

TESTE RÁPIDO DE DIAGNÓSTICO DA EDIÇÃO GENÔMICA POR CRISPR/CAS9 NO GENE SLC45A2 EM TAMBAQUIS (*Colossoma macropomum*) PELA T7 ENDONUCLEASE I

Carolinne Siriano Sales (Centro Universitário Católica do Tocantins - Unicatólica)

Ana Babi de Moura Landim (Centro Universitário ITOP - UNITOP)

Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan (Embrapa Pesca e Aquicultura
(CNPASA))

Geice Ribeiro Silva (Embrapa Pesca e Aquicultura (CNPASA))

Thaís de O. Costa Fernandes (Embrapa Pesca e Aquicultura (CNPASA))

Thallyson Ferreira Rufino (Centro Universitário ITOP - UNITOP)

Pollyana Alves Araujo (Embrapa Pesca e Aquicultura (CNPASA))

Eduardo Sousa Varela (Embrapa Pesca e Aquicultura (CNPASA))

Devido os desafios metodológicos para a edição genética usando o CRISPR/Cas9 em espécies pecilotérmicas de regiões tropicais, já que a atividade ótima da enzima SpCas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9) circula em torno de 37°C, com o agravante de espécies como o peixe tambaqui (*Colossoma macropomum*) possuem ciclo muito rápido de divisão celular pós-fecundação (~ 20 minutos), o que torna o processo mais difícil na formação da geração F0 totalmente modificado, é oportuno a adoção de técnicas de triagem precoce de baixo custo que permitam um trabalho direcionado de forma a produzir linhagens alteradas em tempo hábil por meio de cruzamentos pré-selecionados. Dessa forma, a triagem por PCR (Reação em cadeia de polimerase) seguido de digestão por enzima de restrição (T7 Endonuclease I), combinado com genotipagem em gel, torna-se uma opção pertinente, pelo baixo custo e facilidade na análise. Com a proposta de validar um método rápido de diagnóstico de edição genética em peixes tambaquis (*Colossoma macropomum*) utilizando T7 ENDONUCLEASE I, os animais editados e não editados foram selecionados previamente usando como base os resultados gerados pelo sequenciamento Sanger usando o algoritmo ICE (Inference of CRISPR Edits). Após serem amplificados, o gDNA dos genótipos foram submetidos à formação de heteroduplex, seguido da digestão usando a enzima T7 Endonuclease I (NEB), conforme recomendação do fabricante, e posteriormente a genotipagem em gel de agarose e no sistema TapeStation para a validação do teste. Ao calcular o percentual de modificação genética, 21,4% das amostras apresentaram-se não editados (< 5), 10,7% com baixa edição (≥ 5 e < 15) e 67,8% media/altamente editados (≥ 15), sendo que o teste de Wilcoxon revelou distinção significativa entre o grupo editado e o controle (selvagem). Ao comparar com os resultados das duas plataformas de genotipagem, a técnica de triagem enzimática apresentou uma acurácia de 80% com sensibilidade de 81,5%, especificidade de 66,7% e precisão de 95,7%, com uma AUC de 0,728 (desempenho razoável 0,7 - 0,8). Isso demonstra que a técnica tem grande capacidade de identificar peixes editados, porém com alguma ressalva para a identificação de peixes não editados, já que houve a identificação correta dos não editados de apenas 66,7%. O T7E1 mostra-se ferramenta útil e economicamente viável para triagem de edição genética, com alta precisão e sensibilidade aceitável, mas não substitui totalmente o

Sanger em contextos que exigem alta confiabilidade em ambas as direções (positivo e negativo).