL		30,0 x	Park et al. (2017)	
		dCas9:VP64- MS2-p65-HSF		3,0 x		
	AtFIS2	dCas9:VP64			200,0 x	
		dCas9:VP64-EDLL			2,5 x	
		dCas9:VP64-MS2-VP64	Plantas transgênicas		1500,0 x	Lowder et al. (2018)
		dCas9:VP64-MS2-EDLL			30,0 x	
	miR319	dCas9-VP64			7,5 x	Lowder et al. (2015);
		dCas9:VP64-MS2-VP64	Plantas transgênicas		6,0 x	Lowder et al. (2018)
		dCas9:VP64-MS2-VP64 + 3sgRNA			2,5 x	
AtUULC1	dCas9:VP64-MS2-VP64 + 3 sgRNAs	Plantas transgênicas		40,0 x	Lowder et al. (2018)	
	dCas9:TV	Plantas transgênicas		139,0 x	Li et al. (2017)	
AtWRKY	dCas9:TV + RNP	Protoplasto/PEG		11,7 x		
	dCas9:TV			510,0 x		
pWRKY::luciferase	dCas9:VP64-MS2-TV	Protoplasto/PEG		170,0 x	Li et al. (2017)	
	dCas9:VP64-			6,7 x		
AtRLP23	dCas9:TV	Plantas transgênicas		30,0 x		
	dCas9:TV	Protoplasto/PEG		44,0 x	Li et al. (2017)	
	dCas9:TV + RNP	Protoplasto/PEG		9,3 x		

Continua...

Tabela 3. Continuação.

Espécie vegetal	Gene-alvo	Estratégia CRISPR/dCas9	Sistema de transformação	Nível de ativação	Referência
<i>A. thaliana</i>	<i>AtWRKY</i>			80,0 x	
	<i>AtRLP23</i>	dCas9:TV multiplex	Protoplasto/PEG	37,0 x	Li et al. (2017)
	<i>AtCDG1</i>			192,0 x	
	<i>AtAREB1</i>	dCas9:HAT	Plantas transgênicas	1,7 x	Roca Paixão et al. (2019)
	<i>AtFWA</i>			1,5 x	
	<i>AtAPETALA3</i> <i>AtCLAVATA3</i> <i>Evadé transposon</i>	dCas9:SunTag-VP64	Plantas transgênicas	500,0 x 100,0 x 4000,0 x	Papikian et al. (2019)
<i>N. benthamiana</i>	<i>AtAVP1</i>	dCas9:VP64-MS2-p65-HSF SAM	Plantas transgênicas	5,0 x	Park et al. (2017)
	<i>AtFT</i>	Cas9-MS2-VP64	Plantas transgênicas	30,0 x	Lee et al. (2019)
	<i>NbPDS</i>	dCas9:EDLL + 3 sgRNAs	Agroinfiltração	3,4 x	Piatek et al. (2015)
		dCas9:TAD + 3 sgRNAs		4,0 x	
	<i>pNOS::luciferase</i>	dCas9:VP64	Agroinfiltração	3,0 x	Vazquez-Vilar et al. (2016)
		dCas9:EDLL		3,0 x	
		dCas9:EDLL-MS2-VP64		4,0 x	
		dCas9:SunTag-VP64		3,5 x	
		dCas9:SunTag -EDLL		3,0 x	Selma et al. (2019)

Continua...

Tabela 3. Continuação.

Espécie vegetal	Gene-alvo	Estratégia CRISPR/dCas9	Sistema de transformação	Nível de ativação	Referência
<i>O. sativa</i>	<i>OsGW7</i>	dCas9:TV	Protoplasto/PEG	79,0 x	Li et al. (2017)
	<i>OsER1</i>	dCas9:TV	Protoplasto/PEG	62,0 x	Li et al. (2017)
		dCas9:TV + RNP		13,0 x	
	<i>Os03g01240</i>	dCas9:VP64	Protoplasto/PEG	2,0 x	Lowder et al. (2018)
		dCas9:VP64-MS2-VP64 + 2 sgRNAs		3,0 x	
	<i>Os04g39780</i>	dCas9:VP64	Protoplasto/PEG	0,0	Lowder et al. (2018)
		dCas9:VP64-MS2-VP64 + 2 sgRNAs		4,0 x	
	<i>Os03g01240</i>	dCas9:VP64 multiplex	Protoplasto/PEG	2,0 x	Lowder et al. (2018)
				2,0 x	
				2,0 x	
	<i>Os04g39780</i>	dCas9:VP64-MS2-VP64 multiplex	Protoplasto/PEG	3,0 x	Lowder et al. (2018)
				6,5 x	
2,5 x					

não apenas as posições a serem reconhecidas nos genomas-alvo, mas também diversificar a função da regulação transcricional mediada pelo sistema CRISPR. Essa estratégia é baseada na modificação da estrutura do sgRNA pela adição de aptâmeros de RNA, tornando-o capaz de recrutar à região promotora-alvo proteínas adaptadoras fusionadas a ModTs. A ação desse maior número de ModT ampliou a magnitude dos níveis de ativação propiciada pela modulação clássica mediada pela dCas9:ModTs (Konermann et al., 2015; Zalatan et al., 2015).

Os primeiros sistemas que desenharam sgRNAs com aptâmeros de RNA que interagem com proteínas aproveitaram sua extremidade 3' para inserir sequências reconhecidas por proteínas específicas como a MCP, que, devidamente fusionadas com ModTs, interagem de maneira ortogonal com os aptâmeros como o MS2 fusionados à porção *RNA scaffold* de sgRNAs, permitindo a especificidade do alvo no genoma, juntamente com a função moduladora. Esse sistema foi denominado *scaffold RNA (scRNA)* (Figura 2E) (Jensen et al., 2017; Kiani et al., 2015; Zalatan et al., 2015).

Posteriormente, no desenvolvimento de um segundo sistema, foi mostrado que a região do *RNA scaffold* assume uma estrutura secundária específica, formada por um *tetraloop* e 3 *stem loops*, importante para a ancoragem do sgRNA na Cas9/dCas9 (Figura 1). Ficou evidente que o *tetraloop* e o *stem loop 2* se projetam para fora do complexo da dCas9-sgRNA, com os quatro pares de bases distais de cada haste completamente livres de interações com as cadeias laterais dos aminoácidos da proteína. Estudos de funcionalidade demonstraram que substituições e deleções nas regiões do *tetraloop* e do *stem loop 2* não afetam a função de reconhecimento do DNA-alvo pela dCas9 e que podem tolerar a adição de aptâmeros de RNA (por exemplo, MS2), que, por sua vez, são reconhecidos por proteínas específicas (por exemplo, MCP). Quando fusionadas com ModTs, essas proteínas específicas recrutam um maior número de ModT para a região-alvo no genoma, reconhecida pelo complexo dCas9-sgRNA. A tecnologia de combinação de ModTs fusionados à dCas9 e à estrutura secundária do sgRNA foi nomeada como mediador de ativação sinérgica (SAM, do inglês *Synergistic Activation Mediator*). Um sistema similar adaptado para plantas com utilização do AtvT VP64 foi denominado CRISPR-Act2.0 (Figura 2 F e G)(Konermann et al., 2015; Li et al., 2017; Lowder et al., 2018; Nishimasu et al., 2014).

Em plantas, esses sistemas já tiveram eficácia comprovada com o uso de variadas combinações de AtvT (Tabela 2) (Lee et al., 2019; Lowder et al., 2018; Selma et al., 2019). O sistema CRISPR-Act2.0 apresentou capacidade superior de ativação de três genes simultaneamente, em esquema multiplex, quando comparado ao sistema clássico dCas9:VP64 (Tabela 3) (Lowder et al., 2018). A eficiência do siste-

ma, no entanto, pode variar em função do gene-alvo, tipo de ativadores utilizados e quantidade de sgRNAs. Por exemplo, ao mesmo tempo em que o sistema dCas9:VP64-MS2:VP64 foi capaz de ativar a expressão do gene *AtFIS2* de *A. thaliana* em até 1.500 vezes, estratégia similar, com utilização de dCas9:VP64-MS2:EDLL para a ativação desse mesmo gene, apresentou resultado inferior ao obtido pelo sistema clássico dCas9:VP64 (Tabela 3) (Lowder et al., 2018). Esses mesmos autores lançaram a hipótese de que para muitos genes deve haver um limite máximo de aumento de expressão e que níveis superiores podem desencadear o silenciamento gênico pós-transcricional, pela produção de pequenos RNAs interferentes. Dessa forma, estratégias que deveriam otimizar o sistema de ativação gênica via CRISPR/dCas9 nem sempre resultam no efeito desejado, como exemplificado na ativação de miR319 em *A. thaliana* (Tabela 3) (Lowder et al., 2018, 2015).

### Sistema SuperNova Tag (SunTag) para ativação gênica

Esta estratégia foi delineada primeiramente em células de mamíferos na tentativa de otimizar o aumento da expressão gênica via dCas9, visando potencializar o número de ativadores na região promotora-alvo. Neste método, a dCas9 é fusionada a repetições in tandem ao peptídeo GCN4, que recruta múltiplas cópias de ModT, via ligação a um anticorpo (scFv), que se liga a GCN4 (Figura 2H) (Tanenbaum et al., 2014). Em plantas, essa estratégia foi adaptada com utilização do AtvT VP64, tornando-se capaz de promover o aumento da transcrição de genes endógenos e elementos transponíveis em até 4.000 vezes (Tabela 3) (Papikian et al., 2019). Uma variação da técnica é a substituição de VP64 pelo domínio catalítico de metiltransferases para estabelecer a metilação em regiões promotoras e o controle da transcrição. Dessa forma, o sistema dCas9-SunTag pode ser uma potente ferramenta para a modulação epigenômica sítio-específica. Trata-se de um sistema altamente específico, capaz de promover a ativação transcricional de genes, tanto na eucromatina como na heterocromatina, e com efeitos herdáveis ao longo de múltiplas gerações, mesmo na ausência do transgene (Papikian et al., 2019). Além disso, o uso do sistema dCas9-SunTag associado a um domínio catalítico de metiltransferases minimiza significativamente a metilação não específica generalizada, comum quando esses domínios são fusionados diretamente à dCas9 (Pflueger et al., 2018).

### Redução da expressão gênica (CRISPRi)

A dCas9 sozinha é capaz de inibir fisicamente a elongação ou o início da transcrição de um gene-alvo, pelo impedimento da ligação ao complexo transcricional, quando direcionada à sua região promotora, nas proximidades do TATA-Box ou TSS,

ou à sua região codificadora (Figura 2A). A estratégia CRISPRi é uma plataforma eficiente para a regulação negativa direcionada da expressão de genes, com efeitos reversíveis e pouca incidência de *off-targets*, podendo ser aplicada em escala multi-gênica (Qi et al., 2013). Trata-se de uma plataforma funcional em eucariotos e uma estratégia alternativa para a modulação da expressão gênica em procariotos, que não possuem maquinaria de RNA interferente (RNAi).

Em plantas, a eficiência do método foi demonstrada em sistemas transientes de transformação, atingindo até 80% de repressão da expressão de um gene repórter (Tabela 4) (Piatek et al., 2015; Vazquez-Vilar et al., 2016). Estes últimos autores demonstraram a interferência direta da posição do complexo dCas9-sgRNA, de forma que a expressão gênica detectada foi menor para sgRNAs localizados mais próximos ao TSS. Observaram também um efeito aditivo modesto e não significativo do uso simultâneo de dois ou três sgRNAs na redução da expressão gênica (Tabela 4) (Vazquez-Vilar et al., 2016).

### Fusão de repressores transcricionais à proteína dCas9 (dCas9:RepT)

Seguindo metodologia semelhante à descrita anteriormente, nesta estratégia, a sequência da dCas9 é fusionada in tandem a um ou mais repressores transcricionais (RepTs) (Tabela 2). Em plantas, o mais utilizado até o momento é o SRDX, que, além de ser compatível com um sistema multiplex, teve sua máxima eficiência quando três domínios foram fusionados à dCas9, chegando a reduzir a expressão gênica em até 80% (Lowder et al., 2018, 2015; Sarasua, 2020; Vazquez-Vilar et al., 2016). O RepT KRAB, apesar de muito usado em modelos animais, foi ineficiente e instável na modulação da expressão gênica em plantas, mesmo quando testado em diversos contextos, variando a posição do sgRNA em relação ao TSS e até a nuclease Cas (Tabela 4). Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de KRAB ser um motivo exclusivo de tetrápodes, o que limitaria sua capacidade em recrutar proteínas moduladoras da cromatina em células vegetais (Sarasua, 2020).

Interessantemente, o sistema dCas9:SRDX foi capaz de mascarar os efeitos de ativação gênica de dCas9:EDLL e dCas9:TAD, mantendo a expressão gênica em níveis basais quando esses ModTs foram utilizados conjuntamente (Piatek et al., 2015). Apesar de a estratégia dCas9:RepT ser uma ferramenta útil para a modulação da expressão gênica, em alguns casos, sua eficiência foi semelhante ou inferior à observada quando a redução da transcrição foi induzida somente pela proteína dCas9 (Tabela 4) (Sarasua, 2020; Vazquez-Vilar et al., 2016).

Outro ponto a destacar é o fato de, até o momento, esse sistema ter sido observado em plantas apenas quando RepTs foram utilizados. Isso porque a utilização de ortólogos específicos da proteína Cas parece tornar o sistema mais eficiente.

Tabela 4. Estratégias de uso do sistema CRISPR/dCas9 para a repressão da expressão gênica em plantas.

Espécie vegetal	Gene-alvo	Estratégia CRISPR/dCas9	Nível de repressão	Sistema de transformação	Referência
<i>A. thaliana</i>	<i>AtCSTF64</i>	dCas9:3x (SRDX) + 3 sgRNAs	60	Plantas transgênicas	Lowder et al. (2015)
	<i>miR159A</i>	dCas9: 3x (SRDX) multiplex	80	Plantas transgênicas	Lowder et al. (2015)
	<i>miR159B</i>		70		
	<i>miR159B</i>	dCas12a:3x (SRDX)	90	Plantas transgênicas	Tang et al. (2017)
<i>AtFT</i>	dCas9-MS2-SRDX	0	Plantas transgênicas	Lee et al. (2019)	
	dCas9-MS2-KYP	40			
<i>N. benthamiana</i>	<i>NbPDS</i>	dCas9	20	Agroinfiltração	Piatek et al. (2015)
		dCas9:SRDX	50		
		dCas9	80	Agroinfiltração	VazquezVilar et al. (2016)
		dCas9 + 2 sgRNA	85		
		dCas9 + 3 sgRNAs	85		
		dCas9:SRDX	50		
		dCas9:SRDX + 3 sgRNAs	50		
		dCas9:BRD	40		
		dCas9:BRD + 3 sgRNAs	70		
		dCas9:BRD		Agroinfiltração	Sasuna (2020)
		dCas9:BRD + 2 sgRNAs	30		
		dCas9:SunTag – BRD	30		
		dCas9:SunTag – BRB + 2 sgRNA	30		
		dCas9:SRDX	40		
<i>pNOS:</i>	dCas9:SRDX + 2sgRNAs	40			
<i>luciferase</i>	dCas9:SunTag - SRDX	65			
	dCas9:KRAB	40			
	dCas12a:BRD	30			
	dCas12a:BRD + 2sg RNA	80			
	dCas12a:SunTag – BRD	60			
	dCas12a:SunTag – BRD + 2sgRNAs	80			
		90			
	dCas12a:SRDX	80			
	dCas12a:SRDX + 2sg RNA	80			
	dCas12a:SunTag – SRDX	80			
	dCas12a:SunTag – SRDX+ 2 sgRNA	90			
		30			
	dCas12a:KRAB				

Tang et al. (2017), por exemplo, ao utilizarem a nuclease dCas12a (também denominada dCpf1) fusionada a três domínios do RepT SRDX [dCas12a:3x (SRDX)], observaram redução de até 90% na transcrição do *miR159B* de *A. thaliana*. Em sistema semelhante, utilizando dCas9:3x (SRDX), esse valor foi de aproximadamente 70% (Tabela 4) (Lowder et al., 2018). Sarasua (2020) também observou a superioridade da nuclease dCas12a, comparada à dCas9, quando ambas foram fusionadas aos RepTs SRDX e BRD para a redução da expressão de um gene repórter, em um sistema transiente de transformação. Também foi observado um efeito aditivo variável e significativo do uso de dois sgRNAs apenas para a combinação dCas9:SRDX, não havendo diferença quando um ou dois sgRNAs foram usados nas combinações dCas9:BRD e dCas12a:SRDX. Já para dCas12a:BRD, o uso de dois sgRNAs foi menos eficiente (Tabela 4). O fato de a dCas12a atuar com mais eficiência na repressão da transcrição gênica, em comparação à dCas9, pode estar relacionado ao tamanho dessas nucleases, o que facilitaria seu acesso à região genômica-alvo e a modificação da cromatina (Sarasua, 2020). Enquanto dCas12a possui, aproximadamente, 1.250 aminoácidos, dCas9 possui 1.368 aminoácidos.

### Modificação da estrutura de sgRNAs para o recrutamento de repressores

Apesar de ser uma estratégia bastante utilizada para a ativação da transcrição gênica, há na literatura até o momento apenas um estudo utilizando a metodologia CRISPR-Act2.0 para a repressão da transcrição gênica em plantas (Lee et al., 2019). Os autores relataram a ineficiência do método com utilização do RepT SRDX, porém foi possível atingir níveis de repressão mediana com outro RepT (KYP) (Tabela 4).

### Sistema SuperNova Tag (SunTag) para repressão gênica

Esta estratégia foi bastante explorada em um estudo detalhado realizado por Sarasua (2020), que variou diversos parâmetros do método, como posição do sgRNA em relação ao TSS, número de sgRNAs (1 ou 2), tipo de nuclease Cas (dCas9 ou dCas12a), tipo de RepT (SRDX ou BRD) e tamanho dos espaçadores (5 ou 22 aminoácidos) entre os epítomos GCN4, em um sistema transiente de expressão gênica para o monitoramento da expressão do gene repórter da luciferase guiado pelo promotor da nopalina (*pNOS*). Para fins de otimização do método em plantas, foi observada maior eficiência com a utilização da nuclease dCas12a (Tabela 4), provavelmente devido ao seu menor tamanho em comparação à dCas9, conforme discutido anteriormente, e de espaçadores maiores, de 22 aminoácidos entre epítomos, uma vez que espaçadores menores podem oferecer impedimentos estéricos à ligação de anticorpos. No geral, o sistema SunTag promoveu níveis de repressão gênica similares aos observados com a estratégia de dCas:RepT, mostrando-se pou-

co superior quando foram utilizados dois sgRNAs, com a dCas12a (dCas12a:Suntag – SRDX/BRD + 2 sgRNA). Não foi observada diferença marcante entre os dois RepTs testados (SRDX e BRD) (Tabela 4).

## Desenho experimental: importantes aspectos a serem considerados

Como visto anteriormente, a modulação epigenética transcricional mediada pela tecnologia CRISPR contribui significativamente para o entendimento e controle ortogonal das regulações transcricionais e pós-transcricionais, visando avaliar e manipular eventos celulares pela modulação da expressão de moléculas desejadas. Em comparação com outros métodos, como a tecnologia de RNAi, a utilização da tecnologia CRISPR é fácil e oferece um direcionamento mediado por RNA de genes individuais ou múltiplos, o que a torna uma ferramenta poderosa no estudo da regulação transcricional nativa multifatorial de diversos organismos, incluindo plantas (Deaner et al., 2017; Jensen et al., 2017; Zalatan et al., 2015).

Além disso, conjuntos únicos de experimentos de transformação (multiplex) podem ser facilmente implementados, e a possibilidade da utilização de mais de um sgRNA permite uma rápida progressão por meio de ciclos de engenharia genética interativos. Sendo assim, é possível aplicar uma rápida avaliação dos efeitos combinatórios de variações na expressão gênica, a fim de identificar alvos primários e secundários que não podem ser conhecidos a priori com a variação na expressão de um único gene. Mesmo assim, existem muitas considerações a respeito do desenho experimental que devem ser levadas em conta ao se usar o sistema CRISPR para edição de bases ou modulação da transcrição de genes. Dessa forma, serão abordados por meio de tutoriais, nos tópicos a seguir, dois aspectos importantes: 1) desenho do sgRNA; e 2) desenho do cassete de transformação (vetores plasmidiais).

## Desenho dos sgRNAs

### Embasamento teórico para a escolha do melhor software/plataforma

Dois principais desafios para a aplicação biotecnológica do sistema CRISPR/Cas estão associados com o desenho correto do sgRNA: 1) predição confiável de *off-targets*; e 2) eficiência no reconhecimento de *on-targets* (Xu et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Os parâmetros para o desenho correto dos sgRNAs, utilizados na tecnologia CRISPR/dCas9, são basicamente os mesmos a serem considerados para proteínas Cas nativas, mesmo que a eficiência de clivagem não seja um fator importante nessa tecnologia. Dessa forma, três passos principais devem ser seguidos para o desenho de um sgRNA: 1) identificação das sequências PAM na região a ser editada; 2) seleção de uma sequência de 20 nucleotídeos a montante de PAM (excluindo-o), nomeada como *spacer*; e 3) adição do *spacer* à extremidade 5' do *RNA scaffold*, importante na ancoragem do sgRNA nas proteínas Cas9/dCas9. O desenho experimental bem-sucedido do sgRNA, mais especificamente do *spacer*, engloba a predição tanto dos *on-targets* quanto dos *off-targets* (Doench et al., 2016; Tang et al., 2018).

Para sgRNAs desenhados para a Cas9, guaninas são preferidas nas posições 1 e 2 antes da sequência PAM (NGG), enquanto a presença de timinas nas posições +4 e -4, que cercam PAM, desfavorecem a eficiência de clivagem (Wang et al., 2014). Além disso, as regiões a jusante de PAM podem influenciar a eficiência de clivagem e a especificidade do sgRNA, enquanto as sequências a montante geralmente não apresentam efeito significativo a respeito desses parâmetros (Doench et al., 2014). A citosina é preferida no local de clivagem pela Cas9 (posição -3 próximo ao PAM) (Cong et al., 2013; Xu et al., 2015), e um alto conteúdo de GC na região que compreende as bases 4-13, a jusante da sequência PAM, contribui para a eficiência de clivagem e especificidade do sgRNA. O tamanho do sgRNA é também um fator crucial para a especificidade do alvo da Cas9, uma vez que o seu tamanho mínimo para experimentos visando o nocaute genético é de 17 nucleotídeos (Fu et al., 2014). Já para a modulação transcricional e epigenética mediada por dCas9, o melhor tamanho do sgRNA é de 20 nucleotídeos, uma vez que a redução no tamanho dos sgRNAs diminui significativamente a eficácia da regulação transcricional mediada por dCas9 (Kiani et al., 2015; Smith et al., 2016). Existe certo grau de flexibilidade no desenho das posições distais de sgRNAs desenhados para reconhecer promotores de genes em regiões ricas em nucleossomos ou sequências de ativação a montante (UASs, do inglês *upstream-activating sequences*) (Kiani et al., 2015; Smith et al., 2016).

Ferramentas computacionais poderosas são continuamente desenvolvidas e atualizadas para facilitar cada vez mais o desenho experimental *in silico* de sgRNAs para fins biotecnológicos (Chuai et al., 2017; Graham; Root, 2015; Wilson et al., 2018). Porém, como escolher o melhor software/plataforma para o desenho de sgRNAs diante da diversidade de opções? Para facilitar a escolha, é preciso saber o que cada um oferece, destacando seus pontos positivos e limitações. Sendo assim, vários modelos de previsão de eficiência *in silico* foram desenvolvidos, baseados nas principais observações experimentais na área. O *Conjunto de Regras 1* é um modelo preditivo baseado em um sistema de pontuação associado a um método

de aprendizado *in silico*, que classifica os dados de maneira linear e generalizada, a fim de avaliar a eficiência de corte da Cas9, com alta correlação a resultados experimentais (Doench et al., 2014; Liu et al., 2020). Para melhorar a precisão, estudos independentes adaptaram mais conjuntos de dados e construíram um novo modelo, denominado *Conjunto de Regras 2*, no qual análises de nucleotídeos, independentemente da posição e da localização do sgRNA dentro da região a ser editada, podem melhorar a previsão de *off-targets* e *on-targets* (Doench et al., 2016; Liu et al., 2020).

Os softwares e algoritmos desenvolvidos para prever a especificidade dos sgRNAs (determinação de *off-targets*) possuem variados tipos de entrada de dados (*input*) (Tabela 5), mas todos são baseados em dois métodos principais: 1) método baseado em alinhamento, usado principalmente para descobrir *in silico* todos os possíveis *off-targets*; e, 2) método baseado em pontuação (*score*), no qual os sgRNAs são pontuados e classificados de acordo com uma matriz de *off-targets* identificados por alinhamento.

Em teoria, os potenciais *off-targets* podem ser identificados ao se alinhar as sequências de sgRNAs ao genoma de referência, com base na similaridade da sequência. As ferramentas *Bowtie* (Langmead et al., 2009) são capazes de detectar *off-targets*, mas não conseguem identificar pequenos PAMs, uma vez que foram desenvolvidas para o alinhamento de *reads* provenientes de sequenciamento de nova geração (NGS) (Haeussler et al., 2016; Wilson et al., 2018). Além disso, essas ferramentas permitem um número muito limitado de *mismatches*, tornando impraticável a identificação de todos os *off-targets* em potencial (Langmead e Salzberg, 2012). Deve-se considerar também que nem todas as posições de nucleotídeos que contêm *mismatches* têm o mesmo efeito decisivo na clivagem de *off-targets* e que a previsão baseada em alinhamento sempre identifica *off-targets* redundantes, dos quais muitos são falso-positivos. Levando em consideração esses fatores, entre as ferramentas baseadas exclusivamente em alinhamentos, os softwares CasOFFinder e FlashFry são as melhores opções (até o momento) para identificar os possíveis *off-targets* para qualquer nuclease Cas (Liu et al., 2020). Vale a pena destacar a alta velocidade de processamento e *outputs* de fácil compreensão do FlashFry.

Para melhorar a forma de detecção de *off-targets*, o método baseado em pontuação (*score*) foi desenvolvido utilizando-se basicamente duas abordagens: 1) orientada por hipóteses, em que os *off-targets* são pontuados com base na contribuição de fatores específicos do contexto do genoma para a especificidade do sgRNA; e 2) baseada na aprendizagem, em que os sgRNAs são pontuados e previstos a partir de um modelo de treinamento, que considera os diferentes recursos que afetam a especificidade.

Tabela 5. Ferramentas on-line mais usadas para o design de sgRNAs<sup>(1)</sup>.

Ferramenta	Sítio na Web	Espécies	Entrada de Dados (Input)
Benchling	<a href="https://www.benchling.com">https://www.benchling.com</a>	Diversas	Sequência de DNA; ID do gene
CCTop	<a href="https://crispr.cos.uni-heidelberg.de">https://crispr.cos.uni-heidelberg.de</a>	Diversas	Sequência de DNA
CHOPCHOP	<a href="https://chopchop.cbu.uib.no">https://chopchop.cbu.uib.no</a>	Diversas	Sequência de DNA; TSS; localização ou ID do gene
CRISPETA	<a href="http://crispeta.crg.eu">http://crispeta.crg.eu</a>	Espécies Modelo	Sequência de DNA; localização ou ID do gene
CRISPOR	<a href="http://crispor.tefor.net">http://crispor.tefor.net</a>	Diversas	Sequência de DNA; localização ou ID do gene
CRISPR-ERA	<a href="http://CRISPR-ERA.stanford.edu">http://CRISPR-ERA.stanford.edu</a>	Diversas	Sequência de DNA; TSS; ID do gene
CRISPR-GE	<a href="http://skl.scau.edu.cn">http://skl.scau.edu.cn</a>	Plantas	Sequência de DNA; localização ou ID do gene
CRISPR-P 2.0	<a href="http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2">http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2</a>	Plantas	Sequência de DNA; localização ou ID do gene
CRISPR-PLANT	<a href="https://www.genome.arizona.edu/crispr2">https://www.genome.arizona.edu/crispr2</a>	Plantas	Sequência de DNA; localização ou ID do gene
CRISPR RGEN Tools	<a href="http://www.rgenome.net">http://www.rgenome.net</a>	Diversas	Sequência de DNA; localização ou ID do gene; sgRNA
CRISPRscan	<a href="https://www.crisprscan.org">https://www.crisprscan.org</a>	Espécies Modelo	Sequência de DNA; localização ou ID do gene
E-CRISP	<a href="http://www.e-crisp.org/E-CRISP">http://www.e-crisp.org/E-CRISP</a>	Diversas	Sequência de DNA; ID do gene
EuPaGDT	<a href="http://grna.ctegd.uga.edu">http://grna.ctegd.uga.edu</a>	Patógenos Eucarióticos	Sequência de DNA
FlyCRISPR	<a href="https://flycrispr.org/">https://flycrispr.org/</a>	Insetos	Sequência de DNA
Yeastrixtion	<a href="http://yeastrixtion.tnw.tudelft.nl/#!/">http://yeastrixtion.tnw.tudelft.nl/#!/</a>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ID do gene

<sup>(1)</sup> As informações aqui apresentadas estão sujeitas a atualizações dos sítios na Web.

Na abordagem orientada por hipóteses, a pontuação MIT (Hsu-Zhang) avalia as contribuições de *mismatches* em diferentes posições ao longo de todo o sgRNA com a utilização de uma matriz de peso para identificação de possíveis *off-targets*. A pontuação MIT foi integrada a ferramentas de desenho de sgRNA, tais como CHOPCHOP (Labun et al., 2016) e CRISPOR (Haeussler et al., 2016). De forma complementar, mas independente do sistema MIT, a determinação da frequência de corte (CFD, do inglês *cutting frequency determination*) é outro sistema de pontuação popular para avaliação de *off-targets*, em que a presença de PAMs não canônicas (NAG, NCG e NGA) são inseridas como fatores importantes na pontuação, assim como *indels* e *mismatches* nas sequências-alvo. O *score* CFD está inserido nas ferramentas GUIDE-Seq (Tsai et al., 2015), CRISPRscan (Moreno-Mateos et al., 2015), GuideScan (Perez et al., 2017), CRISPOR (Haeussler et al., 2016) e Benchling (Doench et al., 2016), provando ter um desempenho melhor que o *score* MIT. Posteriormente, a previsão da especificidade do sgRNA com base nas características estruturais do complexo Cas9-sgRNA provou ser superior à previsão baseada somente nas características da sequência. As CRISPROff (Alkan et al., 2018) e uCRISPR (Zhang et al., 2019a) utilizam propriedades energéticas para avaliação de *off-targets*. Ambas, quando comparadas com ferramentas que utilizam outros métodos de pontuação, como MIT e CFD, se mostraram mais precisas na predição de *off-targets*. No entanto, nenhuma delas foi avaliada sistematicamente por experimentos em larga escala, e deve-se ter cuidado ao utilizá-las.

Algoritmos empíricos orientados por hipóteses podem não prever *off-targets* de forma eficiente, uma vez que consideram poucas fontes de dados, enquanto métodos baseados em aprendizado constroem modelos complexos, usando combinações de vários recursos. O algoritmo *CRISPR Target Assessment* (CRISTA) usa o *BWA* como ferramenta de busca de *off-targets* e implementa vários recursos (PAM, composição nucleotídica, conteúdo de GC, estrutura da cromatina, metilação do DNA, estrutura secundária do sgRNA, etc.) para prever a propensão à clivagem (Abadi et al., 2017). O CRISTA apresenta melhor desempenho que o MIT e CFD. Em paralelo, o DeepCRISPR é uma plataforma computacional de última geração que unifica a previsão de sítios para sgRNA, tanto para *on-targets* quanto para *off-targets*, em uma estrutura com aprendizado profundo (Chuai et al., 2018). Essa ferramenta, além de identificar sequências-alvo e características epigenéticas possíveis que podem afetar a eficácia do sgRNA, sendo alimentada por diferentes bases de dados, foi capaz de superar outras ferramentas disponíveis de previsão de *off-targets* (Doench et al., 2016; Hsu et al., 2013; Liu et al., 2020; Singh et al., 2015; Stemmer et al., 2015).

Muitas ferramentas on-line combinam vários dos métodos de pontuação acima mencionados ou até implementam seu próprio sistema de avaliação (Tabela 5), a fim de fornecer opções alternativas para os usuários, como o CHOPCHOP (Labun et

al., 2019, 2016; Montague et al., 2014) e o CRISPRscan (Moreno-Mateos et al., 2015). O E-CRISP utiliza seu próprio sistema de pontuação para determinar a qualidade de cada sgRNA, denominado de *Especificidade, Anotação, Eficácia* (SAE, do inglês *Specificity, Annotation, Efficacy*). O CCTop (Stemmer et al., 2015) atribui empiricamente pontuações para a predição de *off-targets*. Já o CRISPOR (Haeussler et al., 2016) é uma plataforma versátil que classifica os sgRNAs de acordo com diferentes sistemas de pontuação que visam avaliar potenciais *off-targets* no genoma de interesse e prever a atividade *on-target*, além de oferecer uma lista definida com diferentes sequências PAM para serem selecionadas pelo usuário. A plataforma CRISPR RGEN (Sullenger, 2020) disponibiliza diversas ferramentas computacionais, assim como informações para o desenho de sgRNAs, para várias endonucleases ortólogas a Cas9. A plataforma possui nove ferramentas úteis, dentre as quais se destacam o Cas-Designer (Park et al., 2015). Comparada com outras ferramentas, o Cas-Designer permite *mismatches* ao detectar *off-targets* no híbrido DNA/RNA. Além disso, esse método de detecção é mais rápido do que outros, devido ao algoritmo CasOFFinder associado. Sequências ou coordenadas genômicas e formatos de arquivo FASTA são permitidos como entradas. Mais de 350 genomas e 20 tipos de sequências PAM são disponibilizados para os usuários, e os resultados incluem, além dos *on-targets*, pontuação *out-of-frame* (calculada por micro-homologia), número de incompatibilidade (0–2) e sequências *off-targets* com *mismatches* de até 1 par de bases. Sítios para *on/off-targets* são redirecionados para o navegador de genomas *Ensembl1*, para realização de uma avaliação adicional. Ao contrário do Cas-Designer, o BE-Designer é implementado principalmente para edição de bases. Nessa ferramenta, quatro métodos de edição de bases são especificados, e a região de edição também é ajustável. O CRISPR-ERA (Liu et al., 2015) e o CHOPCHOP v3 (Labun et al., 2019) suportam o desenho de sgRNA para o sistema dCas9, sendo o CHOPCHOP uma plataforma que inclui 30 diferentes espécies de plantas. CRISPETA (Pulido-Quetglas et al., 2017) é usado principalmente para a deleção em genoma com a utilização de dois sgRNAs. Além disso, a escolha da ferramenta adequada deve ser feita com cautela, uma vez que diferentes ferramentas são desenvolvidas, preferencialmente, para diferentes genomas ou tipos de células. Por exemplo, o Yeaststriction (Mans et al., 2015) é direcionado para leveduras, o FlyCRISPR (Gratz et al., 2014) é voltado principalmente para espécies de inseto do gênero *Drosophila* (e alguns outros insetos), o EuPaGDT (Peng; Tarleton, 2015) é recomendado para patógenos eucarióticos, enquanto CRISPR-P/CRISPR-P 2.0 (Lei et al., 2014; Liu et al., 2017), CRISPR-PLANT (Minkenberg et al., 2019) e CRISPR-GE (Xie et al., 2017) são implementados para a edição de genomas de plantas. O CRISPR-P 2.0 é uma das

---

<sup>1</sup> Disponível em: <https://www.ensembl.org/index.html>

plataformas web mais utilizadas para edição de genomas em plantas na atualidade e auxilia tanto no desenho do sgRNA para *on-targets* quanto para a predição de *off-targets*. Ele suporta o desenho de sgRNAs para 49 genomas de plantas (até o momento), cobrindo quase todas as espécies para as quais existe um genoma bem montado, mas suporta também a identificação de sgRNAs em sequências fornecidas pelo usuário. Utiliza, também, um sistema de pontuação modificado para classificar *off-targets* e a eficiência de direcionamento de sgRNAs para a Cas9 de *S. pyogenes*, a mais usada até o momento, e também de outros sistemas CRISPR, incluindo Cpf1 (Zetsche et al., 2015). Essa plataforma avalia o conteúdo do GC, a presença de possíveis sítios para endonuclease de restrição, pontua a micro-homologia da sequência que flanqueia a região a ser editada e avalia a estrutura secundária do sgRNA.

Visto que existem poucos softwares/plataformas on-line específicos para o desenho de guias direcionados para a tecnologia CRISPR/dCas9, o CHOPCHOP v3<sup>2</sup> (Labun et al., 2019) foi o software escolhido para a elaboração de um tutorial, principalmente por apresentar funcionalidade específica para dCas9, por conter dados referentes a mais de 250 espécies e passar por atualizações constantes. No entanto, caso já se tenham informações *in silico* e/ou *in vivo* a respeito da região promotora-alvo, outros softwares/plataformas podem ser utilizados, tais como CRISPR RGEN<sup>3</sup> ou CRISPR-P 2.0<sup>4</sup>, que são versáteis e de fácil uso.

## Tutorial 1: Desenho do sgRNA visando modulação transcricional via dCas9

**Passo 1:** Acessar a URL <https://chopchop.cbu.uib.no/>

**Passo 2:** Escolha da espécie de interesse (Seção *In*). As espécies eucarióticas e procarióticas já inseridas em seu banco de dados encontram-se divididas, até o momento, nas seguintes categorias: Arthropoda (37), Bacteria (58), Chordata (46), Cnidaria (1), Ctenophora (1), Echinodermata (2), Fungi (30), Mollusca (2), Nematoda (2), Outros (12), Parasitas (11), Plantas (30), Virus (20). No presente tutorial, foi escolhida a espécie de planta *Glycine max* (GCA\_000004515.3). Caso o genoma do organismo de interesse não esteja inserido, é possível solicitar aos desenvolvedores a sua inserção, desde que o usuário tenha em mãos um arquivo FASTA com a montagem do genoma-alvo, assim como um arquivo GFF3 válido referente à sua anotação funcional (validado no programa *gff3ToGenePred*, disponível na própria plataforma CHOPCHOP) (Figura 3). O ID atribuído no arquivo GFF3 deve

<sup>2</sup> Disponível em: <https://chopchop.cbu.uib.no/>

<sup>3</sup> Disponível em: <http://www.rgenome.net/about/>

<sup>4</sup> Disponível em: <http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>

chopchop.cb.uib.no

01 Home Instructions Scoring About Updates Submissions Contact FAQ

# CHOPCHOP

03 Target: Glyma\_09G153900  
RefSeq/ENSEMBL/gene name or genomic coordinates.

02 In: Glycine max (GCA\_00000451)  
Add new species.

04 Using: CRISPR/Cas9  
Change default PAM and guide length in Options.

05 For: activation  
Presets can be adjusted in Options.

Paste Target Options Reset Options

06a Find Target Sites! 07

06b

**ABA "GENERAL"**

Target specific region of gene:  
 Coding region  All exons (inc. UTRs)  Splice sites  5' UTR  3' UTR  Promoter 300 0  
 Only target exon(s): e.g. 1,2

Restrict targeting:  
 Search exons and immediate short flanking regions.  Only search within the exon.

Isoform consensus determined by:  
 Intersection (only searches regions present in all isoforms)  Union (searches all exons in all isoforms)

Pre-filtering:  
 Minimum required GC [%] content has to be between min: 10 and max: 90  
 Self-complementarity has to be below: -1

Restriction enzymes:  
 Company preference: NEB  
 Minimum size of restriction enzyme binding site: 4

Fasta input:  
 Color scoring should ignore one off-target without mismatches.  
 Displayed flanking sequence length in detailed view: 300

**ABA "Cas9"**

sgRNA length without PAM: 20

PAM-3':  
 NGG  NAG  NGA  NRG (R = A or G)  NNAGAAW (W = A or T)  NNNGMTT (M = A or C)  NNGRRT (R = A or G)  
 Custom PAM: e.g. NGAG

Method for determining off-targets in the genome:  
 Off-targets with up to 3 mismatches in protospacer (Hsu et al., 2013)  
 Off-targets may have no more than 0 mismatches in the protospacer seed region (Cong et al., 2013)

Efficiency score:  
 Doench et al. 2014 - only for NGG PAM  
 Doench et al. 2016 - only for NGG PAM  
 Chari et al. 2015 - only NGG and NNAGAAW PAM's in hg19 and mm10  
 Xu et al. 2015 - only for NGG PAM, but can be used with other PAMs  
 Moreno-Mateos et al. 2015 - only for NGG PAM  
 G20

Repair profile prediction (Shen et al. 2018):  
 mESC (recommended when you don't know which cell type)  
 U2OS  
 HEK293  
 HCT116  
 K562  
 Don't calculate (saves time)

5' requirements for sgRNA:  
 GN or NG  
 GG  
 No requirements

Self-complementarity (Thyme et al.):  
 Check for self-complementarity  
 I intend to replace the leading nucleotides with "GG"  
 Check for complementarity versus backbone:  
 Standard backbone (AGGCTAGTCCGT)  
 Extended backbone (AGGCTAGTCCGT,ATGCTGGAA)  
 Custom backbone: e.g. ATGCTGGAA

Figura 3. CHOPCHOP v3 – Parâmetros. Apresentação do passo a passo, descrito no Tutorial 01, para a escolha dos principais parâmetros para o desenho de sgRNAs, visando a ativação via dCas9 de um gene específico de *G. max* (ID: Glyma\_09G153900). A numeração apresentada em cada retângulo vermelho representa os passos de 1 a 7 do Tutorial 1.

corresponder ao identificador que se deseja usar para procurar os genes, assim como se deve ter certeza de que os nomes dos cromossomos sejam idênticos, tanto no arquivo GFF3 quanto no FASTA, e as coordenadas dos genes correspondam ao arquivo FASTA do genoma. Após o cumprimento de todas essas exigências, deve-se enviar uma requisição por e-mail (disponível na seção “Add new species”, abaixo do local de seleção da espécie de interesse). Vale a pena ressaltar que a inserção de um novo genoma é feita pelos mantenedores da plataforma. Não é permitida ao usuário a inserção manual do genoma-alvo.

**Passo 3:** Escolha do gene-alvo (Seção *Target*). É nesse campo onde se insere o ID do gene-alvo. O ID do gene escolhido para este tutorial é Glyma\_09G153900. É importante que o ID corresponda exatamente com o do genoma depositado no banco de dados da plataforma CHOPCHOP. Caso não exista a correspondência, a própria plataforma enviará a mensagem de erro “Error status: 501”, na qual se orienta a forma correta de se escrever o ID para aquele gene da espécie selecionada. Esse campo age de forma sincronizada com o ícone cinza “Paste Target”. Com essa opção ativa, é possível encontrar o gene de acordo com o ID (formato RefSeq ou ENSEMBL), nome do gene ou coordenadas do gene no genoma (por exemplo, chrX:15,560,138-15,602,945). Ao clicar no ícone cinza “Paste Target”, o usuário muda a função do ícone para a opção “Gene Target”, onde é possível colocar a sequência de nucleotídeos que se deseja analisar. Esta última opção não é muito utilizada nessa plataforma para o desenho de sgRNAs visando a utilização da tecnologia dCas9, pois, na maior parte dos casos, com essa abordagem, se perde o contexto genômico da região promotora do gene-alvo, o que é essencial para a modulação transcricional via dCas9 (Figura 3).

**Passo 4:** Escolha da nuclease (Seção *Using*). Neste campo, a plataforma disponibiliza até o momento cinco diferentes tipos de nucleases para edição de genomas: 1) CRISPR/Cas9; 2) CRISPR/Cas9 nicase; 3) CRISPR/Cpf1 (CasX); 4) CRISPR/Cas13 (c2c2); e 5) TALEN. Para este tutorial, a nuclease selecionada é “CRISPR/Cas9” (Figura 3).

**Passo 5:** Escolha da estratégia (Seção *For*). Neste campo, é selecionada a abordagem ou contexto no qual serão utilizados os sgRNAs que serão selecionados (para este tutorial, foi selecionada a opção “Activation” (Figura 3):

- a) *Knockout* (para mutações em que se pretende mudar a fase de leitura do gene de interesse; disponível para quase todas as nucleases disponibilizadas na plataforma, com exceção da CRISPR/Cas13): para aplicações com a Cas9, pode-se prever a taxa de mudança na fase de leitura propiciada por cada sgRNA. Para a maioria das aplicações, algumas recomendações são sugeridas: 1) usar a Cas9 tradicional (20 nucleotídeos com sequência PAM 5'-NGG-3'); 2) ter certeza de que o sgRNA possui o menor número possível

de *off-targets*, de preferência nenhum; 3) garantir que o sgRNA selecionado pode reconhecer todas as isoformas do gene-alvo (disponível apenas para genomas selecionados nos quais há informações no nível de isoformas); e 4) selecionar sgRNAs a jusante de quaisquer ATG *in frame* dentro da estrutura (caixas verdes na região codificadora azul, apresentados na tabela de resultados finais) para evitar a expressão de proteínas truncadas.

- b) *Knock-down* (para edição mRNA com CRISPR/Cas13; disponível somente para humanos e camundongos): neste modo é possível procurar *off-targets* em transcriptomas. É possível selecionar o sistema Cas13 em "Options" (após selecionar "CRISPR/Cas13" na seção *For*), especificando o *protospacer flanking site* (PFS) e o tamanho do sgRNA.
- c) *Knock-in* (para inserção de sequências de DNA em uma região de interesse; indisponíveis para CRISPR/Cpf1, CRISPR/Cas13 e TALEN): é altamente recomendável a familiarização com os diferentes tipos de *knock-ins* disponíveis para a escolha do método mais apropriado (Nami et al., 2018). O *knock-in* pela tecnologia CRISPR permite a engenharia genética específica do local por meio da quebra de fita dupla do DNA (DSB) induzida por nucleases e, posteriormente, o reparo do DSB por vias de reparo celular: tanto por junção final não homóloga (NHEJ) quanto por reparo direcionado por homologia (HDR). Um aspecto importante a ser considerado ao decidir o tipo de técnica usar é se a modificação precisará ocorrer em células que se dividem ou que não se dividem. A HDR é restrita às fases S e G2 do ciclo celular e, portanto, não é adequada para células que não se encontrem em divisão. As sequências referentes aos braços de homologia são fornecidas na página de resultados detalhados do sgRNA. É possível ajustar a posição dos braços da micro-homologia em relação à extremidade 5' do sgRNA (padrão: nucleotídeo -3 a partir da sequência PAM) e especificar o tamanho do braço. Pode ser aconselhável verificar a complementaridade entre a sequência inserida e seus braços de micro-homologia. Nas configurações *default* para *knock-in*, podem ser obtidos braços de homologia de até 800 pares de bases. Caso se deseje um braço de homologia com tamanho maior (até 2.000 pares de bases), é necessário alterar o tamanho da sequência de flanqueamento mostrada na página inicial ("Options" > "General" > "Displayed flanking sequence length in detailed view").
- d) *Activation/Repression* (para sgRNAs que têm como alvo regiões promotoras; disponível para as nucleases CRISPR/Cas9 e CRISPR/Cpf1): nesta opção o default para o desenho dos sgRNAs é: 1) modo de ativação: 300 pares de bases a montante do TSS; 2) modo de repressão: 200 pares de bases a

jusante e a montante do TSS. É recomendável usar mais de um sgRNA para essas aplicações.

- e) *Nanopore Enrichment*: utilizado para o enriquecimento de fragmentos de DNA específicos para sequenciamento por meio da plataforma da Oxford Nanopore com o uso de CRISPR. Está disponível somente para as nucleases CRISPR/Cas9 e CRISPR/Cpf1.

**Passo 6:** Escolha das opções avançadas (seção *Options*). Esta seção encontra-se no ícone cinza no centro da página inicial e é extremamente relevante para refinar os resultados de acordo com a característica tanto do genoma-alvo quanto da sequência-alvo (Figura 3). Ao clicar nesse ícone, com a nuclease CRISPR/Cas9 selecionada na Seção *Using*, novas opções surgem, divididas em três abas: 1) “General”, na qual é possível ajustar parâmetros gerais para a tecnologia CRISPR; 2) “Cas9”, opção de ajuste de parâmetros exclusivos para a nuclease Cas9; e 3) “Primers”, para ajustar parâmetros relativos ao desenho de primers que serão utilizados em experimentos de PCR para detecção de mutações (utilizado basicamente em experimentos de *knockout*). Para experimentos com dCas9, somente serão ajustados parâmetros presentes nas abas “General” e “Cas9”:

a) Aba “General”:

- *Target a specific region of the gene*: pode-se especificar a região onde os sgRNAs serão desenhados: 1) somente a região codificadora (*default*); 2) toda a sequência exônica (incluindo 5' e 3'-UTR); 3) locais de *splicing*; 4) somente 5'-UTR; 5) somente 3'-UTR; 6) o promotor (é possível especificar quantos pares de bases a montante e a jusante do TSS serão analisados); ou 7) um éxon específico ou um subconjunto específico de éxons. Se desejar direcionar a análise para um íntron, especifique as coordenadas genômicas do íntron (tamanho máximo, 40.000 pares de bases).
- *Restrict targeting*: ao pesquisar *on-targets* em uma região de interesse, no modo *default*, o CHOPCHOP permite que o sgRNA se vincule apenas fora dessa região, para que o corte (na maioria dos casos) ainda ocorra na região-alvo. Você pode desativar essa opção em experimentos com dCas9.
- *Isoform Consensus*: ao analisar genes com múltiplas isoformas, os modos “Intersection” ou “Union” podem ser ativados. No modo “Intersection” o CHOPCHOP procura somente por sgRNAs presentes em todas as isoformas. No modo “Union”, o CHOPCHOP procura por sgRNAs em todos os éxons de todas as isoformas. Portanto, pode-se usar esse modo para

direcionar uma (ou mais) isoformas específicas. Você pode desativar essa opção em experimentos com dCas9.

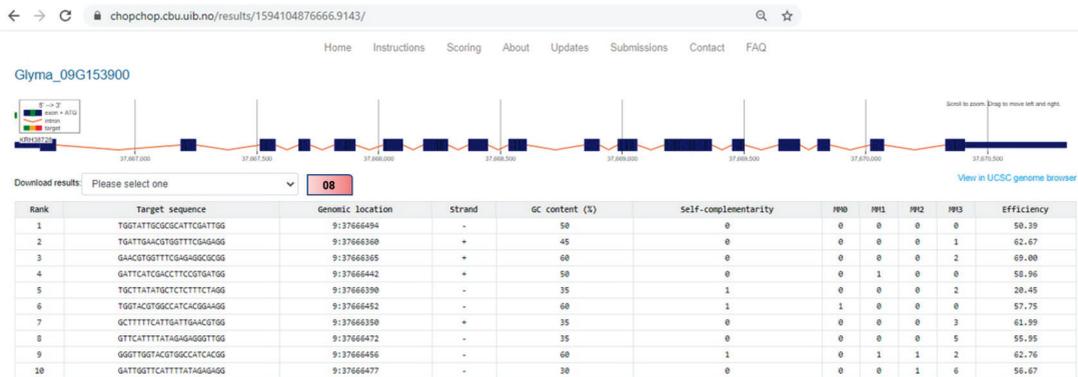
- *Pre-filtering*: é possível pré-filtrar os sgRNAs com base no conteúdo do GC e na pontuação de autocomplementaridade (definido como -1 para desativar, o que não é recomendado). Os sgRNAs que não atendem a esses requisitos não serão relatados na tabela de resultados finais.
- *Restriction enzymes*: a avaliação da mutagênese pode ser feita por meio da análise da digestão com enzimas de restrição. O CHOPCHOP exibe sítios de restrição no local de destino e permite restringir a pesquisa a sítios de restrição de enzimas comercializadas por uma empresa específica (NEB™, Fermentas™, Promega™, Roche™, Sigma™ e Stratagene™), assim como o número mínimo de bases que o sítio de restrição deve ter. Este parâmetro é irrelevante em experimentos de modulação transcripcional mediada por dCas9.

b) Aba “Cas9”:

- *sgRNA length without PAM*: uma vez que alguns estudos sugerem que sgRNAs truncados podem apresentar maior eficiência de clivagem, é possível utilizar valores menores de 20 nucleotídeos (*default*), o que não é recomendado para experimentos com dCas9.
- *PAM-3' sequence*: o *default* para o PAM referente a Cas9 é NGG. Alternativamente é possível selecionar um PAM de um sistema ortólogo, ou ainda inserir um PAM personalizado. Para a dCas9 de *S. pyogenes*, recomenda-se usar o PAM *default*.
- *Method for determining off-targets in the genome*: existem duas opções: 1) *mismatches* de uma base até a décima primeira base ao 5' da sequência PAM abolem completamente a clivagem por Cas9 (Cong et al. 2013). No entanto, mutações mais a montante do PAM mantêm a atividade de clivagem. Este método procura *mismatches* apenas nos primeiros nove nucleotídeos, pois se prevê que um *mismatch* posterior ao PAM não cause clivagem; e 2) *mismatches* podem ser tolerados em qualquer posição, exceto no PAM. Este método procura *mismatches* apenas nos 20 pares de bases a montante do PAM (Hsu et al., 2013). Este é o método *default* e o mais utilizado para experimentos com dCas9.
- *Efficiency score*: existem vários métodos para se avaliar e calcular a eficiência de clivagem pela nuclease Cas9. A forma mais simples de pontuação de eficiência é a “G20” (Doench et al., 2016), em que se prioriza uma guanina na posição 20, logo após o PAM, sendo este valor normalizado na plataforma

CHOPCHOP para se encontrar no intervalo entre 0 e 1. Visto que a eficiência de clivagem é um fator irrelevante em experimentos com dCas9, recomenda-se usar o default para este parâmetro.

- *Repair profile prediction*: de acordo com modelos específicos (Shen et al., 2018), é possível prever o perfil de reparo do DNA para um determinado sgRNA. Para esta opção, deve-se selecionar o tipo de célula, sendo disponíveis somente células animais (U2OS, HEK293, HCT116, K562), ou o modo “mESC” se o tipo celular a ser editado não for conhecido. Para experimentos com dCas9, a opção “Don’t calculate (saves time)” deve ser selecionada, pois, além de consumir muito tempo computacional, é irrelevante para esse tipo de análise.
- *Requirements for the 5’ end of the sgRNA*: dependendo da polimerase usada para a síntese do sgRNA, é possível selecionar os seus dois primeiros nucleotídeos visando a melhor eficiência de transcrição. Por exemplo, 5’-GN- (para o promotor U6) ou 5’-GG- (para T7 polimerase). Com relação ao sistema dCas9, caso o propósito seja a edição de bases, em que geralmente se utiliza RNPs (abordagem na qual o sgRNA será sintetizado in vitro, com auxílio da T7 polimerase), a opção “GG” deve ser selecionada. Já em experimentos de modulação transcricional, em que o sgRNA será expresso in vivo, regulado pelo promotor U6, a opção “GN or GG” deve ser selecionada.
- *Self-complementarity*: estudos sugerem que a autocomplementaridade dentro do sgRNA ou entre o *spacer* e o *RNA scaffold (backbone)* (em que a sequência descrita na literatura é 5’-GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA TAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC-3’) pode reduzir a eficiência de clivagem do sgRNA (Thyme et al., 2016). Essa opção procura complementaridade dentro do sgRNA, ou entre o *spacer* e um *RNA scaffold* padrão (AGGCTAGTCCGT), um *RNA scaffold* estendido (AGGCTAGTCCGT, ATGCTGGAA) ou um *RNA scaffold* personalizado. Alguns usuários optam por substituir os primeiros dois nucleotídeos de seu sgRNA por “GG” para transcrição via T7 polimerase, e nesse caso selecione a opção “I intend to replace the leading nucleotides with “GG”. Para experimentos com dCas9, é necessário avaliar tanto a opção “Check for self-complementarity” quanto a opção “Check for complementarity versus backbone”. Com relação a esta última, caso a abordagem experimental seja a clássica, na qual o RNA scaffold é o tradicional, deve-se selecionar “Standard backbone (AGGCTAGTCCGT)”, mas, se a abordagem for com a utilização de aptâmeros de RNA (por exemplo, o sistema SAM), a opção “Custom backbone” deve ser selecionada, e a sequência do RNA scaffold modificado deve ser fornecida. Por fim, a opção “I



**Figura 4.** CHOPCHOP v3 – Resultados. Interface da plataforma CHOPCHOP, na qual são apresentados os sgRNA sugeridos para a ativação e um gene específico de *G. max* (ID: Glyma\_09G153900), via dCas9. O ranking (coluna 1) é baseado no número de *off-targets* apresentados nas colunas MM0, MM1 e MM2 (com um, dois ou três *mismatches*, respectivamente). Mesmo sendo irrelevante para a tecnologia dCas9, a plataforma fornece valores de eficiência de clivagem (em porcentagem), conforme apresentado na última coluna. Também são apresentadas outras informações, como sequência do *spacer* (coluna 2), posição no genoma (coluna 3), fita de DNA (senso ou positiva; antissenso ou negativa; coluna 4), percentual de GC no sgRNA (coluna 5) e autocomplementaridade (coluna 6). O download dos resultados (quadrado vermelho; passo 8 no Tutorial 1) pode ser feito de acordo com o formato escolhido.

intend to replace the leading nucleotides with “GG” só pode ser marcada em experimentos com dCas9 visando edição de bases.

**Passo 7:** Execução da análise. Após a seleção de todos os parâmetros, clicar em “Find Target Sites!” para submeter a análise. Caso tudo esteja correto, a mensagem “Your job has been successfully submitted” será exibida. O tempo de análise pode variar de acordo com os parâmetros selecionados. CHOPCHOP exibe os resultados da consulta em uma visualização dinâmica e tabela interativa (Figura 4). A visualização dinâmica exibe todas as opções do *on-target* para a região, especificada com código de cores de acordo com um sistema de pontuação específico: verde (melhor), âmbar (ok) e vermelho (ruim). Em todos os casos, o gene é exibido na direção 5' - 3'. Todas as isoformas do gene são exibidas com seus nomes e, a jusante, os sítios de ATG *in frame* (caixa verde). Basta clicar em um alvo na visualização ou em uma opção na tabela para ser direcionado a uma página de resultados para cada sgRNA individual, contendo informações sobre *on-targets*, *off-targets*, previsões de reparo (quando aplicável), braços de micro-homologia (modo *knock-in*), assim como os sítios de restrição e *primers* desenhados para cada região. Além disso, o CHOPCHOP lista quantos *off-targets* cada *on-target* possui com 0 (coluna “MM0”), 1 (coluna “MM1”), 2 (coluna “MM2”) ou 3 (coluna “MM3”) *mismatches*. Clicar no

resultado revelará mais informações sobre os *off-targets*. Cada *on-target* é ranqueado de acordo com: 1) *score* de eficiência de clivagem (modo “Cas9”); 2) número de *off-targets* e se eles apresentam *mismatches*; 3) existência de regiões de autocomplementaridade com mais de três nucleotídeos (o número indica quantas regiões de autocomplementaridade são previstas); 4) conteúdo de GC (modo “CRISPR/Cas9”): os sgRNAs são mais eficazes com um conteúdo de GC entre 40% e 70% ; e 5) localização do sgRNA dentro de um gene (quanto mais próximo da extremidade 5', melhor será a classificação). Por fim, cada página individual de resultados fornece 1) uma visualização do sítio-alvo de cada sgRNA (com o local de corte previsto em azul no modo “CRISPR/Cas9” ou “CRISPR/Cpf1”); 2) primers desenhados (em roxo); 3) sítios de restrição (em verde – sítios únicos no amplicon, e em vermelho – sítios não exclusivos); e 4) detalhes sobre os *off-targets* (localização genômica, número de *mismatches* e sequência).

**Passo 8:** Download dos resultados. As análises finais são disponibilizadas para download em quatro diferentes formatos: 1) BED (para visualização em *genome browser*); 2) GenBank (arquivo com anotação e íntron); 3) TSV (tabela de resultados; mais utilizado); e 4) FASTA (Figura 4).

**Outras considerações:** Não é errado imaginar que a utilização de mais de um sgRNA para diferentes regiões de um mesmo promotor possa, em associação com o complexo dCas9 com um modulador transcricional (ModT), amplificar os níveis de ativação ou repressão desejados (Deaner et al., 2017; Farzadfard et al., 2013; Gilbert et al., 2013). Mesmo que essa afirmação seja considerada verdadeira, ela não é válida para todos os casos, conforme discutido anteriormente. Além disso, é sabido que a presença/ausência de nucleossomos nas mediações do gene-alvo também pode interferir efetivamente com a ação dos reguladores transcricionais (Griesenbeck et al., 2003; Mao et al., 2011). Especificamente para o sistema CRISPR-dCas9, que depende inerentemente da interação com o DNA, é de se esperar que a presença de nucleossomos seja determinante na eficiência da tecnologia em eucariotos, visto que o DNA presente nessa estrutura é amplamente enovelado em histonas, o que o torna mais compactado e menos acessível (Horlbeck et al., 2016; Lee et al., 2007; Radzishewska et al., 2016; Rando; Chang, 2009; Rando; Winston, 2012; Smith et al., 2017, 2016). Sendo assim, evidências bioquímicas e *in vivo* sugerem que as estratégias de desenho de sgRNAs devem evitar o seu direcionamento para próximo ao core do nucleossomo. Associado a essa ideia, o desenvolvimento de futuras ferramentas para o desenho *in silico* de sgRNA específicos e altamente eficientes deve avaliar e incluir em seus algoritmos bancos de dados disponíveis com mapas de acessibilidade ao DNA e posicionamento de nucleossomos para que as análises *in silico* sejam mais fidedignas à realidade *in vivo* (Jiang; Pugh, 2009; Schep et al., 2015). Dessa forma, como nas redes reguladoras de transcrição nativa e em

outras redes sintéticas, o número de reguladores associados ao *regulon* de destino oferece uma válvula modular para ajustar o impacto da reprogramação mediada por CRISPR-dCas9. No entanto, o uso de vários sgRNAs deve ser cuidadosamente analisado, com foco especial na posição dos elementos reguladores e nucleossomos existentes, a fim de ajustar o potencial regulatório por simples aumento no número de sgRNA direcionados a essas regiões.

## Desenho do cassete de transformação

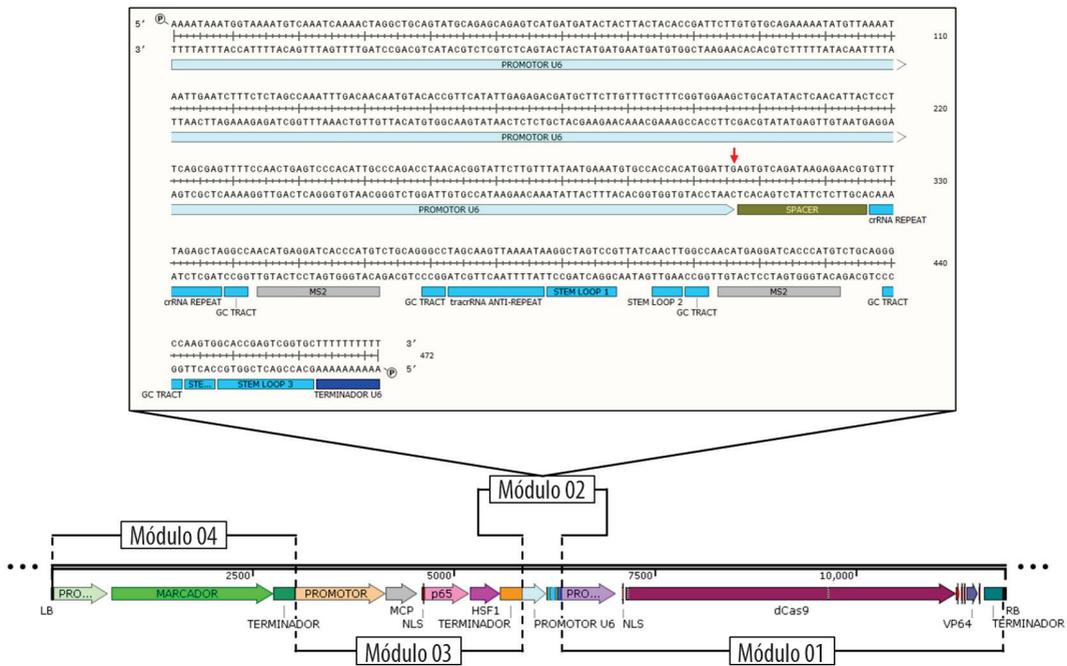
A utilização da tecnologia CRISPR visando a modulação transcricional ou epigenética apresenta grande potencial de aplicação biotecnológica em plantas, principalmente a manipulação da expressão de genes endógenos que podem estar associados com algum fenótipo de interesse. Especificamente com relação a dCas9, poucas abordagens são capazes de serem executadas de forma não transgênica (*DNA free*, via ribonucleoproteína). Dessa forma, a modulação transcricional aqui apresentada necessita da expressão constante da dCas9, sgRNA e ModTs. Um passo crítico na aplicação dessa tecnologia é o desenho do cassete para transformação da planta de interesse, o que inclui a seleção de elementos genéticos capazes de produzir de forma otimizada cada um dos componentes do sistema de modulação.

### Tutorial 2: Desenho do cassete de transformação para modulação transcricional via dCas9

Para fins didáticos, é proposto neste tutorial um passo a passo que direciona o desenho de um cassete de transformação, dividido em quatro módulos: 1) expressão da dCas9; 2) expressão do sgRNA; 3) expressão da proteína de fusão Adaptador:ModT; e 4) expressão do marcador de seleção. São apresentadas considerações baseadas tanto em experiências laboratoriais quanto na literatura recente a respeito do assunto (Figura 5).

**Módulo 1:** Expressão da dCas9. A expressão da dCas9 é um fator muito importante no desenho do vetor para modulação transcricional. Este módulo apresenta três elementos: 1) promotor; 2) dCas9; e 3) terminador (Figura 5).

- a) **Promotor:** na maioria dos casos, o promotor escolhido para a expressão da dCas9 é reconhecido por uma RNA polimerase II (pol II), além de ser forte (nível de expressão elevado) e constitutivo (expresso em todos os tecidos e a todo momento). Em plantas, uma boa escolha seria o promotor *CaMV35S*. Mesmo sendo o mais usado e, em princípio, a escolha mais óbvia, alguns aspectos devem ser considerados. O primeiro deles é a origem desse pro-



**Figura 5.** Desenho do cassete de transformação – Tecnologia dCas9 (sistema SAM). Conforme detalhado no Tutorial 2, é apresentado o cassete de transformação com os elementos necessários para a ativação de um gene específico, via dCas9 (sistema SAM), clonado em um vetor binário, baseado no T-DNA de *A. tumefaciens*. O cassete é dividido didaticamente em quatro módulos: *Módulo 1*: Expressão da dCas9; *Módulo 2*: Expressão do sgRNA, com destaque para cada elemento deste módulo (parte superior da figura). O *RNA scaffold* apresenta inserida em sua estrutura a sequência do aptâmero de RNA MS2 tanto no *tetraloop* quanto no *stem loop 2*. A seta vermelha enfatiza a importância da guanina como último nucleotídeo presente no 3' do promotor *GmU6-10* de soja); *Módulo 3*: Expressão da proteína de fusão Adaptador:ModT. Neste módulo, os ModTs apresentados são p55 e HSF1, característicos do sistema SAM; e *Módulo 4*: Expressão do marcador de seleção. Siglas: LB – left border; MCP – MS2 Coat Protein; NLS – sítio de localização nuclear; RB – right border.

motor. Por ser de origem viral, ele pode ser passível de silenciamento em plantas. Visto que a modulação da transcrição do gene-alvo necessita da atividade da dCas9 constante, caso ocorra seu silenciamento, o fenótipo gerado pela modulação do gene-alvo será perdido. O segundo aspecto a ser considerado é a característica constitutiva desse e de outros promotores também usados (por exemplo *AtACT2-5* de *A. thaliana*). É sabido que em plantas, a expressão constitutiva da Cas9 pode propiciar efeitos pleiotrópicos indesejáveis devido a sua ação em possíveis *off-targets*. E o terceiro aspecto a ser considerado é a função do gene cuja expressão será modulada. Muitas vezes, genes que são importantes em resposta a diferentes tipos de estresses apresentam efeitos indesejáveis, se expressos de forma constitutiva. Por isso, sua expressão é naturalmente regulada e restrita ao

momento em que é necessário. Caso o promotor que regulará a expressão da dCas9 seja constitutivo, genes com esta característica também seriam expressos em altos níveis de forma constitutiva. Dessa forma, a escolha do promotor para a expressão da dCas9 deve estar alinhada com a função do gene cuja expressão se pretende modular. Por exemplo, se o fenótipo desejado for a resistência da planta a um patógeno, pode-se pensar em usar um promotor para regular a expressão da dCas9 que seja induzido somente durante a infecção pelo patógeno-alvo.

- b) **dCas9:** deve-se avaliar com cuidado a sequência da dCas9 a ser expressa a fim de modular a transcrição de genes. O primeiro aspecto a ser observado é se as mutações necessárias para a perda da atividade catalítica estão inseridas na sequência (D10A no domínio catalítico RuvC e H840A no domínio catalítico HNH). O segundo aspecto é a presença de sinal de localização nuclear (NLS, do inglês *nuclear localization site*), visto que a atividade da dCas9 será desempenhada exclusivamente no núcleo eucariótico. Em plantas, os principais NLSs escolhidos são: 1) NLS do vírus de macaco SV40 (PKKKRKV); e 2) NLS bi-partido da nucleoplasmina (KRPAATKKAGQAKKKK). O número de repetições e a região onde serão inseridos é variável. Geralmente o número de repetições de cada NLS varia de 1 a 4, podendo estar presente tanto na porção amino quanto na carboxiterminal da dCas9. Dificilmente se encontram construções com apenas um NLS. Além disso, existem construções desenhadas com sucesso que apresentam NLSs também após ModT. Deve-se ter muito cuidado para que a adição desses NLSs não interfira na função da dCas9 no ModT. O terceiro aspecto a ser considerado é a fusão com o ModT. Geralmente essa fusão é mediada por um *linker* ou ponte, correspondente a uma sequência de 5 a 20 resíduos de aminoácidos que liga a região carboxiterminal da dCas9 à aminoterminal do ModT. Esses aminoácidos devem conferir flexibilidade e permitir que ambas as proteínas apresentem sua atividade correta. Inclusive, alguns NLSs inseridos praticamente in tandem, devidamente espaçados por pelo menos cinco aminoácidos neutros, podem ser utilizados como *linkers* entre a dCas9 e o ModT. Vale a pena ressaltar que o tamanho e composição de aminoácidos do *linker* entre a dCas9 e os domínios editores de bases é crucial para a especificidade da edição. *Linkers* menores reduzirão a janela de bases que poderão ser editadas. Mas cuidado: *linkers* muito pequenos podem interferir na função de ambas as proteínas.
- c) **Terminador:** a escolha do terminador é mais livre. Ao se utilizar o promotor *CaMV35S*, sugere-se que seja usado o terminador *35S*, mas qualquer terminador que seja reconhecido por uma pol II pode ser utilizado, como, por exemplo, o terminador *NOS* do gene nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*.

Dados experimentais mostram que a presença de dois terminadores diferentes in tandem (por exemplo, terminador 35S e NOS) podem aumentar os níveis de transcrição por melhorar a estabilidade da expressão do transgene, causar a terminação da transcrição mais eficiente e reduzir o silenciamento pós-transcricional do gene-alvo (Basso et al., 2020).

**Módulo 2:** Expressão do sgRNA. O principal objetivo aqui é delinear de forma eficiente a expressão do sgRNA. Este módulo apresenta quatro elementos: 1) promotor *U6*; 2) *spacer*; 3) *RNA scaffold*; e 4) terminador *U6* (Figura 5).

- a) **Promotor U6:** foi demonstrado que os níveis de expressão de sgRNAs estão diretamente correlacionados com a eficiência da engenharia do genoma mediada por CRISPR/Cas9 em células eucarióticas. Em geral, os promotores da RNA polimerase III (pol III) são mais usados para direcionar a expressão de sgRNAs, visto que os promotores de pol II adicionam nucleotídeos extras às extremidades 5' e 3' dos sgRNAs e, portanto, podem interferir em sua função (Hsu et al., 2013; Yoshioka et al., 2015). Originalmente, os promotores pol III SNR52 e RPR1 foram adotados para expressão constitutiva de sgRNAs em leveduras (DiCarlo et al., 2013; Farzadfard et al., 2013; Gilbert et al., 2013). Em seguida, para permitir maior flexibilidade ao desenho e à força de expressão dos sgRNAs, dois estudos sobre entrega constitutiva de sgRNAs testaram a fusão do Vírus Delta da Hepatite (HDV) e ribozimas autocliváveis do tipo martelo de cabeça, permitindo a expressão de sgRNAs com promotores da pol II (Gao e Zhao, 2014; Ryan et al., 2014). Além dos promotores pol III nativos e pol II induzíveis, diferentes classes de promotores foram utilizadas para regular a expressão de sgRNAs em sistemas eucarióticos (Farzadfard et al., 2013; Ferreira et al., 2018; Jensen et al., 2017; Nishimasu et al., 2014; Smith et al., 2016; Zhang et al., 2017). Além desses, o promotor *U6* se destaca quando o assunto é expressão de sgRNAs. É um promotor de pol III de classe III importante na expressão de pequenos RNAs nucleares não codificadores, envolvidos no *splicing* de íntrons durante a produção de moléculas maduras de mRNA em células eucarióticas. Diferentes promotores *U6* já vêm sendo frequentemente usados em plantas e animais para expressar pequenos RNAs em níveis mais elevados (Li et al., 2007; Miyagishi; Taira, 2002). Atualmente, esse tipo de promotor tem sido a escolha preferida para regular a expressão de sgRNA em vetores CRISPR/Cas9 (e variantes) (Friedland et al., 2013; Li et al., 2013). Além disso, o promotor *U6* possui um TSS altamente conservado, começando com um nucleotídeo de guanina, o que ajuda a melhorar a homogeneidade da molécula de sgRNA transcrita e reduzir os efeitos de *off-targets* (Li et al., 2007). Os sistemas vetoriais CRISPR/Cas9 com o promotor *U6* para direcionar a expressão do sgRNA foram utilizados com sucesso em várias espécies de

plantas. Os promotores *OsU6a*, *OsU6b* e *OsU6c* do arroz são os mais utilizados para monocotiledôneas, e *AtU6-1* e *AtU6-29* de *Arabidopsis*, os preferidos para dicotiledôneas (Jiang et al., 2013; Li et al., 2014; Mikami et al., 2015). No entanto, existem limitações à sua natureza “universal”, pois o promotor *U6* de *Arabidopsis* foi considerado ineficiente em trigo e arroz (Shan et al., 2013). Dessa forma, fica claro que o uso de promotores *U6* específicos da espécie pode resultar em aumento da expressão de sgRNA e, assim, em maior eficiência de edição (Ng; Dean, 2017; Sun et al., 2015). Em soja, por exemplo, os níveis de sgRNA expressos pelo promotor endógeno *GmU6* foram duas vezes maiores que os obtidos com o promotor *AtU6-26* de *Arabidopsis*, resultando em um aumento considerável na eficiência da edição de genes (14,7–20,2% para *GmU6* vs. 3,2–9,7% para *AtU6-26*) (Sun et al., 2015). Tendo isso em vista, além da soja, diversas espécies vegetais de interesse agrônômico (tais como algodão, arroz, cevada, milho, sorgo e trigo, entre outras) já tiveram pelo menos um promotor *U6* endógeno caracterizado e testado em experimentos visando a expressão de sgRNAs (Gasparis et al., 2018; Jiang et al., 2013; Long et al., 2018; Qi et al., 2016; Sun et al., 2015). Também é importante ter em mente que os genomas vegetais contêm vários genes *U6* com diferentes níveis de expressão, mas nem todos os promotores *U6* são igualmente eficientes na condução da expressão gênica (Domitrovich; Kunkel, 2003; Wang et al., 2008). Ao desenvolver sistemas CRISPR/Cas9 para novas espécies, é importante investir tempo caracterizando promotores *U6* exógenos e endógenos a fim de escolher o ideal, especialmente se o sistema de transformação for difícil ou demorado. Em termos práticos, o principal cuidado que se deve tomar a respeito do promotor *U6* durante o desenho do vetor, em experimentos com Cas9 e dCas9, é a presença de uma guanina (G) na extremidade 3’ do promotor (região mais próxima do primeiro nucleotídeo do sgRNA). Caso a sequência disponível do promotor *U6* em questão não apresente esse nucleotídeo, o primeiro nucleotídeo do sgRNA deve ser uma guanina. Em alguns casos, alguns pesquisadores adicionam uma guanina extra à sequência do sgRNA durante o desenho, a fim de otimizar sua expressão.

- b) **Spacer:** esta é a porção do sgRNA que efetivamente irá reconhecer uma sequência no genoma-alvo. Os principais aspectos do seu desenho foram minuciosamente descritos anteriormente. No cassete de expressão do sgRNA, o *spacer* vem imediatamente após o promotor *U6* e antes do *RNA scaffold*.
- c) **RNA scaffold:** é a porção constante presente no sgRNA, importante na ancoragem e interação com a Cas9/dCas9. Como visto antes, estruturalmente, o *RNA scaffold* da nuclease Cas9 (e também da dCas9) é formado por um *tetraloop* e três *stem loops*. Para a tecnologia dCas9, o *RNA scaffold* pode se

apresentar de duas formas: 1) forma tradicional, com a sequência padrão, sem modificação alguma, usado principalmente em abordagens em que não se utiliza aptâmeros de RNA para amplificar a modulação transcricional. Nessa abordagem, a modulação transcricional ou epigenética é mediada somente pelo ModT fusionado com a dCas9; 2) forma modificada (metodologia SAM), em que são inseridas sequências de aptâmeros de RNA (por exemplo, MS2, PP7 e COM) tanto na região do *tetraloop* quanto no *stem loop 2*. A inserção desses aptâmeros de RNA é o que possibilita o reconhecimento por proteína adaptadora (por exemplo, MCP, PCP e COM), sendo cada uma específica para cada aptâmero (Haimovich et al., 2016; Johansson et al., 1997; Lim e Peabody, 2002; Zhang et al., 2019c). Essas proteínas adaptadoras, por sua vez, estão fusionadas com domínios modulares da transcrição. Assim, a escolha de qual forma deve ser usada necessita estar em perfeita consonância com a estratégia experimental abordada. Independentemente da forma a ser utilizada, no cassete de expressão do sgRNA, o *RNA scaffold* vem imediatamente após o *spacer* e antes do terminador *U6*.

- d) **Terminador U6:** a maioria das pol III que reconhecem promotores como o *U6* reconhecem terminadores curtos e simples (repetição de 10 timinas adicionados em sequência ao 3' do último nucleotídeo da sequência que será expressa) (Gao et al., 2018). Não se deve substituí-lo por qualquer outro terminador utilizado no laboratório.

**Módulo 3:** Expressão da proteína de fusão Adaptador:ModT. A presença deste módulo está vinculada com a metodologia SAM (sgRNA com aptâmeros de RNA). Caso a abordagem seja a clássica (apenas a dCas9 fusionada com ModT), ele não deve ser inserido no desenho do vetor. Este módulo apresenta três elementos: 1) promotor; 2) proteína de fusão Adaptador:ModT; e 3) terminador.

- a) **Promotor:** a escolha do promotor para a expressão da proteína deve ser alinhada com a escolha do promotor descrito no Módulo 1, seguindo exatamente os mesmos critérios de escolha, visto que a expressão da dCas9 e da proteína de fusão Adaptador:ModT devem ser sincronizadas. Se possível, ambos os Módulos devem apresentar a mesma região promotora.
- b) **Proteína de fusão Adaptador:ModT:** a escolha do adaptador deve ser alinhada com a escolha do aptâmero de RNA inserido no *RNA scaffold* do sgRNA, uma vez que o acoplamento adaptador-aptâmero é específico. Por exemplo, se o aptâmero escolhido for o MS2, a proteína adaptadora deve ser a MCP. Devido à ampla aplicação biotecnológica, a identificação de novos pares adaptador-aptâmero vem crescendo a cada dia (Zhang et al., 2019c). Com relação aos ModTs escolhidos, a maioria das construções que obtiveram sucesso

com a tecnologia dCas9 apresentavam tais domínios fusionados in tandem com o carboxiterminal da proteína adaptadora, devidamente separados por *linkers*. Não existe nenhum relato que limite o número de ModTs fusionados, mas a maioria das construções apresentam somente 1 ou 2. Além disso, de forma similar à proteína dCas9, a proteína de fusão necessita ser transportada para o núcleo para que desempenhe sua atividade. Dessa forma, é necessário inserir NLSs, seguindo os mesmos critérios apresentados no Módulo 1 para a dCas9. Inclusive, neste caso, o NLS é comumente inserido entre a proteína adaptadora e o primeiro ModT, funcionando também como um *linker*.

- c) **Terminador:** de forma similar ao que foi apresentado no Módulo 1, a escolha do terminador é mais livre. Qualquer terminador que seja reconhecido por uma pol II pode ser utilizado, como, por exemplo, o terminador *NOS*.

**Módulo 4:** Expressão do Marcador de Seleção. Este módulo é específico para cada espécie de planta, levando sempre em consideração a metodologia de transformação que será utilizada. Similar aos Módulos 1 e 3, três elementos são importantes: 1) promotor; 2) marcador de seleção, que na maior parte das vezes é um gene que confere resistência a um antibiótico ou herbicida, mas pode ser qualquer um gene repórter, tal como *gfp*, *gus*, entre outros; e 3) terminador. Visto que o desenho deste módulo pode variar, sugere-se somente que não se repitam promotores e/ou terminadores que já tenham sido utilizados anteriormente nos Módulos 1 e 3, a fim de evitar um possível silenciamento na planta (Figura 5).

**Outras considerações:** além das acima mencionadas, algumas informações extras são importantes no desenho do vetor:

- a) Na maioria dos laboratórios, a construção do vetor se dá por síntese química. Se for esse o caso, uma consideração importante a ser levada em conta é a otimização do *codon usage* dos genes que serão expressos nos Módulos 1, 3 e 4. Esse cuidado é extremamente relevante para que a tradução dos genes presentes nesses módulos seja também otimizada na planta de interesse.
- b) Mantenha todos os Módulos na mesma direção, a fim de evitar impedimentos físicos durante a transcrição.
- c) Sugere-se que sejam inseridos sítios únicos para enzimas de restrição entre cada módulo a fim de facilitar a manipulação do vetor final (se necessário).
- d) Como visto anteriormente, os sgRNAs podem ser expressos em simplex (1 sgRNA) ou em multiplex (2 ou mais sgRNAs). Para sistemas multiplex, cada sgRNA deve ser expresso individualmente, isto é, cada sgRNA deve ter seu promotor *U6* e seu terminador *U6*. Em vias de regra, para expressão de diferentes sgRNAs no mesmo vetor em que se encontra a dCas9, o Módulo 2 deve ser

repetido in tandem (de preferência separadas por sítios únicos de restrição). Cada cópia do Módulo irá apresentar um sgRNA diferente. Mesmo que não existam relatos do número máximo de sgRNAs que podem ser expressos em uma mesma construção, sistemas que obtiveram sucesso não ultrapassaram quatro sgRNAs por construção.

- e) Os *backbones* mais utilizados para a clonagem do cassete de transformação são vetores binários baseados no T-DNA de *A. tumefaciens*, mas este pode ser substituído por outro, dependendo da planta de interesse e da metodologia de transformação utilizada. Além disso, a clonagem do cassete de transformação no *backbone* escolhido e posterior amplificação do vetor final em bactéria pode ser dificultada pelo tamanho do cassete de transformação, que pode chegar a ter de 10.000 a 15.000 pares de bases. Caso o vetor escolhido como *backbone* seja baseado no T-DNA de *A. tumefaciens*, sugere-se que o Módulo 4 (referente ao marcador de seleção) se localize mais próximo à borda esquerda (LB, do inglês *Left Border*), a fim de otimizar a seleção de plantas transformadas nas quais o cassete de transformação foi inserido completamente no genoma-alvo.

## Considerações finais

A tecnologia CRISPR/dCas9 aplicada à modulação da expressão gênica tem como principal diferencial a possibilidade de promover o controle transcricional em escala multigênica, simulando as redes de interação gênica inerentes às principais vias metabólicas celulares. Trata-se de uma ferramenta-chave para a biologia sintética e para o aprofundamento do conhecimento de vias relacionadas ao desenvolvimento e produtividade em plantas, bem como à resposta a estresses bióticos e abióticos, alvos frequentes da engenharia genética para o melhoramento de plantas. Além disso, CRISPR/dCas9 é uma tecnologia simples e funcional em sistemas transientes de transformação, o que permite uma rápida simulação e visualização dos efeitos da modulação da expressão do gene-alvo em vias metabólicas celulares. As diversas estratégias disponíveis, variando elementos como ModT e nucleases, permitem a adaptação e uso da técnica em diferentes modelos de estudos.

Como vantagem do sistema CRISPRa para a ativação transcricional de um gene endógeno, em comparação à estratégia de superexpressão, usando promotores constitutivos e a sequência codificadora completa do gene, tem-se que, muitas vezes, esse tipo de expressão ectópica omite os padrões de *splicing* do gene endógeno e mascara transcritos alternativos. Como consequência, o produto gênico pode ser instável, interagir com parceiros não convencionais ou ter sua localização

subcelular incorreta (Park et al., 2017). No entanto, ao se trabalhar com a tecnologia CRISPR/dCas9, alguns aspectos merecem atenção:

- a) Como a tecnologia CRISPR/dCas9 não induz alterações definitivas na região genômica-alvo, as plantas geradas serão sempre transgênicas. Caso o intuito seja o desenvolvimento de um produto biotecnológico, isso pode acarretar em um processo longo e oneroso para liberação comercial.
- b) Por depender de processos celulares de controle transcricional, o efeito na modulação da expressão do gene-alvo pode ser variável entre as linhagens transgênicas obtidas. Apesar de herdável ao longo das gerações transgênicas, o efeito na modulação pode também ser variável entre planta-mãe e plantas-filhas ou ainda sofrer influência de fatores ambientais.
- c) A tecnologia exige um conhecimento mínimo da sequência da região promotora-alvo, o que pode ser um fator limitador quando se trabalha com espécies sem informação genômica detalhada.

Nesse contexto, os constantes aprimoramentos da técnica, principalmente visando aumentar sua especificidade e eficiência, como, por exemplo, com a utilização de outros ortólogos Cas, permitirão o aumento da abrangência do seu uso, sobretudo em pesquisas com plantas cultivadas, uma vez que até o momento foram realizadas pesquisas apenas com espécies modelo.

## Referências

- ABADI, S.; YAN, W.X.; AMAR, D.; MAYROSE, I. A machine learning approach for predicting {CRISPR}-Cas9 cleavage efficiencies and patterns underlying its mechanism of action. **PLoS Computational Biology**, 13, 2017. e1005807. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005807>
- ALKAN, F.; WENZEL, A.; ANTHON, C.; HAVGAARD, J. H.; GORODKIN, J. CRISPR-Cas9 off-targeting assessment with nucleic acid duplex energy parameters. **Genome Biology**, 19, n.177, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1534-x>
- ANDERS, C.; NIEWOEHNER, O.; DUERST, A.; JINEK, M. Structural basis of PAM-dependent target {DNA} recognition by the Cas9 endonuclease. **Nature**, 513, p. 569–573, 2014. <https://doi.org/10.1038/nature13579>
- BASSO, M. F.; ARRAES, F. B. M.; GROSSI-DE-SA, M.; MOREIRA, V. J. V.; ALVES-FERREIRA, M.; GROSSI-DE-SA, M. F. Insights into genetic and molecular elements for transgenic crop development. **Frontiers in Plant Science**, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00509>
- BEERLI, R. R.; SEGAL, D. J.; DREIER, B.; BARBAS, C. F. 1998. Toward controlling gene expression at will: Specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins

constructed from modular building blocks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 14628–14633, 1998. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14628>

CHAVEZ, A.; SCHEIMAN, J.; VORA, S.; PRUITT, B. W.; TUTTLE, M.; IYER, P. R.; LIN, S.; KIANI, S.; GUZMAN, C. D.; WIEGAND, D. J.; TER-OVANESYAN, D.; BRAFF, J. L.; DAVIDSOHN, N.; HOUSDEN, B. E.; PERRIMON, N.; WEISS, R.; AACH, J.; COLLINS, J. J.; CHURCH, G. M. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. **Nature Methods**, v. 12, p. 326–328, 2015. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3312>

CHEN, B.; GILBERT, L. A.; CIMINI, B. A.; SCHNITZBAUER, J.; ZHANG, W.; LI, G.-W.; PARK, J.; BLACKBURN, E. H.; WEISSMAN, J. S.; QI, L. S.; HUANG, B. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas System. **Cell Press Journal**, v. 155, n. 7 1479–1491, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>

CHUAI, G.-H.; WANG, Q.-L.; LIU, Q. In silico meets in vivo: towards computational CRISPR-based sgRNA design. **Trends Biotechnology**, v. 35, p. 12–21, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.06.008>

CHUAI, G.; MA, H.; YAN, J.; CHEN, M.; HONG, N.; XUE, D.; ZHOU, C.; ZHU, C.; CHEN, K.; DUAN, B.; GU, F.; QU, S.; HUANG, D.; WEI, J.; LIU, Q. DeepCRISPR: optimized CRISPR guide {RNA} design by deep learning. **Genome Biology**, v. 19, n. 80, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1459-4>

CONG, L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HABIB, N.; HSU, P. D.; WU, X.; JIANG, W.; MARRAFFINI, L. A.; ZHANG, F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, n. 339, 819–823, 2013. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>

DANG, Y.; JIA, G.; CHOI, J.; MA, H.; ANAYA, E.; YE, C.; SHANKAR, P.; WU, H. Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. **Genome Biology**, v. 16, n. 280, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0846-3>

DEANER, M.; ALPER, H. S. Systematic testing of enzyme perturbation sensitivities via graded {dCas9} modulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 40, p. 14–22, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.01.012>

DEANER, M.; MEJIA, J.; ALPER, H. S. Enabling graded and large-scale multiplex of desired genes using a dual-mode dCas9 activator in *Saccharomyces cerevisiae*. **ACS Synthetic Biology**, v. 6, p. 1931–1943, 2017. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00163>

DiCARLO, J. E.; NORVILLE, J. E.; MALI, P.; RIOS, X.; AACH, J.; CHURCH, G. M. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 4336–4343, 2013. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt135>

DOENCH, J. G.; FUSI, N.; SULLENDER, M.; HEGDE, M.; VAIMBERG, E. W.; DONOVAN, K. F.; SMITH, I.; TOTHOVA, Z.; WILEN, C.; ORCHARD, R.; VIRGIN, H. W.; LISTGARTEN, J.; ROOT, D. E. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 184–191, 2016. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>

DOENCH, J.G.; HARTENIAN, E.; GRAHAM, D.B.; TOTHOVA, Z.; HEGDE, M.; SMITH, I.; SULLENDER, M.; EBERT, B.L.; XAVIER, R.J.; ROOT, D.E. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. **Nature Biotechnology**, v. 32, p. 1262–1267, 2014. <https://doi.org/10.1038/nbt.3026>

- DOMITROVICH, A. M.; KUNKEL, G. R. Multiple, dispersed human U6 small nuclear RNA genes with varied transcriptional efficiencies. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 2344–2352, 2003. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg331>
- DREISSIG, S.; SCHIML, S.; SCHINDELE, P.; WEISS, O.; RUTTEN, T.; SCHUBERT, V.; GLADILIN, E.; METTE, M. F.; PUCHTA, H.; HOUBEN, A. Live-cell CRISPR imaging in plants reveals dynamic telomere movements. **The Plant Journal**, v. 91, p. 565–573, 2017. <https://doi.org/10.1111/tpj.13601>
- FARZADFARD, F.; PERLI, S. D.; LU, T. K. Tunable and multifunctional eukaryotic transcription factors based on CRISPR/Cas. **ACS Synthetic Biology**, v. 2, p. 604–613, 2013. <https://doi.org/10.1021/sb400081r>
- FERREIRA, R.; SKREKAS, C.; NIELSEN, J.; DAVID, F. Multiplexed CRISPR/Cas9 genome editing and gene regulation using Csy4 in *Saccharomyces cerevisiae*. **ACS Synthetic Biology**, v. 7, p. 10–15, 2018. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00259>
- FONFARA, I.; LE RHUN, A.; CHYLINSKI, K.; MAKAROVA, K. S.; LÉCRIVAIN, A.-L.; BZDRENGA, J.; KOONIN, E. V.; CHARPENTIER, E. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 2577–2590, 2014. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1074>
- FRIEDLAND, A. E.; TZUR, Y. B.; ESVELT, K. M.; COLAIÁCOVO, M. P.; CHURCH, G. M.; CALARCO, J. A. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. **Nature Methods**, v. 10, 741–743, 2013. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2532>
- FU, Y.; SANDER, J. D.; REYON, D.; CASCIO, V. M.; JOUNG, J. K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. **Nature Biotechnology**, v. 32, p. 279–284, 2014. <https://doi.org/10.1038/nbt.2808>
- GAO, Y.; ZHAO, Y. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, p. 343–349, 2014. <https://doi.org/10.1111/jipb.12152>
- GAO, Z.; HERRERA-CARRILLO, E.; BERKHOUT, B. Delineation of the exact transcription termination signal for type 3 polymerase III. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 10, p. 36–44, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.11.006>
- GASPARIS, S.; KAŁA, M.; PRZYBOROWSKI, M.; ŁYŻNIK, L. A.; ORCZYK, W.; NADOLSKA-ORCZYK, A. A simple and efficient CRISPR/Cas9 platform for induction of single and multiple, heritable mutations in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Methods**, v. 14, 111, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0382-8>
- GAUDELLI, N. M.; KOMOR, A. C.; REES, H. A.; PACKER, M. S.; BADRAN, A. H.; BRYSON, D. I.; LIU, D. R. Programmable base editing of T to G C in genomic DNA without DNA cleavage. **Nature**, v. 551, p. 464–471, 2017. <https://doi.org/10.1038/nature24644>
- GILBERT, L. A.; LARSON, M. H.; MORSUT, L.; LIU, Z.; BRAR, G.A.; TORRES, S.E.; STERN-GINOSSAR, N.; BRANDMAN, O.; WHITEHEAD, E. H.; DOUDNA, J. A.; LIM, W. A.; WEISSMAN, J. S.; QI, L. S. CRISPR-mediated modular {RNA}-guided regulation of transcription in eukaryotes. **Cell**, v. 154, p. 442–451, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>

GRAHAM, D. B.; ROOT, D. E. Resources for the design of CRISPR gene editing experiments. **Genome Biology**, v. 16, 260, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0823-x>

GRATZ, S. J.; UKKEN, F. P.; RUBINSTEIN, C. D.; THIEDE, G.; DONOHUE, L. K.; CUMMINGS, A. M.; O'CONNOR-GILES, K. M., 2014. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. **Genetics**, v. 196, p. 961–971, 2014. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.160713>

GRIESENBECK, J.; BOEGER, H.; STRATTAN, J. S.; KORNBORG, R. D. Affinity purification of specific chromatin segments from chromosomal loci in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, p. 9275–9282, 2003. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.24.9275-9282.2003>

HAEUSSLER, M.; SCHÖNIG, K.; ECKERT, H.; ESCHSTRUTH, A.; MIANNÉ, J.; RENAUD, J.-B.; SCHNEIDER-MAUNOURY, S.; SHKUMATAVA, A.; TEBOUL, L.; KENT, J.; JOLY, J.-S.; CONCORDET, J.-P. 2016. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. **Genome Biology**, v.17, p.148, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2>

HAIMOVICH, G.; ZABEZHINSKY, D.; HAAS, B.; SLOBODIN, B.; PURUSHOTHAMAN, P.; FAN, L.; LEVIN, J. Z.; NUSBAUM, C.; GERST, J. E. Use of the MS2 aptamer and coat protein for RNA localization in yeast: a response to MS2 coat proteins bound to yeast mRNAs block 5' to 3' degradation and trap mRNA decay products: implications for the localization of mRNAs by MS2-MCP sys". **RNA**, v. 22, p. 660–666, 2016. <https://doi.org/10.1261/rna.055095.115>

HILTON, I. B.; D'IPPOLITO, A. M.; VOCKLEY, C. M.; THAKORE, P. I.; CRAWFORD, G. E.; REDDY, T. E.; GERSBACH, C. A. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. **Nature Biotechnology**, v. 33, p. 510–517, 2015. <https://doi.org/10.1038/nbt.3199>

HORLBECK, M. A.; GILBERT, L. A.; VILLALTA, J. E.; ADAMSON, B.; PAK, R. A.; CHEN, Y.; FIELDS, A.P.; PARK, C. Y.; CORN, J. E., KAMPMANN, M.; WEISSMAN, J. S. 2016. Compact and highly active next-generation libraries for {CRISPR}-mediated gene repression and activation. **eLife**, 2016. <https://doi.org/10.7554/eLife.19760>

HOWE, F. S.; RUSSELL, A.; LAMSTAES, A. R.; EI-SAGHEER, A.; NAIR, A.; BROWN, T.; MELLOR, J. CRISPRi is not strand-specific at all loci and redefines the transcriptional landscape. **eLife**, 2017. <https://doi.org/10.7554/eLife.29878>

HSU, P. D.; LANDER, E. S.; ZHANG, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. **Cell**, v. 157, p.1262–1278, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>

HSU, P. D.; SCOTT, D. A.; WEINSTEIN, J. A.; RAN, F. A.; KONERMANN, S.; AGARWALA, V.; LI, Y.; FINE, E. J.; WU, X.; SHALEM, O.; CRADICK, T. J.; MARRAFFINI, L. A.; BAO, G.; ZHANG, F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. **Nature Biotechnology**, v. 31, p. 827–832, 2013. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>

HUA, K.; TAO, X.; YUAN, F.; WANG, D.; ZHU, J.-K. Precise AT to GC base editing in the rice genome. **Molecular Plant**, p. 627–630, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.02.007>

HWANG, G.-H.; PARK, J.; LIM, K.; KIM, S.; YU, J.; YU, E.; KIM, S.-T.; EILS, R.; KIM, J.-S.; BAE, S. Web-based design and analysis tools for CRISPR base editing. **BMC Bioinforma**, v. 19, 542, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2585-4>

- IKEDA, M.; OHME-TAKAGI, M. A Novel Group of Transcriptional Repressors in Arabidopsis. P **Plant and Cell Physiology**, v. 50, 970–975, 2009. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp048>
- JACKSON, J. P.; LINDROTH, A. M.; CAO, X.; JACOBSEN, S. E. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. **Nature**, v. 416, p. 556–560, 2002. <https://doi.org/10.1038/nature731>
- JENSEN, E. D.; FERREIRA, R.; JAKOČIŪNAS, T.; ARSOVSKA, D.; ZHANG, J.; DING, L.; SMITH, J. D.; DAVID, F.; NIELSEN, J.; JENSEN, M. K.; KEASLING, J. D. Transcriptional reprogramming in yeast using dCas9 and combinatorial {gRNA} strategies. **Microbial Cell Factories**, v. 16, p. 46, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0664-2>
- JIANG, C.; PUGH, B. F. A compiled and systematic reference map of nucleosome positions across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. **Genome Biology**, 10, R109, 2009. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-10-r109>
- JIANG, F.; DOUDNA, J. A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. **Annual Review of Biophysics**, v. 46, p. 505–529, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- JIANG, W.; ZHOU, H.; BI, H.; FROMM, M.; YANG, B.; WEEKS, D. P. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. N **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. e188, 2013. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt780>
- JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, n. 6096 p. 816–821, 2012. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- JINEK, M.; JIANG, F.; TAYLOR, D. W.; STERNBERG, S. H.; KAYA, E.; MA, E.; ANDERS, C.; HAUER, M.; ZHOU, K.; LIN, S.; KAPLAN, M.; IAVARONE, A. T.; CHARPENTIER, E.; NOGALES, E.; DOUDNA, J. A. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. **Science**, v. 343, n. 6176, 1247997, 2014. <https://doi.org/10.1126/science.1247997>
- JOHANSSON, H. E.; LILJAS, L.; UHLENBECK, O. C. RNA recognition by the MS2 phage coat protein. **Seminars in Virology**, v. 8, p. 176-185, 1997. <https://doi.org/10.1006/smvy.1997.0120>
- KANG, B. C.; YUN, J. Y.; KIM, S. T.; SHIN, Y. J.; RYU, J.; CHOI, M.; WOO, J. W.; KIM, J. S. Precision genome engineering through adenine base editing in plants. **Nature Plants**, v. 4, p. 427-431, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0178-x>
- KHOSRAVI, S.; SCHINDELE, P.; GLADILIN, E.; DUNEMANN, F.; RUTTEN, T.; PUCHTA, H.; HOUBEN, A. Application of aptamers improves CRISPR-based live imaging of plant telomeres. **bioRxiv**, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.05.05.078246>
- KIANI, S.; CHAVEZ, A.; TUTTLE, M.; HALL, R. N.; CHARI, R.; TER-OVANESYAN, D.; QIAN, J.; PRUITT, B. W.; BEAL, J.; VORA, S.; BUCHTHAL, J.; KOWAL, E. J. K.; EBRAHIMKHANI, M. R.; COLLINS, J. J.; WEISS, R.; CHURCH, G. Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression. **Nature Methods**, v. 12, p. 1051–1054, 2015. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3580>
- KOMOR, A. C.; KIM, Y. B.; PACKER, M. S.; ZURIS, J. A.; LIU, D. R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. **Nature**, v. 533, p. 420–424, 2016. <https://doi.org/10.1038/nature17946>

- KONERMANN, S.; BRIGHAM, M. D.; TREVINO, A. E.; JOUNG, J.; ABUDAYYEH, O. O.; BARCENA, C.; HSU, P. D.; HABIB, N.; GOOTENBERG, J. S.; NISHIMASU, H.; NUREKI, O.; ZHANG, F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. **Nature**, v. 517, p. 583–588, 2015. <https://doi.org/10.1038/nature14136>
- KUANG, Y.; LI, S.; REN, B.; YAN, F.; SPETZ, C.; LI, X.; ZHOU, X.; ZHOU, H. Base-editing-mediated artificial evolution of OsALS1 in planta to develop novel. **Molecular Plant**, v. 13, n. 4, p. 565–572, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.01.010>
- LABUN, K.; MONTAGUE, T. G.; GAGNON, J. A.; THYME, S. B.; VALEN, E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1,8, p. W272–W276, 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw398>
- LABUN, K.; MONTAGUE, T. G.; KRAUSE, M.; TORRES CLEUREN, Y. N.; TJELDNE, H.; VALEN, E. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, 02, p. W171–W174, 2019. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz365>
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, n. 9, p. 357–359, 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M.; SALZBERG, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v. 10, n. R25, 2009. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
- LEE, J. E.; NEUMANN, M.; DURO, D. I.; SCHMID, M. CRISPR-based tools for targeted transcriptional and epigenetic regulation in plants. **PLoS One**, v. 14, p. 1–17, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222778>
- LEE, W.; TILLO, D.; BRAY, N.; MORSE, R. H.; DAVIS, R. W.; HUGHES, T. R.; NISLOW, C. A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. **Nature Genetics**, v. 39, p. 1235–1244, 2007. <https://doi.org/10.1038/ng2117>
- LEI, Y.; LU, L.; LIU, H.-Y.; LI, S.; XING, F.; CHEN, L.-L. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, p. 1494–1496, 2014. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu044>
- LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 2009. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- LI, J.-F.; ZHANG, D.; SHEEN, J. Cas9-based genome editing in Arabidopsis and tobacco. **Methods in Enzymology**, v. 546, p. 459–472, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00022-2>
- LI, J.; NORVILLE, J. E.; AACH, J.; MCCORMACK, M.; ZHANG, D.; BUSH, J.; CHURCH, G. M.; SHEEN, J. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide {RNA} and Cas9. **Nature Biotechnology**, v. 31, p. 688–691, 2013. <https://doi.org/10.1038/nbt.2654>
- LI, X.; JIANG, D.-H.; YONG, K.; ZHANG, D.-B. Varied transcriptional efficiencies of multiple Arabidopsis U6 small nuclear {RNA} genes. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, p. 222–229, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00393.x>

LI, Y.; ZHU, J.; WU, H.; LIU, C.; HUANG, C.; LAN, J.; ZHAO, Y.; XIE, C. Precise base editing of non-allelic acetolactate synthase genes confers sulfonyleurea herbicide resistance in maize. **The Crop Journal**, v. 8, n. 3, p. 4–11, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2019.10.001>

LI, Z.; ZHANG, D.; XIONG, X.; YAN, B.; XIE, W.; SHEEN, J.; LI, J. F. A potent Cas9-derived gene activator for plant and mammalian cells. **Nature Plants**, v. 3, p. 930–936, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0046-0>

LIM, F.; PEABODY, D. S. RNA recognition site of PP7 coat protein. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 4138–4144, 2002. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf552>

LIU, G.; ZHANG, Y.; ZHANG, T. Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. **Computational and Structural Biotechnolog**, v. 18, p. 35–44, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.11.006>

LIU, H.; DING, Y.; ZHOU, Y.; JIN, W.; XIE, K.; CHEN, L.-L. CRISPR-P 2.0: an improved CRISPR-Cas9 tool for genome editing in plants. **Molecular Plant**, v. 10, n. 3, p. 530–532, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.003>

LIU, H.; WEI, Z.; DOMINGUEZ, A.; LI, Y.; WANG, X.; QI, L. S. CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. **Bioinformatics**, v. 31, p. 3676–3678, 2015. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv423>

LONG, L.; GUO, D.-D.; GAO, W.; YANG, W.-W.; HOU, L.-P.; MA, X.-N.; MIAO, Y.-C.; BOTELLA, J. R.; SONG, C.-P. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing in cotton by improved sgRNA expression. **Plant Methods**, v. 14, n. 85, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0353-0>

LOWDER, L. G.; ZHANG, D.; BALTES, N. J.; PAUL, J. W.; TANG, X.; ZHENG, X.; VOYTAS, D. F.; HSIEH, T. F.; ZHANG, Y.; QI, Y. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. **Plant Physiology**, v. 169, n. 2, p. 971–985, 2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00636>

LOWDER, L. G.; ZHOU, J.; ZHANG, Y.; MALZAHN, A.; ZHONG, Z.; HSIEH, T. F.; VOYTAS, D. F.; ZHANG, Y.; QI, Y. Robust transcriptional activation in plants using multiplexed CRISPR-Act2.0 and mTALE-Act Systems. **Molecular Plant**, v. 11, n. 2, p. 245–256, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.11.010>

MAHFOUZ, M. M.; LI, L.; SHAMIMUZZAMAN, M.; WIBOWO, A.; FANG, X.; ZHU, J. K. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 6, 2623–2628, 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019533108>

MANS, R.; van ROSSUM, H. M.; WIJSMAN, M.; BACKX, A.; KUIJPERS, N. G. A.; van den BROEK, M.; DARAN-LAPUJADE, P.; PRONK, J. T.; van MARIS, A. J. A.; DARAN, J.-M. G. CRISPR/Cas9: a molecular Swiss army knife for simultaneous introduction of multiple genetic modifications in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 2, 2015. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov004>

MAO, C.; BROWN, C. R.; GRIESENBECK, J.; BOEGER, H. Occlusion of regulatory sequences by promoter nucleosomes in vivo. **PLoS One**, v. 6, e17521, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017521>

MARK, C.; ABRINK, M.; HELLMAN, L. Comparative Analysis of KRAB Zinc Finger Proteins in Rodents and Man: Evidence for Several Evolutionarily Distinct Subfamilies of KRAB Zinc Finger Genes. **DNA and Cell Biology**, v. 18, n. 5, 381–396, 1999. <https://doi.org/10.1089/104454999315277>

- MIKAMI, M.; TOKI, S.; ENDO, M. Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 88, p. 561–572, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0342-x>
- MINKENBERG, B.; ZHANG, J.; XIE, K.; YANG, Y. CRISPR-PLANT v2: an online resource for highly specific guide RNA spacers based on improved off-target analysis. **Plant Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 5–8, 2019. <https://doi.org/10.1111/pbi.13025>
- MIYAGISHI, M.; TAIRA, K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 497–500, 2002. <https://doi.org/10.1038/nbt0502-497>
- MONTAGUE, T. G.; CRUZ, J. M.; GAGNON, J. A.; CHURCH, G. M.; VALEN, E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W401-7. <https://doi.org/10.1093/nar/gku410>
- MORENO-MATEOS, M. A.; VEJNAR, C. E.; BEAUDOIN, J.-D.; FERNANDEZ, J. P.; MIS, E. K.; KHOKHA, M. K.; GIRALDEZ, A. J. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. **Nature Methods**, v. 12, p. 982-988, 2015. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3543>
- NAMI, F.; BASIRI, M.; SATARIAN, L.; CURTISS, C.; BAHARVAND, H.; VERFAILLIE, C. Strategies for in vivo genome editing in nondividing cells. **Trends Biotechnology**, 36, n. 8, p. 770-786, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.03.004>
- NG, H.; DEAN, N. Dramatic improvement of CRISPR/Cas9 editing in *Candida albicans* by increased single guide RNA expression. **mSphere**, v. 19, n. 2:e00385-16, 2017. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00385-16>
- NISHIDA, K.; ARAZOE, T.; YACHIE, N.; BANNO, S.; KAKIMOTO, M.; TABATA, M.; MOCHIZUKI, M.; MIYABE, A.; ARAKI, M.; HARA, K. Y.; SHIMATANI, Z.; KONDO, A. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. **Science**, v. 353, n. 6305, 2016. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8729>
- NISHIMASU, H.; RAN, F. A.; HSU, P. D.; KONERMANN, S.; SHEHATA, S. I.; DOHMAE, N.; ISHITANI, R.; ZHANG, F.; NUREKI, O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. **Cell**, v. 156, p. 935–949, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- OHTA, M.; MATSUI, K.; HIRATSU, K.; SHINSHI, H.; OHME-TAKAGI, M. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. **Plant Cell**, v. 13, p. 1959–1968, 2001. <https://doi.org/10.1105/TPC.010127>
- PAPIKIAN, A.; LIU, W.; GALLEGRO-BARTOLOMÉ, J.; JACOBSEN, S. E. Site-specific manipulation of Arabidopsis loci using CRISPR-Cas9 SunTag systems. **Nature Communications**, v. 10, p.1-11, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08736-7>
- PARK, J.; BAE, S.; KIM, J.-S. Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites. **Bioinformatics**, v. 15, n. 31, p. 4014–4016, 2015. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv537>
- PARK, J.; DEMPEWOLF, E.; ZHANG, W.; WANG, Z. RNA-guided transcriptional activation via CRISPR / dCas9 mimics overexpression phenotypes in Arabidopsis. **Plos One**, v. 12, n. 6, p.1-13. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179410>

- PENG, D.; TARLETON, R. EuPaGDT: a web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. **Microbial Genomics**, v. 30, n. 1(4):e000033, 2015. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000033>
- PEREZ, A. R.; PRITYKIN, Y.; VIDIGAL, J. A.; CHHANGAWALA, S.; ZAMPARO, L.; LESLIE, C. S.; VENTURA, A. GuideScan software for improved single and paired CRISPR guide RNA design. **Nature Biotechnology**, v. 35, p. 347–349, 2017. <https://doi.org/10.1038/nbt.3804>
- PFLUEGER, C.; TAN, D.; SWAIN, T.; NGUYEN, T.; PFLUEGER, J.; NEFZGER, C.; POLO, J. M.; FORD, E.; LISTER, R. A modular dCas9-SunTag DNMT3A epigenome editing system overcomes pervasive off-target activity of direct fusion dCas9-DNMT3A constructs. **Genome Research**, v. 28, p. 1193–1206, 2018. <https://doi.org/10.1101/gr.233049.117>
- PIATEK, A.; ALI, Z.; BAAZIM, H.; LI, L.; ABULFARAJ, A.; AL-SHAREEF, S.; AOUIDA, M.; MAHFOUZ, M. M. RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors. **Plant Biotechnology**, 13, n. 4, p. 578–589, 2015. <https://doi.org/10.1111/pbi.12284>
- PULIDO-QUETGLAS, C.; APARICIO-PRAT, E.; ARNAN, C.; POLIDORI, T.; HERMOSO, T.; PALUMBO, E.; PONOMARENKO, J.; GUIGO, R.; JOHNSON, R. Scalable design of paired CRISPR guide RNAs for genomic deletion. **PLOS Computational Biology**, v. 13, n. 3:e1005341, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005341>
- QI, L. S.; LARSON, M. H.; GILBERT, L. A.; DOUDNA, J. A.; WEISSMAN, J. S.; ARKIN, A. P.; LIM, W. A. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. **Cell**, v. 152, p.1173–1183, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- QI, W.; ZHU, T.; TIAN, Z.; LI, C.; ZHANG, W.; SONG, R. High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize. **BMC Biotechnology**, v. 16, n. 58. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0289-2>
- RADZISHEUSKAYA, A.; SHLYUEVA, D.; MÜLLER, I.; HELIN, K. Optimizing sgRNA position markedly improves the efficiency of CRISPR/dCas9-mediated transcriptional repression. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n.18:e141, 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw583>
- RANDO, O. J.; CHANG, H. Y. Genome-wide views of chromatin structure. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 245–271, 2009. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.071107.134639>
- RANDO, O. J.; WINSTON, F. Chromatin and transcription in yeast. **Genetics**, v.190, p. 351–387, 2012. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.132266>
- ROCA PAIXÃO, J. F.; GILLET, F. X.; RIBEIRO, T. P.; BOURNAUD, C.; LOURENÇO-TESSUTTI, I. T.; NORIEGA, D. D.; MELO, B. P. DE; DE ALMEIDA-ENGLER, J.; GROSSI-DE-SA, M. F. Improved drought stress tolerance in Arabidopsis by CRISPR/dCas9 fusion with a Histone Acetyltransferase. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-9, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44571-y>
- RYAN, O. W.; SKERKER, J. M.; MAURER, M. J.; LI, X.; TSAI, J. C.; PODDAR, S.; LEE, M. E.; DeLOACHE, W.; DUEBER, J. E.; ARKIN, A. P.; CATE, J. H. D. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. **eLife**, n. 3 p. e03703, 2014. <https://doi.org/10.7554/eLife.03703>
- SARASUA, B. S. **Synthetic transcriptional repressors design based on the CRISPR-Cas technology in *N. benthamiana***. 2020. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Molecular e Celular de Plantas) – Universidade Politécnica de Valência, Espanha, 2020.

- SCHEP, A. N.; BUENROSTRO, J. D.; DENNY, S. K.; SCHWARTZ, K.; SHERLOCK, G.; GREENLEAF, W. J. Structured nucleosome fingerprints enable high-resolution mapping of chromatin architecture within regulatory regions. **Genome Research**, v. 25, p. 1757-1770, 2015. <https://doi.org/10.1101/gr.192294.115>
- SELMA, S.; BERNABÉ-ORTS, J. M.; VAZQUEZ-VILAR, M.; DIEGO-MARTIN, B.; AJENJO, M.; GARCIA-CARPINTERO, V.; GRANELL, A.; ORZAEZ, D. Strong gene activation in plants with genome-wide specificity using a new orthogonal CRISPR/Cas9-based programmable transcriptional activator. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, p.1703–1705, 2019. <https://doi.org/10.1111/pbi.13138>
- SHAN, Q.; WANG, Y.; LI, J.; ZHANG, Y.; CHEN, K.; LIANG, Z.; ZHANG, K.; LIU, J.; XI, J. J.; QIU, J.-L.; GAO, C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, v. 31, p. 686–688, 2013. <https://doi.org/10.1038/nbt.2650>
- SHEN, M. W.; ARBAB, M.; HSU, J. Y.; WORSTELL, D.; CULBERTSON, S. J.; KRABBE, O.; CASSA, C. A.; LIU, D. R.; GIFFORD, D. K. Sherwood, R. I. Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants. **Nature**, v. 563, p. 646-651, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0686-x>
- SINGH, R.; KUSCU, C.; QUINLAN, A.; QI, Y.; ADLI, M. Cas9-chromatin binding information enables more accurate CRISPR off-target prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 18, p. e118, 2015. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv575>
- SMITH, J. D.; SCHLECHT, U.; XU, W.; SURESH, S.; HORECKA, J.; PROCTOR, M. J.; AIYAR, R. S.; BENNETT, R.A.O.; CHU, A.; LI, Y.F.; ROY, K.; DAVIS, R. W.; STEINMETZ, L. M.; HYMAN, R. W.; LEVY, S. F.; ST ONGE, R. P. A method for high-throughput production of sequence-verified DNA libraries and strain collections. **Molecular Systems Biology**, v. 13, n. 2, p. 913, 2017. <https://doi.org/10.15252/msb.20167233>
- SMITH, J. D.; SURESH, S.; SCHLECHT, U.; WU, M.; WAGIH, O.; PELTZ, G.; DAVIS, R. W.; STEINMETZ, L. M.; PARTS, L.; St ONGE, R. P. Quantitative CRISPR interference screens in yeast identify chemical-genetic interactions and new rules for guide RNA design. **Genome Biology**, v. 17, n. 45, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0900-9>
- STEMMER, M.; THUMBERGER, T.; DEL SOL KEYER, M.; WITTBRODT, J.; MATEO, J. L. Cctop: an intuitive, flexible and reliable crispr/cas9 target prediction tool. **PLoS One**, v. 10, p. e0124633, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124633>
- SULLENGER, B. A. RGEN editing of RNA and DNA: the long and winding road from catalytic RNAs to CRISPR to the clinic. **Cell**, v. 181, p. 955–960, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.050>
- SUN, X.; HU, Z.; CHEN, R.; JIANG, Q.; SONG, G.; ZHANG, H.; XI, Y. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. **Scientific Reports**, v. 5, n. 10342, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep10342>
- TANENBAUM, M. E.; GILBERT, L. A.; QI, L. S.; WEISSMAN, J. S.; VALE, R. D. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. **Cell**, v. 159, n. 3, p. 635–646, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.039>
- TANG, X.; LIU, G.; ZHOU, J.; REN, Q.; YOU, Q.; TIAN, L.; XIN, X.; ZHONG, Z.; LIU, B.; ZHENG, X.; ZHANG, D.; MALZAHN, A.; GONG, Z.; QI, Y.; ZHANG, T.; ZHANG, Y. A large-scale whole-genome sequencing analysis reveals highly specific genome editing by both Cas9 and Cpf1 (Cas12a) nucleases in rice. **Genome Biology**, v. 19, n. 84, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1458-5>

- TANG, X.; LOWDER, L. G.; ZHANG, T.; MALZAHN, A. A.; ZHENG, X.; VOYTAS, D. F.; ZHONG, Z.; CHEN, Y.; REN, Q.; LI, Q.; KIRKLAND, E. R.; ZHANG, Y.; QI, Y. A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. **Nature Plants**, v. 3, n. 17018, 2017. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.18>
- THAKORE, P. I.; D'IPPOLITO, A. M.; SONG, L.; SAFI, A.; SHIVAKUMAR, N. K.; KABADI, A. M.; REDDY, T. E.; CRAWFORD, G. E.; GERSBACH, C. A. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. **Nature Methods**, v. 12, p. 1143–1149, 2015. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3630>
- THYME, S. B.; AKHMETOVA, L.; MONTAGUE, T. G.; VALEN, E.; SCHIER, A. F. Internal guide RNA interactions interfere with Cas9-mediated cleavage. **Nature Communications**, v. 7, p. 11750, 2016. <https://doi.org/10.1038/ncomms11750>
- TIAN, S.; JIANG, L.; CUI, X.; ZHANG, J.; GUO, S.; LI, M.; ZHANG, H.; REN, Y.; GONG, G.; ZONG, M.; LIU, F.; CHEN, Q.; XU, Y. Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing. **Plant Cell Reports**, v. 37, p. 1353–1356, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2299-0>
- TIWARI, S. B.; BELACHEW, A.; MA, S. F.; YOUNG, M.; ADE, J.; SHEN, Y.; MARION, C. M.; HOLTAN, H. E.; BAILEY, A.; STONE, J. K.; EDWARDS, L.; WALLACE, A. D.; CANALES, R. D.; ADAM, L.; RATCLIFFE, O. J.; REPETTI, P. P. The EDLL motif: a potent plant transcriptional activation domain from AP2/ERF transcription factors. **Plant Journal**, v. 70, n. 5, p. 855–865, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04935.x>
- TSAI, S. Q.; ZHENG, Z.; NGUYEN, N. T.; LIEBERS, M.; TOPKAR, V. V.; THAPAR, V.; WYVEKENS, N.; KHAYTER, C.; IAFRATE, A. J.; LE, L. P.; ARYEE, M. J.; JOUNG, J. K. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. **Nature Biotechnology**, v. 33, p. 187–197, 2015. <https://doi.org/10.1038/nbt.3117>
- VAZQUEZ-VILAR, M.; BERNABÉ-ORTS, J. M.; FERNANDEZ-DEL-CARMEN, A.; ZIARSOLO, P.; BLANCA, J.; GRANELL, A.; ORZAEZ, D. A modular toolbox for gRNA-Cas9 genome engineering in plants based on the GoldenBraid standard. **Plant Methods**, v. 12, p. 1–12, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0101-2>
- WANG, M.-B.; HELLIWELL, C. A.; WU, L.-M.; WATERHOUSE, P. M.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. Hairpin RNAs derived from RNA polymerase II and polymerase III promoter-directed transgenes are processed differently in plants. **RNA**, v. 14, n. 5, p. 903–913, 2008. <https://doi.org/10.1261/rna.760908>
- WANG, T.; WEI, J. J.; SABATINI, D. M.; LANDER, E. S. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. **Science**, v. 343, n. 6166, p. 80–84, 2014. <https://doi.org/10.1126/science.1246981>
- WILSON, L.O.W.; O'BRIEN, A. R.; BAUER, D. C. The current state and future of CRISPR-Cas9 gRNA design tools. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 749, 2018. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00749>
- WU, X.; SCOTT, D. A.; KRIZ, A. J.; CHIU, A. C.; HSU, P. D.; DADON, D. B.; CHENG, A.W.; TREVINO, A. E.; KONERMANN, S.; CHEN, S.; JAENISCH, R.; ZHANG, F.; SHARP, P.A. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 32, p. 670–676, 2014. <https://doi.org/10.1038/nbt.2889>

- XIE, X.; MA, X.; ZHU, Q.; ZENG, D.; LI, G.; LIU, Y.-G. CRISPR-GE: a convenient software toolkit for CRISPR-based genome editing. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 1246–1249, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.06.004>
- XU, H.; XIAO, T.; CHEN, C.-H.; LI, W.; MEYER, C. A.; WU, Q.; WU, D.; CONG, L.; ZHANG, F.; LIU, J. S.; BROWN, M.; LIU, X. S. Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. **Genome Research**, v. 25, p. 1147–1157, 2015. <https://doi.org/10.1101/gr.191452.115>
- YOSHIOKA, S.; FUJII, W.; OGAWA, T.; SUGIURA, K.; NAITO, K. Development of a mono-promoter-driven CRISPR/Cas9 system in mammalian cells. **Scientific Reports**, v. 5, p. 18341, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep18341>
- ZALATAN, J. G.; LEE, M. E.; ALMEIDA, R.; GILBERT, L. A.; WHITEHEAD, E. H.; LA RUSSA, M.; TSAI, J. C.; WEISSMAN, J. S.; DUEBER, J. E.; QI, L. S.; LIM, W. A. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. **Cell**, v. 160, p. 339–350, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.052>
- ZETSCHE, B.; GOOTENBERG, J. S.; ABUDAYYEH, O. O.; SLAYMAKER, I. M.; MAKAROVA, K. S.; ESSLETZBICHLER, P.; VOLZ, S. E.; JOUNG, J.; van der OOST, J.; REGEV, A.; KOONIN, E. V.; ZHANG, F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. **Cell**, v. 163, p. 759–771, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
- ZHANG, D.; HURST, T.; DUAN, D.; CHEN, S.-J.. Unified energetics analysis unravels SpCas9 cleavage activity for optimal gRNA design. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, p. 8693–8698, 2019a. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820523116>
- ZHANG, J.-H.; PANDEY, M.; KAHLER, J. F.; LOSHAKOV, A.; HARRIS, B.; DAGUR, P. K., MO, Y.-Y.; SIMONDS, W. F. Improving the specificity and efficacy of CRISPR/CAS9 and gRNA through target specific DNA reporter. **Journal of Biotechnology**, v. 189, p. 1-8, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.08.033>
- ZHANG, R.; LIU, J.; CHAI, Z.; CHEN, S.; BAI, Y.; ZONG, Y.; CHEN, K.; LI, J.; JIANG, L.; GAO, C. Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing. **Nature Plants**, v. 5, 4p. 80–485, 2019b. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0405-0>
- ZHANG, T.; GAO, Y.; WANG, R.; ZHAO, Y. Production of guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR using ribozymes and RNA polymerase II promoters. **Bio-protocol**, v. 7, n. 4, p.e2148, 2017. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2148>
- ZHANG, X.-H.; TEE, L.Y.; WANG, X.-G.; HUANG, Q.-S.; YANG, S.-H. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. **Molecular Therapy: Nucleic Acids**, v. 4, p. e264, 2015. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.37>
- ZHANG, Y.; LAI, B. S., JUHAS, M. Recent advances in aptamer discovery and applications. **Molecules**, v. 24, 2019c. <https://doi.org/10.3390/molecules24050941>
- ZONG, Y.; WANG, Y.; LI, C.; ZHANG, R.; CHEN, K.; RAN, Y.; QIU, J. L.; WANG, D.; GAO, C. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. **Nature Biotechnology**, v. 35, p. 438–440, 2017. <https://doi.org/10.1038/nbt.3811>



# Regulamentação da edição genômica em plantas no Brasil e no mundo

Letícia Rios Vieira  
Natália Chagas Freitas  
Fernanda Justen  
Vívian de Jesus Miranda  
Bruno de Oliveira Garcia  
Alexandre Lima Nepomuceno  
Renata Fuganti-Pagliarini  
Maria Sueli Soares Felipe  
Hugo Bruno Correa Molinari  
Edivaldo Domingues Velini  
Eduardo Romano de Campos Pinto  
Maria Lucia Zaidan Dagli  
Galdino Andrade  
Patrícia Machado Bueno Fernandes  
Liliane Marcia Mertz-Henning  
Adilson Kenji Kobayashi

## Introdução

A regulamentação do uso de produtos obtidos por meio de técnicas de edição de genomas tem sido tema de grandes debates no mundo todo. O foco da discussão está na classificação ou não como Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) dos produtos obtidos por diferentes estratégias de uso de nucleases de corte direcionado no DNA (*Site-directed Nucleases*; SDN).

Na aplicação SDN-1, a via natural de reparação celular de DNA (do inglês *Non Homologous End-Joining*; NHEJ) é explorada para introduzir mutações simples aleatórias (substituições, inserções e deleções) por sistemas como CRISPR-Cas, TALENs ou *Zinc Fingers Nucleases*, que causam silenciamento gênico do produto gênico após a quebra do DNA (do inglês *Double Strand Break*; DSB).

Na abordagem SDN-2, faz-se também o uso de um DNA molde para introduzir uma alteração na sequência de bases nitrogenadas de DNA (A, C, G, T) no local-alvo que sofreu a quebra da dupla fita de DNA (DSB), explorando outra via natural de reparo, direcionado a partir de um fragmento de DNA da própria espécie (do inglês *Homology Directed Repair*; HDR).

Na abordagem SDN-3, pode-se explorar tanto o NHEJ quanto o HDR para inserir um ou mais fragmentos de DNA com sequências necessárias para a expressão de um gene (região promotora, codante e terminadora) em um local específico do genoma.

A seguir, abordaremos de forma detalhada as questões regulatórias que envolvem a edição genômica em diferentes países do mundo.

## Regulamentação da edição genômica na América do Sul

### Brasil

A área total cultivada no mundo com culturas geneticamente modificadas (GM) aumentou mil vezes nas últimas duas décadas, passando de alguns milhares de hectares em 1996 para mais de 190 Mha em 2017 (ISAAA, 2017). Entre os países que produzem transgênicos, o Brasil possui a segunda maior área agrícola, com mais de 53 Mha, superado apenas pelos EUA, com 75 Mha. Na safra 2018/2019, o Brasil possuía mais de 95% de seus campos de soja plantados com cultivares GM; para o milho foi superior a 88% (primeira e segunda colheitas) e para o algodão atingiu mais de 84% da área total (ISAAA, 2017).

Como em muitas outras técnicas de melhoramento de plantas, o uso de OGM na agricultura tornou-se importante para a produção de alimentos e subprodutos vegetais. Entretanto, diferentemente de outras tecnologias, os marcos regulatórios que sustentam esses resultados baseiam-se em uma ampla lista de requisitos para avaliação de risco, os quais diferem de um país para outro. Esses requisitos destinam-se principalmente a proteger a saúde humana, os animais e o meio ambiente dos possíveis efeitos adversos do OGM, mas em muitos casos eles não são proporcionais aos riscos e resultam em processos de aprovação regulatória dispendiosos e demorados. Uma consequência, aparentemente não intencional, é que apenas algumas grandes empresas multinacionais (atualmente BASF, Bayer, Corteva e Syngenta) possuem recursos adequados para aprovar novas culturas GM, enquanto laboratórios de pesquisa com financiamento público e instituições, empresas e universidades de pequeno e médio porte geralmente não conseguem desenvolver um produto que chegue ao mercado, tendo em vista os altos custos de desregulamentação. Mesmo que possam beneficiar uma gama mais ampla de partes interessadas, particularmente em regiões pobres, muitas tecnologias socialmente benéficas foram descontinuadas porque se perderam no limbo regulatório criado com a polêmica dos transgênicos.

No entanto, após mais de duas décadas de experiência, sem que impactos consideráveis na saúde humana, animal ou no meio ambiente tenham sido identificados, agências regulatórias estão tendo a oportunidade de criar marcos regulatórios mais eficazes para tecnologias emergentes, como, por exemplo, para técnicas de edição de genomas e de RNA interferente de uso tópico. Assim, permite-se maior democratização no uso da biotecnologia para que se alcance seu potencial de uso na agricultura, tornando-a mais sustentável, garantindo segurança alimentar, mantendo a

biossegurança e o equilíbrio econômico, social e ambiental. No Brasil, a Lei nº 11.105 entrou em vigor em 24 de março de 2005 e foi importante no estabelecimento de diretrizes para o uso seguro da Biotecnologia em pesquisa e desenvolvimento de soluções nas áreas de agricultura, indústria e bem-estar humano e animal. A partir da Lei de Biossegurança, foi criada a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), que por meio de suas resoluções normativas fortaleceu o que é hoje a rede nacional de biossegurança, que garante o desenvolvimento tecnológico do setor, com segurança jurídica e biossegurança.

### Legislação brasileira sobre OGM

A Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, é conhecida como Lei de Biossegurança e põe fim à controvérsia legislativa em torno dos OGM no País. Essa lei, regulamentada pelo Decreto nº 5.591, de 22 de novembro de 2005, foi uma revisão abrangente e complementar a uma lei de biossegurança anterior, de 1995, que permitiu o primeiro plantio comercial de soja GM resistente ao herbicida glifosato em 1998. Além de determinar as regras gerais para atividades de pesquisa e comércio com OGM, a Lei nº 11.105 regulamenta princípios constitucionais e estabelece padrões e mecanismos de segurança para o monitoramento de atividades que envolvam OGM e seus subprodutos. Os princípios usados para elaborar essa lei incentivaram avanços científicos nas áreas de biossegurança e biotecnologia, proteção da vida, saúde humana, saúde animal e vegetal, bem como o cumprimento do princípio da precaução para a proteção do meio ambiente.

A Lei nº 11.105 também estabeleceu o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), reestruturou a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e propôs a Política Brasileira de Biossegurança. Seu objetivo e escopo visam fornecer padrões de segurança e mecanismos de inspeção para construção, cultivo, produção, manuseio, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, pesquisa, liberação ambiental, descarregamento e comercialização de OGM e seus subprodutos. A lei abrange atividades de pesquisa e usos comerciais de produtos desenvolvidos para agricultura, saúde humana e animal, meio ambiente e pesca. Nela, há também a exigência de que qualquer pessoa interessada em realizar uma dessas atividades solicite permissão à CTNBio, que responderá dentro do prazo estipulado em suas resoluções. A legislação demanda que todas as organizações públicas e privadas, nacionais ou estrangeiras, que queiram realizar atividades ou projetos no Brasil, sob a descrição da Lei nº 11.105, solicite o Certificado de Qualidade em Biossegurança emitido pela CTNBio antes de iniciar qualquer atividade. A CTNBio, por meio de suas Resoluções Normativas, é responsável por estabelecer as diretrizes de biossegurança para os assuntos de sua competência. Entre suas prerrogativas, a

lei delega à CTNBio a avaliação de novas tecnologias e seus possíveis impactos ao meio ambiente e à saúde humana e animal no País. Se necessário, também autoriza a comissão a propor regulamentos para essas novas tecnologias.

### Regulamentação de novas tecnologias de melhoramento no Brasil

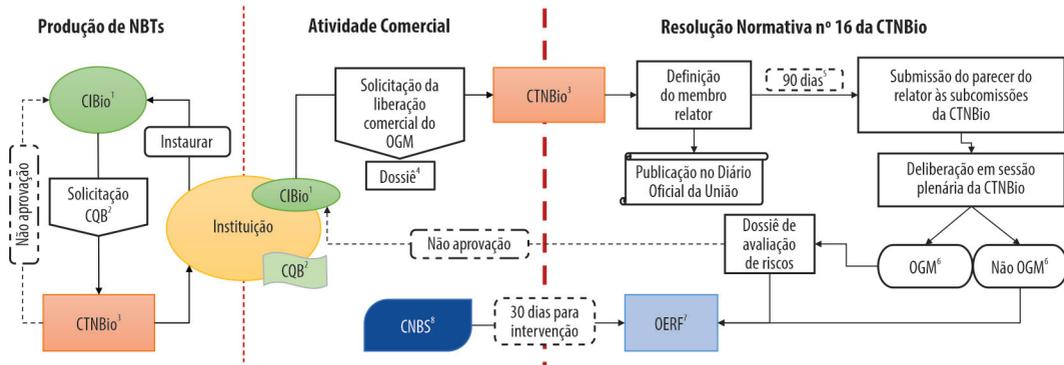
Para qualquer nova tecnologia, como é o caso do CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), é essencial garantir sua segurança. Porém, para permitir o avanço tecnológico, todos os requisitos de segurança devem ser proporcionais ao risco do produto. Quando a Lei nº 11.105 foi redigida, a maioria das Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMP), também conhecidas como novas tecnologias de melhoramento (NBTs), ainda estavam em fase inicial e, na época, não foram consideradas nessa lei.

Assim, em 2015, a CTNBio estabeleceu um grupo de especialistas entre seus membros para melhor analisar e entender os produtos das novas técnicas de melhoramento e definir como esses produtos seriam enquadrados nas definições da Lei nº 11.105, com o objetivo de propor melhorias nos regulamentos atuais. As técnicas analisadas pelo grupo de trabalho incluíram edição de genes, florescimento precoce, melhoramento reverso, RNA interferente, mutagênese direcionada por oligonucleotídeos, entre outras. Para a maioria dos produtos considerados pelo grupo de trabalho, o uso de NBTs pode acelerar a introdução de características de interesse em genótipos elite em programas de melhoramento. Em muitas situações, o produto final poderia ser designado como não geneticamente modificado (não GM) para os propósitos da legislação.

De fato, vários produtos obtidos por edição de genes resultam em modificações genéticas que podem ser obtidas por técnicas de mutação estabelecidas, como radiação e mutagênese química. Como a Lei Brasileira de Biossegurança considera organismos obtidos por métodos de mutagênese como não GM, o grupo de trabalho considerou, após uma análise caso a caso, que alguns produtos poderiam ser excluídos do escopo da legislação sobre OGM.

A Resolução Normativa nº 16 da CTNBio (RN16), que propôs essa atualização, foi aprovada por unanimidade pelos membros da CTNBio e pela Assessoria Jurídica do então Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, e foi publicada no Diário Oficial da União em 15 de janeiro de 2018. A RN16 foi elaborada com base no relatório do grupo de trabalho e nos regulamentos e experiências de outros países.

Em termos gerais, o princípio dessa resolução é determinar, mediante um sistema de consulta caso a caso, se um produto gerado por NBTs deve ser designado como



**Figura 1.** Fluxo de trabalho do processo geral de aprovação e liberação comercial de produtos gerados por NBT, de acordo com a Lei Brasileira de Biossegurança nº 11.105 / 2005 e a Resolução Normativa nº 16. Legenda: 1) Comissão Interna de Biossegurança; 2) Certificado de Qualidade em Biossegurança; 3) Comissão Técnica Nacional de Biossegurança; 4) Dossiê detalhado, com as avaliações de risco de biossegurança; 5) Prorrogáveis por igual período; 6) Organismo Geneticamente Modificado; 7) Órgãos e Entidades de Registro e Fiscalização; 8) Conselho Nacional de Biossegurança.

GM ou não pela CTNBio (Figura 1). Para essa consulta, a instituição desenvolvedora fornece informações sobre o organismo original e o produto, incluindo os métodos usados para gerá-lo e sua análise molecular. A designação de um produto como não GM (para os fins da legislação) é baseado nos seguintes critérios: 1) ausência de DNA/RNA recombinante; 2) presença de elementos genéticos que poderiam ser obtidos por cruzamento; 3) presença de mutações induzidas que também poderiam ser obtidas por técnicas estabelecidas, como exposição à radiação ou química; e 4) presença de mutações que poderiam ocorrer naturalmente.

Em termos práticos, atendem às condições estabelecidas na RN16 e podem ser designados como não GM em uma análise caso a caso os produtos obtidos por mutação aleatória direcionada ao local que envolve a junção de extremidades não homólogas (mutação SDN1) ou o reparo homólogo direcionado ao local que envolve poucos nucleotídeos (mutação SDN2). Em contraste, as inserções de transgene direcionadas ao local (mutação SDN3) normalmente serão designadas GM numa análise caso a caso de acordo com as disposições da RN16. Se o produto for designado como GM, o desenvolvedor deverá cumprir todos os requisitos de biossegurança e será aprovado somente após a avaliação de risco da CTNBio. Se o produto não for designado como GM, ele poderá ser registrado por meio dos procedimentos existentes.

A RN16 é aplicável a todos os tipos de organismos, incluindo plantas, animais e microrganismos, na fase de pesquisa e/ou liberação comercial.

## Marco regulatório brasileiro

A Lei de Biossegurança estabeleceu uma estrutura com quatro organizações principais responsáveis pela avaliação e pelo gerenciamento de riscos (Figura 1): 1) Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), 2) Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), 3) Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) e 4) Organizações e Entidades de Registro e Fiscalização (OERF), que são o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa); o Ministério da Saúde (MS), o Ministério do Meio Ambiente (MMA) e a Secretaria de Aquicultura e Pesca.

As instituições que pretendem trabalhar com OGM devem constituir uma Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) e, por meio desta, solicitar à CTNBio um Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB). O certificado é emitido após a análise da CTNBio que autoriza a instituição a desenvolver atividades com OGM em suas instalações, considerando que os níveis de segurança exigidos são atendidos. Após aprovação do CQB, qualquer demanda de atividade comercial com OGM é submetida à avaliação da CTNBio pelo presidente da CIBio da instituição em questão. Um dossiê completo e detalhado com todas as avaliações de risco de biossegurança também é entregue com o processo de solicitação de liberação comercial. As diretrizes para a avaliação de risco são estabelecidas na Resolução Normativa nº 24, de 7 de janeiro de 2020, que dispõe sobre normas para liberação comercial de OGMs e seus derivados. A CTNBio avalia o risco e elabora um relatório técnico. Se o OGM for aprovado para liberação comercial, é encaminhado ao CNBS.

### **Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS)**

O CNBS é um órgão colegiado composto por 11 ministros de Estado, incluindo o Ministro de Estado da Casa Civil, que o preside; o Ministro da Justiça; o Ministro da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações; o Ministro do Desenvolvimento Agrário; o Ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; o Ministro da Saúde; o Ministro do Meio Ambiente; o Ministro do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior; o Ministro das Relações Exteriores; o Ministro da Defesa e o Secretário de Aquicultura e Pesca.

Esse conselho fornece assistência consultiva ao Presidente da República na formulação e implementação da Política Nacional de Biossegurança, estabelecendo princípios e diretrizes que considerem conveniências e oportunidades socioeconômicas e políticas relacionadas ao interesse nacional envolvido no uso comercial de OGM e produtos relacionados. O parecer técnico do CNBS sobre uma decisão final de liberação de um OGM para uso comercial será solicitado apenas se for necessário

tomar alguma decisão socioeconômica e/ou política estratégica. A CTNBio faz o julgamento técnico sobre a biossegurança de um OGM usado comercialmente. No entanto, o CNBS tem 30 dias para refutar a aprovação comercial desse OGM após a CTNBio divulgar seu parecer oficial. Se a refutação não ocorrer em 30 dias, o produto é automaticamente autorizado para comercialização.

### **Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)**

A CTNBio, vinculada ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), é um colegiado multidisciplinar consultivo e deliberativo que presta assistência e apoio técnico ao governo federal para formular, atualizar e implementar a Política Nacional de Biossegurança para o desenvolvimento de Produtos GM ou produtos de biotecnologia que em alguma fase podem gerar um OGM. Também estabelece normas técnicas de segurança com relação à autorização de atividades relacionadas à pesquisa e à liberação comercial de OGM.

Além disso, é a organização responsável pela avaliação zoossanitária, fitossanitária, de saúde humana e de riscos ambientais dos OGMs e também estabelece medidas de gestão de risco. Outras competências da CTNBio incluem autorizar a importação de OGMs para pesquisa, prestar assistência técnica às organizações e entidades de registro e inspeção e monitorar o desenvolvimento e o progresso técnico-científico alcançado em biossegurança, biotecnologia, bioética e áreas correlatas, visando aumentar a capacidade de proteger a saúde humana, animal e vegetal e o meio ambiente.

A CTNBio está organizada em subcomissões setoriais permanentes nas áreas vegetal e ambiental, de saúde humana e animal. O Ministro do MCTIC nomeia um de seus membros para atuar como presidente da CTNBio por um período de 2 anos, prorrogável pelo mesmo período. A comissão possui uma secretaria-executiva permanente que presta assistência técnica e administrativa a seus membros e organiza as reuniões mensais (exceto em janeiro e julho).

A comissão é composta por 27 membros titulares e seus suplentes, que são indicados pelo mesmo ministro após receber indicações de outros ministérios. Todos os membros têm mandato de 2 anos, prorrogável por mais dois períodos consecutivos. Eles devem ser cidadãos brasileiros com competência técnica reconhecida e reconhecidos por sua participação destacada na comunidade científica. Todos os membros devem ter doutorado e ser profissionalmente ativos nas áreas de biossegurança, biotecnologia, biologia, microbiologia, saúde e meio ambiente e saúde humana/animal ou em áreas relacionadas. Doze membros da comunidade científica são indicados diretamente pelo MCTIC, enquanto os outros são indicados

por um dos órgãos que compõem o CNBS: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Ministério da Saúde; Ministério do Meio Ambiente; Ministério do Desenvolvimento Agrário; Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior; Ministério da Defesa; Secretaria de Aquicultura e Pesca; Ministério das Relações Exteriores e Ministério da Justiça. A lista completa dos membros da CTNBio pode ser encontrada em seu site.

As reuniões da CTNBio podem ser realizadas com o quórum de 14 membros (metade mais um), incluindo pelo menos um representante de cada uma das quatro subcomissões. Se necessário, representantes da comunidade científica, do setor público e de entidades da sociedade civil com experiência em um campo específico podem ser convidados a participar de reuniões, mas eles não têm direito a voto. Qualquer decisão tomada pela CTNBio deve ter a aprovação majoritária por voto nominal. Para proporcionar maior transparência ao processo, todas as decisões são publicadas no diário oficial e abertas para comentários do público dentro de 30 dias, da mesma forma que todas as reuniões são abertas aos cidadãos, que podem consultar as agendas, assim como todos os documentos produzidos pela comissão, disponíveis no site da CTNBio<sup>1</sup>.

### **Comissão Interna de Biossegurança (CIBio)**

Qualquer instituição pública ou privada que utilize técnicas e métodos de engenharia genética para desenvolver produtos biotecnológicos, que em alguma fase de desenvolvimento possam gerar um OGM, deve ter uma CIBio, composta por indivíduos com treinamento e educação adequados nas áreas de biotecnologia, engenharia genética, biossegurança ou outros campos relacionados. O Certificado de Qualidade em Biossegurança, documento necessário para a CIBio trabalhar sob controle governamental, também é emitido pela CTNBio para a instituição em questão.

Como procedimento obrigatório, um pesquisador deve ser indicado como responsável por cada projeto que envolva OGM na instituição. Além disso, cada CIBio é legalmente responsável por garantir as condições de biossegurança das instalações da entidade, realizando auditorias regulares em suas instalações e enviando um relatório anual de suas atividades e projetos à CTNBio. Atualmente, a CTNBio supervisiona 480 instituições públicas e privadas no Brasil.

---

<sup>1</sup> Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br>

### **Órgãos e Entidades de Registro e Fiscalização (OERF)**

OERF incluem Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Ministério da Saúde; Ministério do Meio Ambiente e Secretaria de Aquicultura e Pesca.

De acordo com a Lei nº 11.105 e dentro de seu campo de competência, em conformidade com as resoluções e pareceres técnicos da CTNBio, o OERF é responsável por monitorar os OGM e seus subprodutos. Suas responsabilidades incluem: 1) inspecionar atividades de pesquisa, 2) registrar e inspecionar o uso comercial de OGM, 3) conceder autorização para importar produtos para pesquisa e uso comercial, 4) manter informações atualizadas sobre as principais instituições e investigadores que realizam atividades e projetos; 5) auxiliar a CTNBio na definição de parâmetros de avaliação de biossegurança; 6) divulgar ao público, conceder registros e autorizações para o uso comercial de OGM; e 7) fazer cumprir a lei e aplicar as penalidades estabelecidas quando o descumprimento for identificado.

### **Visão geral do status do uso da biotecnologia na agricultura brasileira**

O Brasil é um dos principais produtores de bens relacionados à agricultura e alimentos do mundo e um dos poucos países que podem aumentar consideravelmente sua produção nas próximas décadas, sem comprometer as áreas de proteção ambiental e a floresta amazônica. Entre os produtores mundiais, o Brasil também tem grande potencial para se tornar o principal fornecedor de biocombustíveis. Além disso, ao contrário da maioria dos países desenvolvidos, onde a produção de bioenergia poderia competir com a produção de alimentos, o Brasil pode cultivar mais de 30 Mha sem destruir ambientes nativos e preservados ou invadir áreas de produção de alimentos (Malingreau et al., 2012). O Brasil usa cerca de 12% da água doce do mundo para consumo humano e para a agricultura. Além disso, o Brasil contém entre 15% e 20% da biodiversidade global, que tem um enorme potencial como fonte de novos produtos para agricultura, medicina e indústria.

A agricultura brasileira (de pequenos a grandes agricultores) e todo o agronegócio relacionado a ela possuem todas as condições para aumentar seu desenvolvimento em níveis semelhantes aos de outras economias emergentes e, conseqüentemente, ajudar no progresso econômico e social do País, além de contribuir para alimentar a crescente população mundial. Na década de 1970, o fluxo da produção agrícola e pecuária para as áreas do Cerrado revelou como o agronegócio pode melhorar o desenvolvimento econômico e social. Algumas cidades do Centro-Oeste, por exemplo, possuem atualmente os mais altos índices de desenvolvimento humano do Brasil, mostrando que a importância do agronegócio para a economia é eficaz e inegável.

Muitas conquistas importantes da agricultura brasileira nas últimas décadas vieram da aplicação combinada de abordagens biotecnológicas e de melhoramento genético. Além disso, em um futuro próximo, a combinação dessas metodologias será crucial para garantir a produção sustentável de alimentos, em um cenário que envolve múltiplos desafios decorrentes do aquecimento global, consequentes extremos climáticos e uma crescente população mundial. Assim, para manter a produtividade, é fundamental estar alerta, informado e familiarizado com as novas tecnologias que possam mudar os conceitos, normas e paradigmas de produção e consumo. Consequentemente, a incorporação de ferramentas de engenharia genética na agricultura para enfrentar os desafios futuros é uma ação estratégica, não apenas para o Brasil, mas também para o mundo.

Em dezembro de 2018, a CTNBio avaliou, no âmbito da RN16, a primeira consulta sobre liberação comercial de plantas geradas com utilização de NBTs no Brasil. Um genótipo de milho no qual a via metabólica para a produção de amilose havia sido inativada por CRISPR/Cas9 foi designado como não GM. Após análise, a CTNBio concluiu que a mutação introduzida poderia ter sido obtida por métodos de cruzamento ou induzida por outros mutagênicos, como radiações ionizantes ou pelo agente químico metanossulfonato de etila. Nesse caso específico, a redução na produção de amilose resultou em teor de amilopectina de quase 100%, o que é interessante para alguns usos industriais do amido de milho.

Em outra consulta à CTNBio, também em 2018, uma cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* chamada “Excellomol” resultou na introdução de alguns polimorfismos pontuais em genes específicos, polimorfismos estes que já ocorrem naturalmente na cepa CBS 6412 de *S. cerevisiae*, originalmente identificada na produção de saquê. A levedura editada aumentou a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar e foi classificada como não GM, uma vez que essas mutações poderiam ter sido introduzidas por outros métodos de mutagênese.

Até março de 2020, houve dez consultas desde a aprovação da RN16. Cinco linhas de microrganismos (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de bioetanol, vaca sem chifre (para manejo de vaca leiteira), tilápia para melhor produção de carne, milho ceroso para qualidade de amido, vacina para controle de parvovírus canino e RNAi para aplicação tópica usada no controle de mosquitos. De acordo com o disposto na RN16, todos esses produtos, exceto a vaca sem chifre, foram considerados pela CTNBio como produtos que atendem às características estabelecidas para classificação como organismos não GM. O desenvolvimento de NBTs, avaliado juntamente com as regulamentações modernas que protegem a saúde humana e animal e o meio ambiente, permitirá a democratização do uso da biotecnologia no agronegócio brasileiro. Nesse contexto, espera-se que pequenas, médias e grandes

instituições nacionais e internacionais possam participar do mercado brasileiro e mundial, desenvolvendo e introduzindo novas soluções e produtos biotecnológicos por meio de uma abordagem mais sustentável e sem enfrentar a polêmica inadequada criada sobre as culturas GM.

## Argentina

A Argentina foi o país pioneiro na regulamentação das Novas Tecnologias de Melhoramento (do inglês *New Breeding Technologies*, NBTs). Em 2015, a *Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca* (SAGyP) divulgou a Resolução nº 173/15, que define as diretrizes de avaliação para as culturas derivadas de NBTs. É importante ressaltar que a resolução foi elaborada sem a necessidade de inserção de uma lista de tecnologias específicas, não sendo restrita às inovações técnicas do momento. Como novas tecnologias de melhoramento são publicadas e patenteadas constantemente, a inclusão de uma lista específica de NBTs comprometeria a agilidade da regulamentação das inovações técnicas adicionais.

A *Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria* (Conabia) é o órgão responsável por avaliar, a partir de critérios técnicos e científicos, o potencial impacto ambiental da introdução de culturas biotecnológicas na agricultura argentina. A comissão é reconhecida mundialmente pela sua experiência na avaliação de dossiês, sendo considerada como centro de referência para a biossegurança de OGM pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2019). Possui participação ativa em debates internacionais relacionados à biossegurança e aos processos regulatórios (USDA Foreign Agricultural Service, 2019). Sendo assim, a Conabia é o órgão responsável pela avaliação e regulamentação das novas tecnologias de melhoramento, o qual garante o cumprimento da Resolução nº 173/15.

Todos os produtos obtidos por edição genômica, sem exceção, devem ser submetidos à Conabia. A submissão do dossiê pode ser realizada em dois momentos: após a obtenção do produto final ou na fase inicial do processo de criação (projeto). Na fase de projeto, os inventores podem consultar a Conabia para avaliação do produto esperado, determinando se o produto hipotético estaria sob regulamentação de OGM ou não. Quando a cultura derivada de NBTs é obtida, devem ser submetidos dados técnicos sobre a modificação genética gerada para que seja possível averiguar se o status regulatório previsto permanece igual ao da avaliação preliminar.

Sob o marco regulatório, o tempo de avaliação é de 60 dias, sendo disponibilizados formulários eletrônicos para celeridade da avaliação. Os principais

critérios levados em consideração são: 1) as técnicas utilizadas no processo; 2) a nova combinação de material genético gerada; e 3) a ausência de um transgene no produto final. Uma modificação genética é considerada nova combinação de material genético quando ocorre inserção estável e permanente de gene(s) ou sequência(s) de DNA no genoma da planta, caso que está sob a regulamentação de OGM (Resolução nº 701/11 e 763/11). Além disso, mesmo que uma cultura esteja isenta da regulamentação de OGM, se possuir características que apresentem risco, poderá sofrer um monitoramento adicional pelas autoridades responsáveis (Whelan; Lema, 2015).

## Chile

No Chile, o *Servicio Agrícola y Ganadero* (SAG) é o órgão responsável pela regulamentação e monitoramento da introdução e propagação de plantas geneticamente modificadas no meio ambiente. Um pronunciamento oficial do SAG, em 2017, determinou o procedimento regulatório sobre as culturas obtidas pelas NBTs, estabelecendo abordagem caso a caso similar à da Argentina. Em termos gerais, culturas desenvolvidas por meio de técnicas de edição genômica que não contêm uma nova combinação de material genético não estão sujeitas às regulamentações de OGM e estão fora do escopo da Resolução nº 1523/2001. Para esses fins, entende-se por nova combinação de material genético uma inserção estável de um ou mais genes ou sequências de DNA que codificam proteínas, RNA de interferência, RNA de fita dupla, peptídeos de sinalização ou sequências reguladoras (Whelan; Lema, 2019).

Pessoas físicas ou jurídicas, centros de pesquisa ou universidades interessadas em introduzir no território chileno uma nova cultura obtida a partir de NBTs devem encaminhar a solicitação por meio de formulário para a *División de Protección Agrícola y Forestal* do SAG. A avaliação é realizada em até 20 dias úteis. Para a análise, é necessário disponibilizar informações técnicas e sobre o solicitante. As informações técnicas incluem o nome da espécie, variedade/linhagem, a descrição do fenótipo obtido, a empresa ou instituição desenvolvedora do material, a metodologia e as características da técnica biotecnológica utilizada com indicação das sequências de DNA modificadas. Além disso, o solicitante deve informar se o material tem precedente de autorização em outro país e, caso afirmativo, deve apresentar as informações com documentações oficiais. A decisão do SAG é válida por um período indeterminado, mas pode ser cancelada se novas descobertas científicas estiverem disponíveis.

## Colômbia

Na Colômbia, o controle técnico da produção e comercialização de produtos agrícolas é de responsabilidade do *Instituto Colombiano Agropecuario* (ICA). Em 2018, foi emitida a Resolução nº 29299, que estabelece as diretrizes de consulta caso a caso para produtos obtidos pelas NBTs. O procedimento para determinar se uma cultivar desenvolvida com novas tecnologias de melhoramento vegetal corresponde a um OGM ou a organismo convencional leva em consideração a presença ou não de material genético exógeno. Perante o documento, cultivar é designada como nome genérico para se referir às variedades, linhagens, híbridos e clones que estão sendo usados como materiais de plantio. Material genético exógeno, por sua vez, corresponde ao gene, conjunto de genes, sequências de DNA que fazem parte de uma construção genética e que foram introduzidas no genoma de maneira estável, por meio de técnicas modernas de biotecnologia, superando as barreiras fisiológicas naturais de reprodução. Nesse contexto, se uma cultivar não apresentar sequências exógenas de DNA, não é classificada como OGM e está livre da regulamentação proposta no Decreto 4525/2005.

A solicitação para avaliação de uma cultivar obtida por meio de NBTs deve ser enviada ao ICA, que analisa a documentação em um prazo de 30 dias. Para isso, é necessário que o solicitante tenha registro no ICA como produtor de sementes, importador de sementes ou como unidade de pesquisa de melhoramento de plantas. A documentação fornecida na solicitação abrange as seguintes informações técnico-científicas: 1) classificação taxonômica da espécie; 2) metodologia empregada, técnica e construções genéticas utilizadas, incluindo todos os elementos genéticos e, no caso de edição DNA-free, as sequências de proteínas e RNA utilizadas; 3) descrição do fenótipo gerado; 4) metodologias alternativas para geração do fenótipo; 5) caracterização molecular com determinação das modificações genéticas presentes na cultivar melhorada em comparação ao genótipo de origem, além da comprovação da ausência de material exógeno.

## Paraguai

Na América Latina, o Paraguai foi o quinto país a apresentar seu posicionamento e regulamentação em relação aos produtos obtidos por meio das NBTs. A Resolução nº 565/2019 foi sancionada pelo *Ministerio de Agricultura y Ganadería* (MAG), autoridade nacional competente do setor agrícola e florestal. Segundo a resolução, a avaliação dos produtos é realizada caso a caso pela *Comisión de Bioseguridad*

*Agropecuaria y Forestal* (Combio) mediante a apresentação do formulário de consulta prévia para produtos obtidos por meio de novas técnicas de melhoramento.

O preenchimento do formulário consiste em seis seções que abrangem informações sobre o requerente da avaliação, organismo, biologia molecular, fenótipo, autorizações e referências. Nas informações sobre o requerente devem ser também apresentados o representante legal e responsável técnico da solicitação. Na Seção Organismo, deve ser inserido o nome científico da espécie e a descrição taxonômica detalhada incluindo cultivar e linhagem. Na seção Biologia Molecular, é exigida uma descrição detalhada da técnica utilizada e das etapas aplicadas no caso apresentado, descrição molecular das sequências nucleotídicas-alvo e suas funções no organismo antes e depois da aplicação da técnica. Também deve ser fornecida, se aplicável, a construção genética usada no processo de obtenção do produto, com o detalhamento dos elementos genéticos, a análise de mutações fora das sequências-alvo e, para os casos de utilização de transgene intermediário, as evidências que comprovem a ausência de sequências recombinantes. Na seção Fenótipo, são solicitados exemplos de produtos com um fenótipo semelhante no mercado, análise da probabilidade de ocorrência de outros efeitos além do fenótipo desejado, mudanças esperadas nos usos propostos do organismo e mudanças nas recomendações de manejo dos organismos resultantes. Na seção Autorizações, deve ser indicado se o organismo já foi autorizado pelo órgão regulatório de outro país e, em caso de precedente, indicar o tipo de autorização. Por fim, em Referências, devem ser incluídas cópias de todas as publicações mencionadas no formulário. A partir da avaliação de todos esses pontos, a Combio determinará o enquadramento do organismo em geneticamente modificado ou não.

## Regulamentação da edição genômica na América do Norte

### Canadá

O Canadá se diferencia dos demais países para a aprovação de um organismo geneticamente modificado (OGM), pois utiliza uma abordagem regulatória baseada exclusivamente em produtos e não no processo ou na técnica utilizada para desenvolvimento do novo produto (Ellens et al., 2019). O produto ou a planta com nova característica (PTN) precisa apresentar alguma modificação diferente da variedade de origem para ser analisado pelos órgãos regulatórios. Uma PTN é uma planta na qual uma característica foi introduzida de forma intencional, nova nas plantas da

mesma espécie cultivadas no Canadá, com potencial para afetar o uso e a segurança da planta em relação ao meio ambiente e à saúde humana (Canadá, 2019). Essa regra se aplica tanto para plantas desenvolvidas por melhoramento clássico, como para plantas editadas geneticamente.

Os produtos criados ou modificados no Canadá são regulados por várias agências governamentais, sendo elas: *Canadian Food Inspection Agency* (CFIA), *Health Canada* e a *Environment and Climate Change Canada* (ECCC). A CFIA utiliza quatro leis diferentes e é responsável por atuar na regulamentação de plantas, rações para animais, fertilizantes e produtos veterinários de origem biotecnológica. Junto à CFIA há o *Office of Plant Biosafety*, que é responsável por coordenar a avaliação de segurança de novos alimentos. A *Health Canada* supervisiona a regulamentação de alimentos, medicamentos e produtos de controle de pragas. As avaliações conduzidas pela CFIA e pela *Health Canada* utilizam como base os critérios científicos e as orientações estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), Organização para Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) (Dederer; Hamburger, 2019). A ECCC atua na regulamentação de todos os produtos animais de origem biotecnológica que não são cobertos por outra lei federal e se baseia na Lei de Proteção Ambiental do Canadá (1999).

Para que um produto com uma nova característica receba a aprovação do registro e possa ser inserido no mercado canadense, é necessário que passe por vários testes, realizados por técnicos da CFIA e da *Health Canada*. Esses testes visam corroborar os resultados já fornecidos pelo solicitante. Após a revisão de todos os dados fornecidos pelo solicitante e juntamente com esses novos testes que possam ter sido realizados, a variedade é aceita, caso todas as condições tenham sido atendidas.

No Canadá, quando as culturas GM estavam sendo desenvolvidas no início dos anos 1990, os sistemas de regulação também estavam em desenvolvimento. Dessa forma, as leis já estavam adequadas às necessidades dessas culturas. Não existe uma lei específica para plantas geneticamente modificadas por CRISPR ou por outra técnica de edição ou melhoramento genético. A regulamentação é baseada no produto, cuja liberação para consumo se dá a partir da avaliação de sua segurança.

As leis de Sementes, de Alimentação Animal e de Alimentos e Drogas são as que estão relacionadas à agricultura de plantas. A Lei de Sementes regula a estabilidade e o risco à segurança ambiental, como, por exemplo: o potencial da planta em se tornar uma praga e o impacto da planta ou de seus produtos em espécies não alvo (Branch, 2019a). A Lei de Alimentação Animal regula os riscos relacionados à toxicidade, alergenicidade e digestibilidade (Branch, 2019b). E a Lei de Alimentos e Drogas estabelece os limites de risco para toxicidade, alergenicidade, metaboli-

zação e nutrição relacionados ao consumo humano (Branch, 2020). A CFIA utilizou essas leis e as seguintes diretivas para analisar as variedades resistentes a herbicidas, independentemente da tecnologia usada para criar a variedade:

- Diretiva 94-08: critérios de avaliação para determinar a segurança ambiental de plantas com características novas.
- Diretiva 95-03: diretrizes para a avaliação de novos alimentos – fontes vegetais.
- Diretiva D-96-13: requisitos de licença de importação para plantas com novos traços e seus produtos.
- Diretiva 2000-07: diretrizes para a liberação ambiental de plantas com novos traços em ensaios de campo confinado no Canadá.

O *International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications* (ISAAA) divulgou em 2017 que o Canadá plantou uma área de 13,12 milhões de hectares com culturas biotecnológicas, sendo responsável por 7% da área mundial plantada. Durante os 21 anos de comercialização de plantas GM, o Canadá obteve um lucro de US\$ 8 bilhões (ISAAA, 2017), e as expectativas são de aumento dos lucros nos próximos anos, com as novas cultivares que deverão ser incorporadas. As plantas editadas não deverão enfrentar resistência do governo canadense para entrar no país, que leva em consideração o produto e não o processo utilizado para atingir o objetivo.

## Estados Unidos da América

Nos Estados Unidos da América (EUA), a regulamentação das culturas produzidas por meio do uso de tecnologias genéticas é baseada em políticas de décadas e gerida por vários estatutos e regulamentos, implementados por diferentes agências governamentais federais (Dederer; Hamburger, 2019). Os órgãos de regulamentação americanos são o *US Department of Agriculture* (USDA), a *Environmental Protection Agency* (EPA) e a *Food and Drug Administration* (FDA). Esses órgãos federais buscam garantir que as culturas geneticamente modificadas e seus produtos sejam seguros para a saúde, o meio ambiente e a agricultura.

A política de regulamentação de produtos biotecnológicos foi estabelecida com o Marco Coordenado de Regulação da Biotecnologia, publicado em 1986 e posteriormente atualizado em 1992 (OSTP, 1986). Esse documento permite três conclusões, que influenciam até hoje a política americana sobre biotecnologia: os produtos não são necessariamente diferentes dos produtos convencionais; os regulamentos não devem se concentrar no processo e sim no produto; e a jurisdição regulatória deve se basear no uso.

O Serviço de Inspeção de Sanidade Animal e Vegetal (APHIS) e o Serviço Regulatório de Biotecnologias (BRS) do USDA são responsáveis pela liberação dos testes de campo, pelo movimento interestadual e pela importação de plantas geneticamente modificadas (GM) que podem apresentar algum risco (Dederer; Hamburger, 2019). O APHIS divulgou uma nova regulamentação, a Regra Sustentável, Ecológica, Consistente, Uniforme, Responsável e Eficiente (SECURE Rule) (Estados Unidos, 2020), que visa atualizar e modernizar a Lei de Proteção de Plantas (*Plant Protection Act*), removendo processos antiquados e inserindo regulamentações biotecnológicas (Estados Unidos, 2020a).

A EPA regula as plantas GM com substâncias pesticidas de acordo com a Lei Federal de Inseticidas, Fungicidas e Rodenticidas (FIFRA) (Estados Unidos, 2020b) e os resíduos de pesticidas em alimentos GE conforme a Lei de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos (FDCA) (Estados Unidos, 1938).

A FDA regula a segurança alimentar sob a FDCA. Nos EUA, os desenvolvedores dos novos alimentos são responsáveis legais por avaliar a segurança do alimento e cumprir com os regulamentos e estatutos da FDA. E para garantir a segurança alimentar, a FDA se baseia nas disposições legais que proíbem a adulteração e a identificação incorreta dos alimentos (Dederer; Hamburger, 2019). Um alimento é considerado adulterado se possuir ou conter uma ou mais substâncias adicionadas que possam ser prejudiciais à saúde ou se o aditivo não for seguro. Com isso, se os alimentos transgênicos ou editados não apresentarem diferenças nutricionais do alimento convencional, o alimento GM é equivalente. Segundo a definição da FDCA, são excluídas de aditivo alimentar substâncias que são “geralmente reconhecidas como seguras” (GRAS). Devido às novas formas de melhoramento e edição gênica, várias discussões têm apontado para possíveis alterações nas regulamentações.

O governo americano sempre incentivou a utilização de novas tecnologias na agricultura como uma forma de aumentar a sua competitividade (Bergeson, 2017) e, com isso, atualmente, o uso de técnicas de edição de genoma em plantas encontra-se em plena ascensão. Em 2017, os EUA plantaram 75 milhões de hectares de culturas transgênicas, o que corresponde a 40% do total mundial, que foi de 189,8 milhões de hectares (ISAAA, 2017), e são os líderes em aprovação e cultivo de variedades geneticamente modificadas.

## Regulamentação da edição genômica na União Europeia

A União Europeia (UE) tem a legislação mais severa e restrita do mundo em relação ao cultivo e consumo de OGMs em seu território. Uma quantidade pou-

co significativa, menos de 0,1% da área global, de culturas GM são cultivadas na Europa (Davison; Ammann, 2017). Apenas um único evento transgênico de milho Bt (MON810) está atualmente autorizado para cultivo comercial na Espanha e Portugal. Entretanto, a UE é um grande importador de soja e milho transgênico voltado para rações animais (Dederer; Hamburger, 2019).

O conceito regulatório da UE segue estritamente o “Princípio da Precaução”, que considera que, se uma ação pode originar um dano irreversível público ou ambiental, na ausência de consenso científico irrefutável, o ônus da prova encontra-se do lado de quem pretende praticar o ato ou ação que pode vir a causar o dano. As culturas GM diferentes estariam dentro desse princípio, uma vez que foram manipuladas em laboratório e seriam diferentes das culturas originais. Na UE, a regulamentação dessa proibição está bem estabelecida para OGMs, entretanto, com o avanço da genética, em especial das Novas Técnicas de Melhoramento Genético (do inglês *New Plant Breeding Techniques*, NBTs), como vieram a ser chamadas as técnicas de edição gênica (*Site Directed Nucleases*, SDN), a discussão sobre o uso da biotecnologia na agricultura está sendo retomada.

A base legal da UE sobre OGM está fundamentada na Diretiva 2001/18/CE; nos Regulamentos (CE) n.º 1829/2003 e n.º 1830/2003; no Regulamento (CE) n.º 1946/2003; na Diretiva 2009/41/CE e na Diretiva (UE) 2015/412 (European Commission, 2020).

A Diretiva 2001/18/CE regulamenta a avaliação dos riscos ambientais e a liberação de OGMs, bem como a sua comercialização (importação, processamento e transformação) dentro do bloco. O conceito de OGMs para UE, segundo essa classificação legal, é: “OGMs são organismos modificados geneticamente de uma maneira que não ocorre naturalmente por meio de cruzamentos e/ou recombinação natural” (Leone, 2019). Esse conceito não se aplica a seres humanos. Segundo os anexos 1A e 1B dessa diretiva, são excluídas da classificação de OGMs modificações genéticas sem a utilização de DNA recombinante e obtidas por técnicas de fertilização *in vitro*, processos naturais como conjugação, transdução, transformação, indução de poliploidia, mutagênese clássica (mutagênese química e por radiação) e fusão de protoplastos.

A edição de genes via CRISPR, normalmente, não envolve transgênicos – transferência de “genes” entre as espécies. Entretanto, em 25 de julho, o Tribunal de Justiça da UE (TJUE) determinou que todas as plantas obtidas por meio da edição gênica devem ser consideradas OGMs e se enquadram no escopo da Diretiva 2001/18/CE (Ruffell, 2018). Entre as justificativas apresentadas pela corte, está o fato de as mutações provocadas por essas técnicas constituírem alterações feitas no material genético do organismo de maneira “não natural”, além do fato de o processo utili-

zar-se de técnicas de DNA recombinante. Esse é um aspecto da regulamentação da UE que difere das normas dos EUA e do Canadá, baseadas na segurança do produto, independentemente do processo usado para obtê-lo (Friedrichs et al., 2019; Leone, 2019).

O princípio da precaução para novas abordagens foi utilizado como justificativa da proibição, visando evitar possíveis efeitos nocivos à saúde humana, animal e ao meio ambiente. A maioria dos pedidos de concessão de OGMs à UE têm sido negados, e os aprovados têm consentimento limitado por um período de 10 anos (renovável), com monitoramento obrigatório após a colocação no mercado (Schulman et al., 2020). O tempo médio de aprovação de alimentos para consumo humano e animal (excluindo fins de cultivo) pode durar cerca de 5 anos (Zimny et al., 2019).

Diante da preocupação da comunidade europeia em ter contato com gêneros alimentícios GM e alimentos para animais, o regulamento n.º 1829/2003 restringe a entrada não autorizada de OGM na UE e obriga os fornecedores de plantas e produtos GM a rotular os alimentos que contenham mais de 0,9% de OGM, informando os métodos para sua detecção (Davison; Ammann, 2017). O Regulamento n.º 1830/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho da UE também regula a rastreabilidade e a rotulagem de alimentos GM, visando garantir que os consumidores sejam informados sobre a presença de OGMs e seus produtos, de modo a permitir uma escolha informada do produto (Davison; Ammann, 2017). Em adição à Diretiva 2001/18/CE, que exige monitoramento obrigatório após a liberação comercial de produtos GM, a Diretiva 2009/41/CE vem complementar e exigir que os Estados-membros da UE enviem, a cada três anos, um relatório de suas experiências com o produto liberado, informando avaliação de risco, acidentes, inspeções de controle do cumprimento, consulta e informação ao público e eliminação de resíduos (Comissão Europeia, 2012). Além dessas medidas, por meio do regulamento (CE) n.º 1946/2003, relativo a movimentos transfronteiriços de OGM, tornou-se obrigatória a introdução de medidas protetoras nas zonas fronteiriças do território, visando evitar possível contaminação entre culturas não GMs e GMs em países vizinhos (European Commission, 2020).

Mesmo com toda essa regulamentação, houve casos de liberação da entrada de OGMs no bloco europeu, contrariando a opinião de vários Estados-membros da UE. Diante dessa contrariedade, surgiu a Diretiva (UE) 2015/412, de 11 de março (que alterou a Diretiva 2001/18/CE), a qual diz respeito à possibilidade de os Estados-membros restringirem ou proibirem o cultivo de OGMs em seu território usando a cláusula “*opt-out*” e o princípio da subsidiariedade (Davison; Ammann, 2017). Entre os Estados-membros que optaram por restringir totalmente a entrada de OGMs em seu território, estão Áustria, Região da Valônia (Bélgica), Bulgária, Croácia,

Chipre, Dinamarca, França, Alemanha, Grécia, Hungria, Itália, Letônia, Lituânia, Luxemburgo, Malta, Holanda, Polônia, Eslovênia, Irlanda do Norte, País de Gales e Escócia (Reino Unido) (Friedrichs et al., 2019). Plantas editadas pelas novas técnicas de melhoramento são consideradas OGMs pelo parlamento europeu e, portanto, estão incluídas em todas as medidas regulatórias de OGMs da UE.

A legislação da UE que restringe OGMs e culturas editadas na Europa ocasiona impactos econômicos significativos no setor de alimentos e na agricultura. O mercado de sementes da UE, por exemplo, está estimado em 7 bilhões de euros por ano (Friedrichs et al., 2019). A impossibilidade de cultivo e desenvolvimento de culturas melhoradas pela biotecnologia moderna também ocasiona a transferência de investimentos em pesquisa para fora da UE, impactando o setor de pesquisa e inovação.

Segundo Brookes e Barfoott (2014), nos últimos 17 anos (anteriores a 2012) de adoção da biotecnologia agrícola por 17,3 milhões de agricultores, houve um benefício econômico de US\$ 116,6 bilhões, o qual aumentou para US\$ 167,7 bilhões até 2015. Culturas GM geraram redução de 37% no uso de pesticidas químicos, aumento de 22% na produção agrícola e lucro de 68% aos agricultores (Klümper; Qaim, 2014). Podem ser alcançados na EU, por meio da adesão a culturas editadas, benefícios similares ou maiores, além dos benefícios de se usar uma tecnologia verde, incluindo o bloco europeu no competitivo mercado global de *commodities*. Entre os desafios agrícolas da UE, está a produção sustentável de alimentos com menos defensivos agrícolas, irrigação, cultivados em menor área, sob um clima de constantes mudanças climáticas. Essas exigências mostram a necessidade de novas cultivares melhoradas, deixando a edição de genoma como uma solução promissora para o mercado europeu. Entretanto, para isso, a UE necessita harmonizar sua legislação de biotecnologia com os demais países, principalmente com os principais produtores de alimento no mundo.

## Regulamentação da edição genômica na Ásia

A China regula estritamente a importação e produção de OGMs, conforme a normativa criada pelo *Chinese Ministry of Agriculture and Rural Affairs* (MARA) em 2001, que prevê a administração da segurança de OGMs agrícolas. Em 2018, por intermédio do *National Bio-Safety Committee* (NBC), o MARA alterou os regulamentos sobre avaliação de segurança, aprovação de importação e rotulagem de OGMs. As regras revisadas impõem ensaios e estudos adicionais no país sobre produtos biotecnológicos para a regulamentação. O governo chinês, a partir de 2016, criou um plano de apoio com duração de 5 anos para iniciativas de pesquisa voltadas

para edição gênica (Cohen, 2019). A compra da Syngenta pela estatal ChemChina em 2017 reforça o interesse da China no domínio da tecnologia para produção de alimentos. Apesar de ser um dos países com maior número de publicações relacionadas à edição de genes, a legislação enquadra organismos editados como OGMs. O MARA indicou em 2019 que novos regulamentos estão em desenvolvimento, de forma a alinhar a China com outros países, uma vez que esses regulamentos podem fornecer um processo regulatório simplificado para alguns produtos geneticamente editados no futuro (Estados Unidos, 2019).

No Japão, os produtos editados com as técnicas de NBTs são avaliados caso a caso e precisam ser notificados ao governo, que exige informações técnicas sobre o procedimento utilizado e os genes direcionados para a modificação. Devem ser notificados os organismos modificados que contêm DNA exógeno em sua construção ou seguem a regulamentação destinada a OGMs, assim como cultivares editadas que passam por cruzamento com uma cultivar não editada (Sato, 2020). A regulação é realizada por quatro ministérios do governo: Ministério da Agricultura, Florestas e Pesca; Ministério do Meio Ambiente; Ministério da Educação, Cultura, Esportes, Ciência e Tecnologia; Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar. Além destes, uma comissão independente, a Comissão de Segurança Alimentar – *Food Safety Commission* (FSC), realiza a avaliação de risco de alimentos e rações animais.

Recentemente, a Índia dispôs normativas preliminares para a regulamentação de produtos editados, exigindo testes de segurança que comprovem a eficácia da edição gênica. Assim como diversos outros países, a Índia adota uma postura que avalia o processo utilizado para a edição em vez da avaliação do produto final. Para a regulamentação dos organismos editados por meio da técnica de SDN-1, exige-se a comprovação, com extensos dados, de que a edição do gene foi bem-sucedida. Ao utilizar SDN-2 para edição de organismos, além da comprovação da eficácia da edição, são necessários testes de campo para comprovar a eficiência da transformação. Ao se fazer a inserção de um DNA exógeno por meio da técnica de SDN-3, o organismo segue o mesmo processo que os OGMs, que incluem testes de segurança alimentar humana e animal e de riscos ao meio ambiente. A responsabilidade de realização das avaliações são do Comitê Institucional de Biossegurança, Comitê de Avaliação de Engenharia Genética e Comitê de Revisão sobre Manipulação Genética (Índia, 2020).

A Indonésia não possui regulamentação específica para a produção de cultivares editadas. Dessa forma todos os produtos provenientes de edição gênica são avaliados ao rigor da regulamentação para OGMs. As avaliações e a regulamentação são realizadas com base no Protocolo sobre Biossegurança da Convenção sobre Diversidade Biológica, baseado no Regulamento do Governo nº 21/2005.

A responsabilidade da avaliação inicial é de uma agência governamental não departamental. Em seguida, a análise é enviada à *Convention on Biological Diversity* (CBD), uma comissão de biossegurança ligada à *National Agency for Drug and Food Control* (Badan POM). Caso o produto atenda às normativas estipuladas por lei, ele é encaminhado à Agência Nacional de Controle de Medicamentos e Alimentos, e a notificação é então reavaliada pela comissão de biossegurança e divulgada (Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2012).

## Regulamentação da edição genômica na Oceania

### Austrália

A Austrália considera como OGM um organismo proveniente de edição com base no tipo de processo utilizado para desenvolver o produto editado por genes e não de acordo com as características do próprio produto. Organismos que passam por um processo de edição gênica são regulamentados pelo *Gene Technology Regulator* (GTR), órgão responsável por regular a produção e liberação de OGMs, com base nas normativas descritas na *Gene Technology Regulations 2001*, feitas sob a Lei de Tecnologia Genética de 2000.

Com as novas técnicas de edição genômica *New Breeding Techniques* (NBTs), como CRISPR, *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) e *Zinc-finger nucleases* (ZFNs), essa normativa precisou passar por modificações. Em 2019, foi criada a emenda *Gene Technology Amendment (2019 Measures No 1)*, cabendo ao órgão regulador, após revisão sistemática do pedido de liberação, definir se o organismo que passou por alguma NBT é classificado como transformação de baixo risco notificável ou transformação isenta de notificação. A normativa é descrita nas seções 140 e 141 da emenda. O item 4 do anexo 1 da emenda estabelece que organismos modificados com NBTs não são OGMs, desde que nenhum tipo de ácido nucleico seja adicionado para orientar o reparo direcionado ao homólogo. Para as tecnologias de edição de genoma com nucleases direcionadas ao local, *SDNs*, os sistemas conhecidos como SDN-1 não são regulamentados por similaridade às técnicas tradicionais de mutagênese. As demais técnicas, SDN-2 e SDN-3, podem inserir ou não no genoma do organismo um DNA exógeno, sendo essa expressão estável ou transitória. Organismos que têm expressão do DNA exógeno inserida de forma transitória não são considerados OGMs. Entretanto, devido à sua constituição genética final, os sistemas SDN-2 e SDN-3 são considerados como OGMs, seguindo a definição na lei (Eckerstorfer et al., 2019).

Como a regulamentação dos organismos que passam por um processo de NBT para a obtenção de uma característica é de responsabilidade do GTR, na Austrália e na Nova Zelândia os alimentos são regulados por um sistema em conjunto, o *Food Standards Australia New Zealand* (FSANZ). Cabe a esse órgão desenvolver e definir os regulamentos pré-mercado, como rotulagem de alimentos provenientes da edição de genes (Food Standards Australia New Zealand, 2019).

## Nova Zelândia

A Nova Zelândia, ao contrário da Austrália, considera todas as técnicas de edição gênica como OGM. O país adota uma posição de cautela e observação das normativas estipuladas globalmente, a fim de adaptar seu sistema ao longo do tempo, de acordo com os desenvolvimentos internacionais (Fritsche et al., 2018).

As pesquisas que envolvem plantas geneticamente editadas são supervisionadas pela Autoridade de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Authority - EPA*), responsável por supervisionar o desenvolvimento e liberação de OGM sob a Lei de Substâncias Perigosas e Novos Organismos – *Hazardous Substances and New Organisms* (HSNO) Act 1996. Todas as técnicas de edição de genes são reguladas, mesmo que não incorporem nenhum gene exógeno (Nova Zelândia, 2019).

## Harmonização da legislação mundial sobre edição de genomas em plantas

Na avaliação brasileira (semelhante ao que vem sendo feito nos demais países das Américas, Japão, Austrália, Israel, entre outros), mutações produzidas por sistemas SDN-1 causam inativação do gene nativo-alvo (*knockout*). Isso permite, de forma precisa e sem a inclusão de DNA de outras espécies no produto final, a modificação de características de interesse. Nesse caso, o produto não se enquadra como OGM à luz da Lei de Biossegurança nº 11.105/2005, tendo em vista o fato de a legislação brasileira excluir como OGM os produtos obtidos por mutagênese. O mesmo ocorre com produtos obtidos pelo melhoramento clássico, ou por mutações induzidas por fatores externos diversos, como, por exemplo, exposição à luz UV, radiações ionizantes, substâncias químicas, ou ainda por erros durante a replicação de DNA. Dessa forma, as mutações produzidas por sistemas SDN-1 devem receber o mesmo critério de avaliação utilizado nos processos mencionados. O conhecimento cada vez mais profundo do genoma das diferentes espécies tem permitido sua edição com muito mais precisão quando comparado com sistemas de mutação induzidos

por radiações ou produtos químicos, como tem sido feito no desenvolvimento de variedades comerciais por décadas.

Sistemas de edição de genomas tipo SDN-2 podem ou não ser considerados como OGM perante a legislação brasileira e a da maioria dos países das Américas, em análises caso a caso. São sistemas similares à mutagênese natural, pois alteram pequenas porções de DNA genômico, como ocorre em programas de melhoramento genético, ou em alterações causadas por produtos químicos/radiação, ou mesmo na diferenciação natural de germoplasma de uma espécie coletada em diferentes locais. O principal fator diferenciador em considerar ou não como OGM produtos obtidos por sistemas SDN-2 tem sido a presença de DNA de outra espécie no produto final.

Já sistemas SDN-3, pela complexidade dos elementos genéticos introduzidos, normalmente se enquadram como OGM, dependendo sempre de uma análise caso a caso e da origem do DNA utilizado.

Diferentemente da Lei de Biossegurança brasileira, que exclui mutagênese do escopo de OGM, a decisão do Tribunal de Justiça da União Europeia sobre o tema (processo C-528/16, de 25 de julho de 2018) estabeleceu que a Diretiva 2001/18/CE, sobre análise de risco de OGM, aplica-se a produtos obtidos pelas “novas técnicas de mutagênese”, ou seja, sistemas SDN.

A comunidade científica europeia, assim como empresas desenvolvedoras de produtos com técnicas biotecnológicas, tem provocado uma discussão com as agências regulatórias europeias, visando a revisão dessa decisão e o alinhamento da legislação europeia com o resto do mundo. Nesse sentido, a *European Food Safety Authority* (EFSA), em consulta pública feita em maio de 2020, avaliou a possibilidade de produtos obtidos por sistemas SDN-1 e SDN-2 terem uma análise de risco diferenciada da que ocorre atualmente na União Europeia em relação aos OGMs. Em um primeiro painel de discussão, a EFSA havia concluído que metodologias de avaliação de risco sobre sistemas SDN-3 poderiam ser mais simplificadas em relação ao que é feito com OGMs, já que em sistemas SDN-3 a introgressão no genoma das sequências gênicas de interesse ocorre de forma direcionada e em local definido, diferentemente dos processos com transgênicos tradicionais, nos quais as inserções no genoma são ao acaso.

Num segundo painel de discussão, a EFSA concluiu também que seriam parcialmente aplicáveis aos sistemas SDN-1 e SDN-2 as conclusões do primeiro painel. Uma vez que abordagens SDN-1/SDN-2 visam modificar uma sequência de DNA endógena, cujo produto final não contenha DNA exógeno, essas plantas não apresentariam nenhum dos riscos potenciais relacionados à inserção de um transgene.

Vários países, incluindo o Brasil, entendem que a introdução de variabilidade em espécies de importância econômica pode ajudar a alcançar importantes objetivos de sustentabilidade, alimentos mais saudáveis, menor uso de defensivos químicos agrícolas, além de contribuir para um meio ambiente mais saudável e auxiliar na mitigação dos problemas produzidos pelas mudanças climáticas globais, entre outras possibilidades. As inovações na área da genética devem ser feitas com respeito aos princípios básicos da biossegurança, como tem ocorrido nas últimas décadas, considerando-se a expertise da comunidade científica mundial.

A legislação não pode barrar o desenvolvimento tecnológico, ou permitir que poucas instituições e empresas tenham a possibilidade de desenvolver produtos de base biotecnológica, como ocorreu no caso dos transgênicos, tendo-se em vista processos dispendiosos e demorados de aprovação criados por cada país. Se os produtos resultantes de mutagênese direcionada, principalmente sistemas SDN-1 e SDN-2, forem sujeitos às mesmas exigências de avaliação de risco que OGMs tradicionais/SDN-3, poderá haver restrição do desenvolvimento tecnológico às poucas e maiores empresas, limitando a concorrência de mercado, o que privará efetivamente a maioria dos agricultores e consumidores dos benefícios advindos da geração de produtos com essas tecnologias.

Brasil, Argentina, Canadá, Chile, Colômbia, EUA, entre outros países, estão entre os primeiros a terem legislação que regulamenta o uso seguro de técnicas de edição gênica. Nesses países é clara a disseminação do número, tipo e tamanho das instituições/empresas que começam a desenvolver produtos de interesse para a sociedade, assim como também há um aumento expressivo das espécies trabalhadas com essas novas técnicas de genética. Com os OGMs (transgênicos), o investimento era viável somente em grandes commodities, como a soja, o milho e o algodão, entre as principais.

Como os sistemas SDN-1 e SDN-2 simulam/imitam mecanismos de indução de variabilidade genética que ocorrem de forma constante e frequente na natureza, sua detecção em produtos que tiveram seu genoma editado é praticamente impossível, se não for conhecido o local onde as mutações foram feitas. A própria União Europeia, no relatório "Detecção de alimentos e rações vegetais obtidos por novas técnicas de mutagênese" (European Commission, 2019), reconhece que produtos cujo genoma foi editado podem ser indistinguíveis de produtos alterados por processos naturais ou por técnicas convencionais de reprodução.

O Brasil, em alinhamento com a comunidade científica nacional, internacional e com a legislação de vários países, muitos dos quais é parceiro comercial, entende a importância de uma harmonização nas leis de biossegurança de países exportadores e importadores de alimentos, de forma que essas leis reflitam e acolham o

progresso tecnológico, mantendo a qualidade e a segurança dos alimentos, mas também permitindo uma maior diversificação dos participantes da cadeia produtiva. Os produtos gerados por edição de genoma, principalmente pelos sistemas SDN-1 e SDN-2, não devem estar sujeitos aos requisitos de análise de risco como os OGMs se também puderem ser obtidos por métodos convencionais ou resultar de processos espontâneos na natureza.

A harmonização de normas regulatórias permite também criar segurança jurídica para os desenvolvedores em cada país, evitando regras nacionais/regionais individuais para produtos resultantes de mutagênese aleatória convencional ou do uso de sistemas SDN. Além disso, impede que dois produtos indistinguíveis sejam regulamentados de duas maneiras diferentes.

## Referências

- ARGENTINA. Resolución 173/2015, de 12 de maio de 2015. **Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP)**. Disponível em: <<https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-173-2015-246978/texto>>. Acesso em: 15 maio 2020.
- ARGENTINA. Resolución 701/2011, de 27 de outubro de 2011. **Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP)**. Disponível em: <<https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-701-2011-189067/texto>>. Acesso em: 17 maio 2020.
- ARGENTINA. Resolución 763/2011, de 17 de agosto de 2011. **Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca**. Disponível em: <<https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-763-2011-185806/texto>>. Acesso em: 17 maio 2020.
- BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN (Indonésia). **Peraturan nomor HK.03.1.23.03.12.1563 Tahun 2012**. Pedoman pengkajian keamanan pangan produk rekayasa genetik. 2012. Disponível em: [https://standarpangan.pom.go.id/dokumen/peraturan/2012/Perka\\_BPOM\\_No\\_HK.03.1.23.03.12.1563\\_Tahun\\_2012\\_tentang\\_Keamanan\\_Pangan\\_PRG.pdf](https://standarpangan.pom.go.id/dokumen/peraturan/2012/Perka_BPOM_No_HK.03.1.23.03.12.1563_Tahun_2012_tentang_Keamanan_Pangan_PRG.pdf). Acesso em: 6 out. 2020.
- BERGESON, L. L. Enlisting modern technologies to ensure a safe food supply. **Natural Resources & Environment**, v. 31, n. 3, p. 31-34, 2017.
- BRANCH, L. S. **Consolidated federal laws of Canada, Feeds Act**. 2019b. Disponível em: <<https://laws-lois.justice.gc.ca/eng/acts/F-9/>>. Acesso em: 20 maio 2020.
- BRANCH, L. S. **Consolidated federal laws of Canada, Food and Drugs Act**. 2020. Disponível em: <<https://laws.justice.gc.ca/eng/acts/F-27/>>. Acesso em: 20 maio 2020.
- BRANCH, L. S. **Consolidated federal laws of Canada, Seeds Act**. 2019a. Disponível em: <<https://laws-lois.justice.gc.ca/eng/acts/S-8/>>. Acesso em: 20 maio 2020.
- BRASIL. Lei Nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que

envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 28 de março, de 2005. p. 1. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/lei/l111105.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l111105.htm)>. Acesso em: 3 set. 2020.

BRASIL. Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018. Estabelece os requisitos técnicos para apresentação de consulta à CTNBio sobre as Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão. **[Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio]**. Disponível em: <[http://ctnbio.mctic.gov.br/resolucoes-normativas/-/asset\\_publisher/OgW431Rs9dQ6/content/resolucao-normativa-n%C2%BA-16-de-15-de-janeiro-de-2018?redirect=http%3A%2F%2Fctnbio.mctic.gov.br%2Fresolucoes-normativas%3Fp\\_p\\_id%3D101\\_INSTANCE\\_OgW431Rs9dQ6%26p\\_p\\_lifecycle%3D0%26p\\_p\\_state%3Dnormal%26p\\_p\\_mode%3Dview%26p\\_p\\_col\\_id%3Dcolumn-2%26p\\_p\\_col\\_count%3D3](http://ctnbio.mctic.gov.br/resolucoes-normativas/-/asset_publisher/OgW431Rs9dQ6/content/resolucao-normativa-n%C2%BA-16-de-15-de-janeiro-de-2018?redirect=http%3A%2F%2Fctnbio.mctic.gov.br%2Fresolucoes-normativas%3Fp_p_id%3D101_INSTANCE_OgW431Rs9dQ6%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-2%26p_p_col_count%3D3)>. Acesso em: 3 set. 2020.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. Economic impact of GM crops: the global income and production effects 1996–2012. **GM Crops & Food**, v. 5, n. 1, p. 65-75, 2014.

CANADA. Canadian Food Inspection Agency. **Directive Dir 2000-07: Conducting Confined Research Field Trials of Plants with Novel Traits in Canada**. 2019. reference material. Disponível em: <[https://www.inspection.gc.ca/plant-health/plants-with-novel-traits/applicants/directive-dir-2000-07/eng/1304474667559/1304474738697#a1\\_1](https://www.inspection.gc.ca/plant-health/plants-with-novel-traits/applicants/directive-dir-2000-07/eng/1304474667559/1304474738697#a1_1)>. Acesso em: 19 maio 2020.

CHILE. Resolución Nº 1.523/2001, de 6 de julho de 2001. **Servicio Agrícola y Ganadero (SAG)**. Disponível em: <[http://www.sag.cl/sites/default/files/RES\\_1523\\_2001.pdf](http://www.sag.cl/sites/default/files/RES_1523_2001.pdf)>. Acesso em: 17 maio 2020.

COHEN, J. “Fields of dreams”. **Science**, v. 365, n. 6452, p. 422-425, 2019.

COLÔMBIA. Decreto Nº 4525, de 6 de dezembro de 2005. **Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural**. Disponível em: <<https://www.ica.gov.co/getattachment/6ea8d6c3-aadc-42ad-958d-2eb377cfe528/2005D4525.aspx>>. Acesso em: 15 maio 2020.

COLÔMBIA. Resolución Nº 00029299, de 1 de agosto de 2018. **Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)**. Disponível em: <<https://www.ica.gov.co/getattachment/2d02cc52-d1c5-4123-8a5a-aea9ad2ce926/2018R29299.aspx>>. Acesso em: 15 maio 2020.

COMISSÃO EUROPEIA. **Relatório sobre a experiência dos Estados-Membros no domínio da Diretiva 2009/41/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 6 de maio de 2009, relativa à utilização confinada de microrganismos geneticamente modificados (reformulação) para o período 2006 – 2009**. Bruxelas, 2012. 10 p. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52012DC0398&from=PT> <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52012DC0398&from=PT>>. Acesso em: 2 set. 2020.

DAVISON, J.; AMMANN, K. New GMO regulations for old: Determining a new future for EU crop biotechnology. **GM Crops & Food**, v. 8, n. 1, p. 13-34, 2017.

DEDERER, H.-G.; HAMBURGER, D. (Eds.). **Regulation of Genome Editing in Plant Biotechnology: A Comparative Analysis of Regulatory Frameworks of Selected Countries and the EU**. Cham: Springer International Publishing, 2019.

ECKERSTORFER MF, ENGELHARD M, HEISSENBERGER A, SIMON S, TEICHMANN H. Plants Developed by New Genetic Modification Techniques-Comparison of Existing Regulatory Frameworks in the EU and Non-EU Countries. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. v. 7, 2019.

ELLENS, K. W.; LEVAC, D.; PEARSON, C.; SAVOIE, A.; STRAND, N.; LOUTER, J.; TIBELIUS, C. Canadian regulatory aspects of gene editing technologies. **Transgenic Research**, v. 28, n. 52, p. 165-168, 2019.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **Animal and Plant Health Inspection Service: Rules and Regulations**. 7 CFR Parts 330, 340 and 372. Federal Register, v. 85, n. 96, 18 May 2020. Disponível em: <[https://www.aphis.usda.gov/brs/fedregister/BRS\\_2020518.pdf](https://www.aphis.usda.gov/brs/fedregister/BRS_2020518.pdf)>. Acesso em: 7 jun. 2020.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service. **USDA SECURE Rule Paves Way for Agricultural Innovation**. Washington DC, 2020a. Disponível em: <[https://www.aphis.usda.gov/aphis/newsroom/news/sa\\_by\\_date/sa-2020/secure](https://www.aphis.usda.gov/aphis/newsroom/news/sa_by_date/sa-2020/secure)>. Acesso em: 7 jun. 2020.

ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. **Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA) and Federal Facilities**. Policies and Guidance. 2020b. Disponível em: <<https://www.epa.gov/enforcement/federal-insecticide-fungicide-and-rodenticide-act-fifra-and-federal-facilities>>. Acesso em: 20 maio 2020.

ESTADOS UNIDOS. Foreign Agricultural Service. **China** - Peoples Republic of Agricultural Biotechnology Annual. 2019. 22 p. CH 18085. Disponível em: <[https://gain.fas.usda.gov/RecentGAINPublications/Agricultural Biotechnology Annual\\_Beijing\\_China - Peoples Republic of\\_2-22-2019.pdf](https://gain.fas.usda.gov/RecentGAINPublications/Agricultural%20Biotechnology%20Annual_Beijing_China_-_Peoples%20Republic%20of_2-22-2019.pdf)>. Acesso em: 25 ago. 2020.

ESTADOS UNIDOS. Office Of The Law Revision Counsel. **Federal Food, Drug, And Cosmetic Act**. Title 21 – Food and Drugs, chapter 9 – Federal Food, Drug, And Cosmetic Act. June 25, 1938, ch. 675, §1, 52 Stat. 1040. Disponível em: <<https://uscode.house.gov/browse/prelim@title21/chapter27&edition=prelim>>. Acesso em: 20 maio 2020.

EUROPEAN COMMISSION. **GMO Legislation**. Disponível em: <[https://ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation_en)>. Acesso em: 11 abr. 2020.

FOOD STANDARDS AUSTRALIA NEW ZEALAND. **Review of food derived using new breeding techniques**: Final report. c2019. Disponível em: <<https://www.foodstandards.gov.au/media/Pages/Final-Report---Review-of-food-derived-using-new-breeding-techniques.aspx>>. Acesso em: 2 set. 2020.

FRIEDRICH, S.; TAKASU, Y.; KEARNS, P.; DAGALLIER, B.; OSHIMA, R.; SCHOFIELD, J.; MOREDDU, C. An overview of regulatory approaches to genome editing in agriculture. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 2, p. 208-220, 2019.

FRITSCH, S.; POOVAIAH, C.; MACRAE, E.; THORLBY, G. A New Zealand perspective on the application and regulation of gene editing. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-8, Sep., 2018.

INDIA. Ministry of science & technology. Department of Biotechnology. **Draft Document on Genome Edited Organisms: Regulatory Framework and Guidelines for Risk Assessment**. 2020. Disponível em: <[http://dbtindia.gov.in/sites/default/files/Draft\\_Regulatory\\_Framework\\_Genome\\_Editing\\_9jan2020a.pdf](http://dbtindia.gov.in/sites/default/files/Draft_Regulatory_Framework_Genome_Editing_9jan2020a.pdf)>. Acesso em: 2 set. 2020.

ISAAA. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years**. ISAAA: Ithaca 2017. (ISAAA Brief, 53).

Disponível em: <<https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/53/download/isaaa-brief-53-2017.pdf>>. Acesso em: 19 maio 2020.

KLÜMPER, W.; QAIM, M. A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. **PLoS One**, v. 9, n. 11, 2014.

LEONE, L. Gene Editing for the EU Agrifood: Risks and Promises in Science Regulation. **European Journal of Risk Regulation**, v. 10, n. 4, p. 766-780, 2019.

MALINGREAU, J. P.; EVA, H. D.; DE MIRANDA, E. E. Brazilian Amazon: a significant five year drop in deforestation rates but figures are on then rise again. **Ambio**, v. 4, n. 3, p. 309-314, 2012.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y PESCA. La FAO ratifica a CONABIA como Centro de Referencia en Bioseguridad. 25 de abril de 2019. Disponível em: <<https://www.argentina.gob.ar/noticias/la-fao-ratifica-conabia-como-centro-de-referencia-en-bioseguridad>>. Acesso em: 3 set. 2020.

NOVA ZELÂNDIA. Ministry for the environment. **Hazardous Substances and New Organisms Act 1996**. public act 1996, n. 30, section 1(2). Wellington, 2019. Disponível em: <<http://www.legislation.govt.nz/act/public/1996/0030/latest/DLM381222.html>>. Acesso em: 20 maio 2020.

OSTP - OFFICE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY POLICY. Coordinated framework for regulation of biotechnology products. **Fed Regist** 51:23,302–23,367. 26 June, 1986.

PARAGUAI. Resolución MAG N° 565, de 13 de maio de 2019. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). Disponível em: <<https://www.inbio.org.py/wp-content/uploads/Resoluci%C3%B3n-565-de-2019.pdf>>. Acesso em: 17 maio 2020.

RUFFELL, D. The EU Court of Justice extends the GMO Directive to gene-edited organisms. **FEBS Letter**, v. 592, n. 22, p. 3653-3657, 2018.

SATO, S. **Agricultural Biotechnology Annual**: Tokyo, 2019. USDA, 2020.

Disponível em: <[https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Agricultural%20Biotechnology%20Annual\\_Tokyo\\_Japan\\_10-20-2019](https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Agricultural%20Biotechnology%20Annual_Tokyo_Japan_10-20-2019)>. Acesso em: 2 set. 2020.

SCHULMAN, A. A.-O.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M.; TEERI, T. H. European Court of Justice delivers no justice to Europe on genome-edited crops. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, n. 1, p. 8-10, 2020.

USDA Foreign Agricultural Service. Global Agricultural Information Network. GAIN Report: Argentina. Agricultural Biotechnology Annual. 15 de fevereiro de 2019. Disponível em: <[https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Agricultural%20Biotechnology%20Annual\\_Buenos%20Aires\\_Argentina\\_2-15-2019.pdf](https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Agricultural%20Biotechnology%20Annual_Buenos%20Aires_Argentina_2-15-2019.pdf)>. Acesso em: 17 maio 2020.

WHELAN, A. I.; LEMA, M. A. Regulation of genome editing in plant biotechnology: Argentina. In: Regulation of Genome Editing in Plant Biotechnology. Springer, Cham, 2019. p. 19-62.

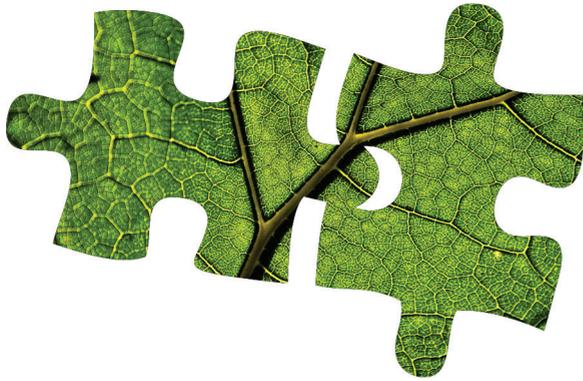
WHELAN, A. I.; LEMA, M. A. Regulatory framework for gene editing and other new breeding techniques (NBTs) in Argentina. **GM Crops & Food**, v. 6, p. 253–265, 2015.

ZIMNY, T.; SOWA, S.; TYCZEWSKA, A.; TWARDOWSKI, T. Certain new plant breeding techniques and their marketability in the context of EU GMO legislation - recent developments.

**New Biotechnology**, v. 51, p. 49-56, 2019.

**Embrapa**

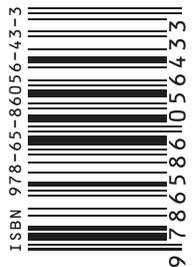
**Agroenergia**



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



**PÁTRIA AMADA  
BRASIL**  
GOVERNO FEDERAL



CGPE 016271