

**MUTAÇÕES DIRIGIDAS NO SLC45A2 POR CRISPR/CAS9: POTENCIAL  
MARCADOR FENOTÍPICO DE EDIÇÃO GENÔMICA EM TAMBAQUI  
(*Colossoma macropomum*)**

**Adria Silva Gomes** (Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e Recursos  
Pesqueiros-(PPGCARP/UFAM) Manaus-AM)

**Gabriela Tomas Jerônimo** (Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e  
Recursos Pesqueiros-(PPGCARP/UFAM) Manaus-AM)

**Geice Ribeiro Silva** (Embrapa Pesca e Aquicultura (CNPASA) Palmas-TO)

**Ana Paula Oeda Rodrigues** (Embrapa Pesca e Aquicultura (CNPASA) Palmas-TO)

**Ademil Domingos Nascimento** (Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e  
Biotecnologia da Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE))

**Eduardo Sousa Varela** (Embrapa Pesca e Aquicultura (CNPASA) Palmas-TO)

**Fernanda L. de Almeida O'Sullivan** (Embrapa Pesca e Aquicultura (CNPASA)  
Palmas-TO)

A edição genômica (EG), mediada por CRISPR/Cas9, é muito eficiente em induzir mutações bialélicas já na primeira geração (F0) de teleósteos. Porém, a ocorrência de mosaicismos exige novos acasalamentos entre F0, prolongando o processo de validação. Uma estratégia promissora que já tem sido utilizada na EG de peixes é a co-edição, via co-injeção, com um gene repórter de pigmentação, o que permite a identificação rápida e precisa do sucesso da edição ainda nos estágios iniciais de desenvolvimento, com poucos dias de vida. Neste trabalho avaliamos as diferentes mutações induzidas por CRISPR/Cas9 no gene *slc45a2* de tambaqui, considerando seu potencial como marcador fenotípico de EG na espécie. Embriões unicelulares de tambaqui foram microinjetados com *slc45a2*sgRNA e proteína Cas9 (5 µg/ml). O fenótipo foi avaliado por fotografias dos peixes, e a genotipagem realizada a partir do DNA de nadadeiras de 50 juvenis e 4 controles, seguido de PCR, purificação e sequenciamento Sanger. As análises pelo Inference of CRISPR Edits (ICE) utilizaram como métricas: Indels (%), KO Score (mutações frameshift ou deleções ≥21pb; %) e ICE-d (nível de discordância entre as sequências controle e editada; %) para avaliar a eficiência da mutagênese. A quantidade de peixes editados (76% dos injetados) foi superior ao esperado para peixes (aproximadamente 40%). O KO-Score apresentou média de  $27,4 \pm 23,8$  e variação de 0,0 a 97,0, indicando que parte considerável das amostras exibiu edições potencialmente com perda da função gênica. O R<sup>2</sup> de  $0,94 \pm 0,04$ , confirmou a elevada confiabilidade das estimativas geradas. Assim, o nocaute do *slc45a2* em tambaqui foi altamente eficiente, promovendo uma predominância de indels de pequena deleção responsáveis por frameshift e, conseqüentemente, perda de função. A baixa frequência de alelos silvestres e a alta ocorrência de mutações confirmam o sucesso do protocolo e validam o uso do CRISPR/Cas9 para estudos funcionais e aplicações em aqüicultura. As próximas etapas do estudo consistem em correlacionar os genótipos obtidos com as áreas de despigmentação observadas nos peixes editados, permitindo confirmar a utilização do *slc45a2* como marcador fenotípico em co-injeções com genes de interesse produtivo.