

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTRATÉGIAS PARA O AUMENTO NA EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE  
SUÍNOS GENETICAMENTE MODIFICADOS**

**Felipe Ledur Ongaratto**

**PORTO ALEGRE**

**2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Estratégias para o aumento na eficiência de produção de suínos geneticamente modificados**

**Autor: Felipe Ledur Ongaratto**

**Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na área de concentração em Biotécnicas e Fisiopatologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Orientador: Prof Dr. Marcelo Bertolini**

**PORTO ALEGRE**

**2019**

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001**

### CIP - Catalogação na Publicação

Ongaratto, Felipe  
Estratégias para o aumento na eficiência de  
produção de suínos geneticamente modificados / Felipe  
Ongaratto. -- 2019.  
129 f.  
Orientador: Marcelo Bertolini.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2019.

1. Modelo animal. 2. Clonagem. 3. Eletroporação. 4.  
CRISPR. 5. RNP. I. Bertolini, Marcelo, orient. II.  
Título.

Felipe Ledur Ongaratto

**Estratégias para o aumento na eficiência de produção de suínos geneticamente modificados**

Aprovado em 26 de março de 2019.

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. Marcelo Bertolini, Orientador  
Faculdade de Veterinária  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

---

Prof. Dr. José Luiz Rodrigues  
Faculdade de Veterinária  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

---

Dra. Andrea Galuppo  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

---

Profa. Dra. Fabiana Forell  
Faculdade de Veterinária  
Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC)

## **AGRADECIMENTOS/DEDICATÓRIA**

Agradeço primeiramente ao meu orientador Marcelo Bertolini por me acolher, me orientar e acreditar nesta jornada que começou mesmo antes do Doutorado, onde pude apreciar toda sua genialidade e sabedoria. Esta foi uma jornada de muito aprendizado e que os frutos estão sendo colhidos da forma que sempre me incentivou...Vá para fora!

Minha esposa e companheira Paula que desde a época de Iniciação Científica, sempre me incentivou a ir além. Um exemplo de dedicação e trabalho científico. 11 anos 24horas/7 dias da semana de puro amor e companheirismo. Hoje, muito mais que me fazer crescer como homem e profissional, me transformou em algo muito mais importante... PAI. Agradeço a nossa Martina por ser a alegria constante na casa e saber que lutamos por algo muito maior.

Agradeço aos meus pais Vera e Carlos, por sempre apoiarem minhas decisões, que muitas vezes nos fez ficar longe fisicamente, mas sempre dentro do coração mostrando o quão importante é o núcleo familiar para a formação pessoal. Se existe algo que me dá orgulho, é o amor deles.

Agradeço a todos que fizeram parte desta jornada na UFRGS que além de companheiros se tornaram grandes amigos.

Agradeço ao Professor Rodrigues por me receber em seu laboratório e me dar a oportunidade de crescimento e aprendizado.

Agradeço ao Dan, que me recebeu nos EUA e que sempre apoiou a pesquisa e, sem a sua ajuda não seria possível concluir grande parte dos experimentos.

Obrigado a todos os meus amigos que entenderam a minha ausência para me dedicar a algo maior.

É estressante, muitas vezes exaustivo, mas o conhecimento ninguém nos tira!

## RESUMO

Os animais geneticamente modificados (GM) são uma importante fonte de proteína e nutrição para a maioria dos seres humanos e desempenharão papel fundamental para satisfazer a crescente demanda por alimentos em uma população mundial cada vez maior. Existem atualmente várias técnicas disponíveis para a produção animais GM, sendo que a clonagem por transferência nuclear de célula somática (TNCS), desde o nascimento da ovelha Dolly, continua sendo a técnica *padrão ouro* para se obter animais transgênicos. Apesar da clonagem por TNCS estar estabelecida há mais 20 anos, a eficiência continua baixa, com variações entre as diferentes espécies já clonadas. Esta baixa eficiência é multifatorial, tendo como pontos-chave a qualidade do material biológico utilizado (oócitos), o processo de ativação química partenogenética e a reprogramação celular após a fusão da célula doadora com o citoplasma receptor. Vários intentos foram realizados para avaliar a qualidade oocitária de forma menos subjetiva. A exposição dos oócitos a uma solução hipertônica é uma das opções viáveis e com resultados promissores. A ativação química dos embriões reconstruídos deve ser feita de maneira mais fisiológica possível, tentando mimetizar os processos biológicos que ocorrem na fecundação. Existem várias outras técnicas disponíveis para a produção de animais GM, incluindo a introdução de transgene em embriões, dentre estas, a microinjeção e a eletroporação de zigotos. A última década experimentou uma revolução no desenvolvimento de métodos de edição gênica que permitem a introdução de alterações específicas em genomas complexos. Esta revolução se deu início com o uso de meganucleases, *Zinc Fingers*, TALENS e, mais recentemente, com o descobrimento do uso das CRISPRs. Este aumento na precisão das ferramentas de edição irá melhorar características dos animais de produção com base no genoma para a produção de alimentos. A genética de precisão também aumentará o desenvolvimento de biomateriais terapêuticos e modelos de doenças humanas como recursos para o desenvolvimento de terapias avançadas para pacientes. O uso das nucleases de edição, especialmente as CRISPRs, abriu um leque de possibilidade de outras técnicas para serem empregadas na edição sítio-dirigida, como a microinjeção citoplasmática e a eletroporação de zigotos. Este trabalho teve como objetivo aumentar a eficiência na produção embriões suínos utilizando a clonagem por TNCS selecionando os oócitos de maneira menos subjetiva, aumentando a eficiência na ativação partenogenética pelo uso de quelantes de zinco, e aumentando a produção e qualidade embrionária expondo embriões a um inibidor de desacetilase de histonas (Scriptaid), assim como de desenvolver um protocolo de eletroporação de embriões suínos funcional e repetível para a edição gênica em diferentes *loci* utilizando CRISPRs combinada com complexos ribonucleoproteicos.

**Palavras-chave:** Modelo animal, clonagem, eletroporação, CRISPR, RNP.

## ABSTRACT

Genetically modified (GM) animals are an important source of protein and nutrition for humans and will play key roles in meeting the growing demand for food in an ever-growing world population. There are currently several techniques available for the production of GM animals, but cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT), since the birth of Dolly, remains the gold standard technique for obtaining transgenic animals. Although cloning by SCNT was established more than 20 years, the efficiency in producing cloned animals remains low, with variations among the species already cloned. Such low efficiency is multifactorial, having as key points the quality of the biological material for use (oocytes), the parthenogenetic chemical activation process, and the cellular reprogramming after the fusion of the donor cell with the recipient cytoplasm. Several attempts have been made to evaluate oocyte quality in a less subjective and visual way as it is usually done. The exposure of oocytes to a hypertonic solution is one of the viable options with promising results. Also, the chemical activation of the reconstructed embryos should be done in a more physiological way, in an attempt to mimic the biological processes that occur after fertilization. Several other techniques are also available for the delivery of transgenes into embryos for the production of GM animals, among them, zygote microinjection and electroporation. The last decade has undergone a revolution in the development of methods for gene editing that allow the introduction of specific modifications into complex genomes. Such revolution began with the use of meganucleases, such as Zinc Fingers, TALENS and more recently, with the discovery and the use of CRISPRs. This increase in accuracy in the editing tools will improve animal traits for food production. Precision genetics will also enhance the development of therapeutic biomaterials and human disease models as resources for the development of advanced therapies for patients. The use of editing nucleases, especially CRISPRs, has opened up a range of possibilities for other techniques to be used in site-directed editing, such as cytoplasmic microinjection and zygote electroporation. This study aimed to increase the efficiency in the production of porcine embryos using SCNT cloning by selecting oocytes in less subjective ways, by increasing the parthenogenetic activation efficiency using zinc chelators, and by improving embryo production by exposing cloned embryos to a histone deacetylase inhibitor (Scriptaid), as well as by developing a functional and repeatable protocol for the electroporation of pig embryos for gene editing at different *loci* using CRISPRs combined with ribonucleoprotein complexes.

**Keywords:** Animal model, cloning, electroporation, CRISPR, RNP.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

<b>Figura 1.</b>	Múltiplas aplicações do uso da engenharia genética em animais de produção, com o suíno sendo demonstrado como exemplo	<b>15</b>
<b>Figura 2.</b>	Estratégias para a produção de animais transgênicos, baseadas na manipulação de células e de embriões	<b>20</b>
<b>Figura 3.</b>	Vias HR e NHEJ de reparo de DNA	<b>26</b>
<b>Figura 4.</b>	Nucleases Zinc Fingers	<b>33</b>
<b>Figura 5.</b>	Estrutura de um efetor TAL que ocorre naturalmente	<b>35</b>
<b>Figura 6.</b>	Estrutura de uma TALEN	<b>35</b>
<b>Figura 7.</b>	Estrutura e mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas9	<b>37</b>
<b>Figura 8.</b>	Cronologia do desenvolvimento e uso da microinjeção/micromanipulação de estruturas biológicas	<b>42</b>
<b>Figura 9.</b>	Imagem ilustrativa da microinjeção citoplasmática de zigotos suínos quimicamente ativados	<b>44</b>
<b>Figura 10.</b>	Câmara de eletroporação com zigotos suínos sendo eletroporados	<b>50</b>

### Capítulo 1

<b>Figure 1.</b>	Total number of cells (Means $\pm$ SD) in Day-7 <i>in vitro</i> -produced pig parthenogenetic (Control) or cloned (SCNT) blastocysts after treatment or not with Scriptaid after activation.	<b>75</b>
------------------	--	-----------

### Capítulo 2

<b>Figure 1.</b>	Diagram to illustrate the microinjection and electroporation procedures in parthenogenic pig embryos using Cas9/sgRNA RNPs.	<b>98</b>
<b>Figure 2.</b>	Proportion of embryos developing to the blastocyst stage after either electroporation, using 1 or 3 pulses (x1, x3) of 20 or 40 V, or microinjection (MI) with Cas9/RNP complex targeting the PAH gene (ssPAH).	<b>100</b>
<b>Figure 3.</b>	Efficiency of different electroporation parameters (20 V or 40 V with one or three pulses of 3 ms) in comparison with microinjection on the embryo	<b>101</b>



genome edition with Cas9/RNP complex targeting the PAH gene (ssPAH).

- Figure 4.** Sanger sequencing of the PAH *locus* comparing the sequence of a wild type embryo with an edited embryo, showing deletion of eight base pairs in an electroporated pig embryo. **102**
- Figure 5.** Proportion of embryos developing to the blastocyst stage after either electroporation, using 1 or 3 pulses (x1, x3) of 40 or 60 V, or microinjection with Cas9/RNP complex targeting the *Rosa26 locus* **104**
- Figure 6.** Efficiency of different electroporation parameters (40 V or 60 V with one or three pulses of 3 ms) in comparison with microinjection on the embryo genome edition with Cas9/RNP complex targeting the *Rosa26 locus* (ssRosa26). **105**
- Figure 7.** Effect of electroporation pulse repeats (one or three) in 1-cell pig embryos on (a) embryo development to the blastocyst stage, and (b) gene editing efficiency of Day-7 porcine blastocysts. **106**
- Figure 8.** Sanger sequencing of the *Rosa26 locus* comparing the sequence of a wild type embryo with an edited embryo, showing deletion of six base pairs in an electroporated pig embryo. **107**
- Figure 9.** a) Developmental rates and b) gene edition efficiency (NHEJ and HDR) for pig embryos electroporated with ssPAH+HDR by electroporation or microinjection. **109**
- Figure 10.** a) Developmental rates and b) gene edition efficiency (NHEJ and HDR) percentage for pig embryos electroporated with ssRosa26+HDR by electroporation or microinjection. **111**

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

<b>Table 1.</b>	Developmental rates of <i>in vitro</i> -produced pig parthenogenetic or cloned (SCNT) embryos after oocyte selection in sucrose hypertonic solution (SUC) following <i>in vitro</i> maturation	<b>72</b>
<b>Table 2.</b>	Developmental rates of <i>in vitro</i> -produced pig parthenogenetic or cloned (SCNT) embryos after treatment with TPEN during activation	<b>73</b>
<b>Table 3.</b>	Developmental rates of <i>in vitro</i> -produced pig parthenogenetic or cloned (SCNT) embryos after treatment with Scriptaid after activation	<b>74</b>

### Capítulo 2

<b>Table 1.</b>	Developmental rates and editing efficiency following microinjection or electroporation of parthenote 1-cell stage pig embryos with Cas9/RNP complex targeting the PAH gene (ssPAH)	<b>99</b>
<b>Table 2.</b>	Developmental rates and editing efficiency following microinjection or electroporation of parthenote 1-cell stage pig embryos with Cas9/RNP complex targeting the <i>Roasa26 locus</i> (ssRosa26).	<b>103</b>
<b>Table 3.</b>	Developmental rates and editing efficiency following microinjection or electroporation of parthenote 1-cell stage pig embryos with Cas9/RNP complex and PAH template targeting the ssPAH+HDR	<b>108</b>
<b>Table 4.</b>	Developmental rates and editing efficiency for electroporated parthenote pig embryos with ssRosa26+HDR under different conditions	<b>110</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

BIR	Replicação induzida pela ruptura ( <i>break-induced repair</i> )
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat</i>
dHJ	Dupla junção Holliday ( <i>double Holliday junction</i> )
DSB	Quebra de dupla fita ( <i>double strand break</i> )
HDAC	Histona Desacetilase
HDR	Via de Reparo Homóloga ( <i>Homology Directed Repair</i> )
HR	Recombinação Homóloga ( <i>Homologous Recombination</i> )
NHEJ	União de extremidade não-homóloga ( <i>Non-homologous end joining</i> )
PAM	<i>Motif</i> adjacente ao protoespaçador ( <i>protospacer adjacent motif</i> )
PCR	Reação em cadeia de polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
RNP	Ribonucleoproteína
RVD	Di-resíduo de repetição variável ( <i>Repeat Variable Diresidue</i> )
SCNT	Transferência Nuclear de Célula Somática ( <i>Somatic Cell Nuclear Transfer</i> )
SDSA	Anelamento dependente de síntese de cadeias ( <i>synthesis-dependent strand-annealing</i> )
TALEN	<i>Transcription Activator-Like Effector</i>
ZF	<i>Zinc Finger</i>
ZFN	<i>Zinc Finger Nuclease</i>
ZFP	<i>Zinc Finger Protein</i>

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1.</b>	<b>Vias de reparo do DNA</b> .....	<b>23</b>
2.1.1.	Via de recombinação não homóloga (NHEJ) .....	24
2.1.2.	Via de recombinação homóloga (RH) .....	27
<b>2.2.</b>	<b><i>Safe harbor loci</i> (SHL)</b> .....	<b>29</b>
<b>2.3.</b>	<b>Uso de nucleases de edição gênica em animais de produção</b> .....	<b>30</b>
2.3.1.	Zinc finger nucleases (ZFN) .....	32
2.3.2.	Transcription activator-like (TAL) effector nucleases (TALENs) .....	34
2.3.3.	Sistema clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/ CRISPR-associated protein 9 (Cas9), ou sistema CRISPR/Cas9 .....	36
<b>2.4.</b>	<b>Métodos de inserção de transgenes em embriões</b> .....	<b>40</b>
2.4.1.	Micoinjeção de zigotos .....	41
2.4.2.	Clonagem por transferência celular de células somáticas (TNCS) .....	45
2.4.3.	Eletroporação .....	49
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESES E OBJETIVOS</b> .....	<b>53</b>
<b>3.1.</b>	<b>Hipóteses</b> .....	<b>53</b>
<b>3.2.</b>	<b>Objetivos gerais</b> .....	<b>53</b>
<b>3.3.</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>53</b>
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>54</b>
<b>5.</b>	<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>76</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>106</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>107</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>109</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos muitos avanços nas ciências modernas está no campo da biologia molecular. Após as maiores revoluções científicas do século XX, como o desdobramento da estrutura do DNA (Watson e Crick, 1953a), do código genético (Watson e Crick, 1953b) e da tecnologia do DNA recombinante (Cohen *et al.*, 1973), grandes descobertas estão chegando no século XXI, especialmente em biotecnologia e biomedicina. No geral, e mais do que nunca, novas ideias, *insights*, inovações e descobertas ainda são incentivadas com o objetivo de melhorar a qualidade de vida, erradicar doenças biológicas e doenças sociais e promover saúde e bem-estar em um mundo mais igualitário e sustentável (Bertolini *et al.*, 2016).

A fome no mundo está aumentando; aproximadamente 1 bilhão de pessoas são cronicamente desnutridas (Godfray *et al.*, 2010). Os esforços atuais para atender à demanda estão degradando um ambiente já enfraquecido (Foley *et al.*, 2011; Tilmanet *et al.*, 2011). Melhorias na eficiência da produção e na segurança alimentar estão cada vez mais se tornando considerações importantes para a proteção do meio ambiente e na redução do uso da terra (Clark & Whitelaw, 2003). A mudança climática global apenas irá aumentar a falta de produção de proteína animal (McMichael, 2012; Schmidhuber & Tubiello, 2007; Wolkovich *et al.*, 2012).

A revolução verde atingiu praticamente seu pico, de acordo com seu criador, Norman Borlaug (Borlaug, 2000), que afirmou que os animais de fazenda são críticos para a nutrição, e que a engenharia genética dos alimentos será necessária para alimentar o mundo. Tanto o aumento baseado na genética como na gestão da produtividade sustentável

será uma chave para satisfazer as necessidades globais de proteína (Fahrenkrug *et al.*, 2010).

Um termo bastante discutido e com muitos equívocos no nosso dia-a-dia é a definição e diferença entre Organismos Geneticamente Modificados (OGM) e Transgênicos. Um OGM, segundo a legislação brasileira, é todo o organismo que tiver seu DNA modificado por meio de qualquer técnica de Engenharia Genética e tiver fragmentos de DNA/RNA exógeno ou deleção de parte do DNA no produto final. Essa denominação independe da origem do material genético. Transgênicos são organismos que tiveram seu código genético modificado por meio da biotecnologia pela inserção estável de DNA exógeno no genoma receptor, com transmissão Mendeliana à progênie. Dessa forma, todo o transgênico é um OGM, mas nem todo OGM é um transgênico.

Animais geneticamente modificados têm um papel maior do que apenas alimento (Figura 1); estes contribuem para a nossa saúde, servindo como sistemas modelo para o tratamento de doenças e distúrbios, bem como servem de fonte de biomateriais utilizados para a reconstrução de tecidos e órgãos (Kues & Niemann, 2004; Snaith & Törnell, 2002). Os camundongos têm sido historicamente os principais modelos médicos na busca de genes causadores de doenças e no teste de medicamentos. Devido ao seu grande número e à disponibilidade de linhagens consanguíneas que melhoram a repetibilidade dos resultados experimentais, as investigações moleculares e celulares geralmente são conduzidas primeiramente em camundongos. Estudos em camundongos forneceram uma riqueza de informações sobre a base molecular de doenças humanas e permitiram uma série de estudos de provas de princípio. Os murinos, no entanto, nem sempre modelam com precisão a

patologia da doença humana, reduzindo seu valor preditivo para estudos pré-clínicos (Mak *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Múltiplas aplicações do uso da engenharia genética em animais de produção, com o suíno sendo demonstrado como exemplo.

A primeira aplicação seria modificar características dos animais de produção *per se* e seu impacto na produção. Exemplos das características que podem ser melhoradas incluem (1) resistência a doenças, (2) aumento da eficiência nutricional, como a introdução de um gene para produzir ácidos graxos ômega-3 mais saudáveis para substituir os ácidos graxos ômega-6 (Lai *et al.*, 2006), e (3) redução do impacto ambiental das principais instalações de produção de suínos, reduzindo o fósforo nas fezes (Golovan *et al.*, 2001). A segunda aplicação de suínos geneticamente modificados é para produtos biomédicos, como o transplante de órgãos ou partes específicas de órgãos funcionais, como válvulas cardíacas e estruturas subcelulares. Os exemplos incluem genes inativadores, tais como a-1,3-galactose, que produzem respostas imunitárias poderosas quando introduzidos em humanos e eliminam a potencial propagação de retrovírus endógenos porcinos. A terceira aplicação

de suínos geneticamente modificados é a criação de animais que simulam doenças humanas, como a fibrose cística (Rogers *et al.*, 2008), doenças cardiovasculares e câncer.

Os suínos compartilham várias semelhanças importantes com os humanos em termos de tamanho corporal, características anatômicas e fisiológicas, respostas fisiopatológicas e digestivas, sendo utilizados para desenvolver e refinar procedimentos biomédicos e equipamentos médicos (Heinritz *et al.*, 2013; Kararli, 1995; Schubert *et al.*, 2016). O uso dos suínos como modelo na pesquisa biomédica é auxiliado por vários fatores práticos, como as características favoráveis de reprodução, com uma puberdade relativamente precoce (6-7 meses), um curto período de gestação (~114 dias) e boa prolificidade, com 10 leitões ou mais por ninhada, dependendo da raça (Sachs, 1994). Séculos de domesticação estabeleceram condições de alojamento adequadas, incluindo condições livres de patógenos específicos, que requerem apenas pequenas adaptações para a pesquisa. Além disso, como animais de produção, há ampla aceitação pública de seu uso humano, o que não é o caso de outras espécies não-roedoras, como os primatas.

As semelhanças anatômicas, fisiológicas e genéticas entre suínos e humanos são impressionantes, sugerindo que a modelagem de doenças neste animal doméstico pode melhor representar o desenvolvimento e a progressão de várias doenças, como o câncer em humanos (Swindle *et al.*, 2012). Os suínos têm sido amplamente utilizados em muitas áreas da pesquisa biomédica devido a uma alta semelhança nos sistemas orgânicos. Por estas razões, os suínos são comumente utilizados em pesquisas cardiovasculares, onde modelos de aterosclerose, trombose e infarto do miocárdio têm sido aplicados para entender tais condições de saúde/doença em pacientes e para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas e dispositivos médicos (Dixon e Spinale, 2009; Vilahur *et al.*, 2011). A



similaridade no tamanho e na anatomia do sistema cardiovascular de suínos permite o planejamento e o teste de *stents* e a engenharia de tecidos dos vasos sanguíneos, por exemplo (Bedoya *et al.*, 2006; Gyongyosi *et al.*, 2006). Além disto, estudos abrangentes dos sistemas cutâneo, urinário, tegumentar e digestivo demonstram extensas semelhanças com os seres humanos (Swindle *et al.*, 2012).

O alcance das tecnologias de edição gênica em suínos tem aumentado grandemente o valor da espécie na biomedicina, motivando esforços para a produção de modelos suínos para doenças humanas. Desta forma, o desenvolvimento de estudos visando o aumento da eficiência de procedimentos que envolvam a manipulação genética e a geração de embriões geneticamente modificados se torna chave e premente para podermos *diminuir a distância entre a bancada do laboratório e a cabeceira do leito de hospital* (Perleberg *et al.*, 2018).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

É notório que as novas abordagens no campo da engenharia genética que surgiram nos últimos cinco ou dez anos revolucionaram a engenharia genética em animais de produção. Embora passos gigantescos tenham sido dados com respeito à geração de animais de produção geneticamente modificados, ainda estamos longe de uma situação ideal, uma vez que a maioria dos eventos no processo de modificações genéticas precisas ainda não podem ser completamente controlados.

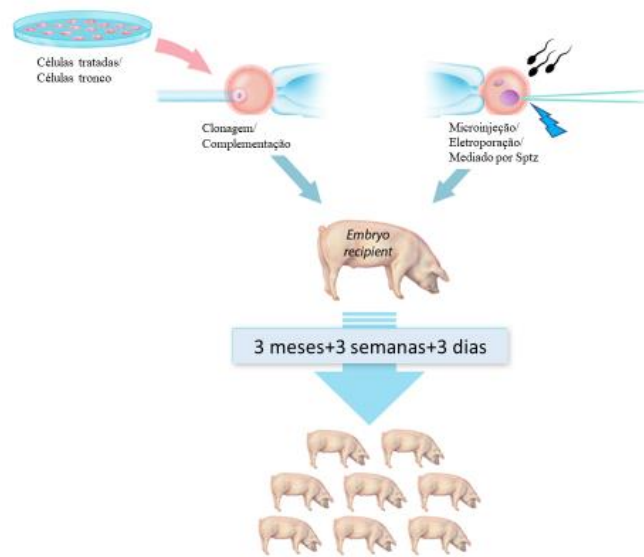
Desde a produção do primeiro camundongo transgênico no início dos anos 1980 (Gordon *et al.*, 1980; Brinster *et al.*, 1981; Constantini & Lacy, 1981; Gordon & Ruddle, 1981), a microinjeção pró-nuclear tem sido a ferramenta de escolha para a inserção de uma sequência de DNA exógena ou transgene em embriões, transpondo-se fisicamente a zona pelúcida. Antes disso, as pequenas dimensões e a precariedade das ferramentas em biologia molecular tornavam muito difícil a produção de animais transgênicos. Foi a produção de camundongos transgênicos para a expressão de gene promotor de crescimento (Palmiter *et al.*, 1982) que estimulou o uso da tecnologia em animais de produção, com estes autores pioneiros vislumbrando a possibilidade de aplicação desta estratégia para a melhoria de características de produção destes animais, assim como para a utilização como modelos biorreatores para a produção de proteínas recombinantes.

A primeira tecnologia empregada para a geração de animais de produção transgênicos também empregou a microinjeção pró-nuclear de DNA, com o nascimento de coelhos, ovinos e suínos transgênicos para a expressão do hormônio do crescimento (Hammer *et al.*, 1985). Embora esta técnica tenha sido usada com sucesso para camundongos, esta não se mostrou eficiente e sustentável em animais de grande porte

devido à baixa eficiência de integração do transgene, o que elevava os custos para a geração de fundadores, pela necessidade de produção de muitos descendentes com baixa taxa de transgenia (Galli *et al.*, 2012). Apesar da ineficiência da tecnologia de microinjeção pró-nuclear, muitos animais de fazenda transgênicos foram gerados nas décadas subsequentes por meio desta técnica (Baldassarre *et al.*, 2003; Murray *et al.*, 1989; Uchida *et al.*, 2001).

Desde então, várias tecnologias foram desenvolvidas para a geração de animais transgênicos. Algumas vezes surgiram tecnologias inteiramente novas, aparentemente substituindo uma técnica anteriormente estabelecida. Por outro lado, algumas alterações em técnicas anteriores acabaram trazendo-as novamente para a vanguarda (Laible, 2018). No entanto, a maioria das tecnologias desenvolvidas para a produção de animais geneticamente modificados ainda estão em uso, após refinamentos ou modificações, por vezes combinadas, levando a uma aplicação mais eficiente de biotécnicas ditas *antigas*. Cada procedimento utilizado oferece um conjunto exclusivo de vantagens e desvantagens. Assim, a escolha da técnica dependerá das especificidades da aplicação, e não menos importante, da espécie animal a ser empregada para uso em engenharia genética.

Geralmente, as tecnologias aplicadas à engenharia genética podem ser divididas naquelas mediadas por embriões, e nas mediadas por células. A primeira estratégia aborda a modificação genética diretamente em embriões em estádios de pré-implantação (microinjeção, eletroporação, lipofecção, mediada por espermatozoide ou por partículas virais), enquanto que, no segundo caso, a informação genética é introduzida em células em cultivo, para serem posteriormente utilizadas para a geração de um animal pela reconstrução de embriões, tanto pela clonagem por transferência nuclear quanto por complementação tetraploide (Figura 2).



**Figura 2.** Estratégias para a produção de animais transgênicos, baseadas na manipulação de células e de embriões. Adaptado de Tan *et al.* (2012)

O nascimento da ovelha Dolly produzida nos meados dos anos 1990 por meio da clonagem por transferência nuclear de célula somática (TNCS) abriu um novo horizonte para a produção de animais geneticamente modificados, como o caso das pioneiras Polly e Molly (Schnieke *et al.*, 1997), ovelhas clones transgênicas produtoras de Fator IX humano, produzidas pelo mesmo grupo de pesquisadores que produziu a Dolly. Até o momento, esta técnica permanece entre as opções de ponta para a transgenia em animais de produção (Bertolini *et al.*, 2016). A modificação genética, incluindo a moderna estratégia da edição gênica, é realizada em cultivo celular, com posterior seleção de colônias de células que sofreram a modificação genética desejada, quer seja pela deleção de sequências genômicas, que seja pela integração do DNA de interesse no genoma hospedeiro (Galli *et al.*, 2012; Bertolini *et al.*, 2016). Este processo é seguido pela triagem molecular de colônias

selecionadas, o que permite a determinação do genótipo e possíveis polimorfismos, do número de cópias e da localização cromossômica do DNA exógeno no genoma do hospedeiro (Kong *et al.*, 2014). As vantagens da clonagem por TNCS para o desenvolvimento de animais geneticamente modificados dependem exatamente dos atributos relacionados à conveniência de se produzirem embriões clonados modificados geneticamente, com a caracterização molecular mais precisa das linhagens celulares, quando comparados a vetores de microinjeção pró-nuclear ou lentivirais, por exemplo, que podem levar à produção de animais com variável grau de mosaicismo.

Embora a clonagem por TNCS seja uma técnica viável para o desenvolvimento de animais geneticamente modificados, outros problemas precisam ser enfrentados, uma vez que geralmente cultivos primários de fibroblastos são as células de eleição para serem geneticamente modificadas e utilizadas como núcleo doador na clonagem. Tais células somáticas primárias têm uma vida útil limitada, que geralmente é reduzida pela seleção de colônias e triagem após as modificações genéticas, que comumente dificultam o aproveitamento destas como doadores de núcleo para a clonagem (Laible & Alonso, 2009; Galli *et al.*, 2012). Apesar dos problemas, ao se utilizar a técnica de clonagem, a eficiência da geração de animais modificados/transgênicos funcionais é aumentada, principalmente quando comparada à microinjeção pró-nuclear de embriões (Clark & Whitelaw, 2003). Enquanto a eficiência em gerar animais geneticamente modificados por microinjeção pró-nuclear permanece baixa, o uso da clonagem por TNCS permite a manipulação e a caracterização das células modificadas geneticamente previamente à clonagem, proporcionando o nascimento somente de animais com o genótipo desejado e com o sexo

definido (Clark & Whitelaw, 2003), apesar de haver ainda uma baixa eficiência no processo de clonagem *per se* (Keefer, 2015).

Grandes passos já foram dados na geração de animais transgênicos nestas últimas décadas. No entanto, várias etapas do processo de transgenia ainda não podem ser totalmente controladas. Por tal razão, pesquisas na área persistem e novas abordagens vão sendo progressivamente desenvolvidas, com o objetivo de inserir um transgene em locais específicos do genoma, e melhorando o processo de recombinação homóloga em animais de produção. A inserção de um cassete transgênico em locais específicos do genoma de animais de produção depende da ocorrência de uma quebra dupla na fita de DNA (*double strand break*, DSB) e do processo de recombinação homóloga para a correção de danos no DNA, a qual é uma via fidedigna de reparação de DNA, isenta de erros. Atualmente, para o desenvolvimento de uma DSB de forma precisa no genoma, estão disponíveis algumas ferramentas de engenharia genética, como as nucleases para edição do genoma, o que abriu caminho para a melhoria do processo de engenharia genética e transgenia. Desta forma, com o recente desenvolvimento de nucleases de edição gênica, tais como as *Zinc Fingers* (ZFN), as *Transcription Activator-Like Effector* (TALEN) e mais recentemente as *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat* (CRISPR)/CRISPR-associada à proteína Cas9 (CRISPR/Cas9), a qual já se mostrou eficiente para a edição gênica, houve um salto significativo na eficiência não apenas de animais transgênicos, mas também para outros propósitos como a terapia celular e gênica (Ceasar *et al.*, 2016). Com o estabelecimento destas novas ferramentas, a microinjeção ressurgiu naturalmente como um procedimento útil para a produção de animais geneticamente modificados, devido à simplicidade e agilidade necessárias para a injeção de zigotos, além da alta eficiência para a

edição gênica. De importância, pode-se construir tais sistemas para a indução de DSBs virtualmente em qualquer local do genoma, com a escolha do local de integração de um transgene sendo muitas vezes de grande relevância para a geração de animais transgênicos.

## **2.1. Vias de reparo do DNA**

As quebras de fita dupla (DSBs) de DNA estão entre os tipos biologicamente mais perigosos de danos ao DNA. Por exemplo, um único DSB não reparado é muitas vezes suficiente para causar a morte celular. Além disto, o reparo impreciso pode levar a deleções ou aberrações cromossômicas, eventos associados ao desenvolvimento de câncer ou outras síndromes de instabilidade genômica. Assim, o reparo de DSBs é crítico para a sobrevivência celular e manutenção da integridade do genoma (Khanna & Jackson, 2001; Van Gent *et al.*, 2001). A fim de manter a integridade e sobrevivência do genoma, as células expressam constantemente componentes bioquímicos para o reconhecimento e reparo das DSBs. Estes mecanismos de reparo podem ser recrutados para edição de genes pela indução de DSBs artificiais e direcionados em regiões de interesse usando nucleases programáveis específicas para determinadas sequências. Estas alterações induzidas podem ser desde a simples exclusão de um ou alguns pares de base, até a inserção de um cassete transgênico responsável pela produção de uma substância exógena como proteínas recombinantes no leite (Bertolini *et al.*, 2016).

Os dois principais mecanismos pelos quais as células mamíferas reparam os DSBs são a recombinação homóloga (HR) e a junção terminal não homóloga (NHEJ). Estes dois sistemas de reparo diferem em sua necessidade de um DNA modelo homólogo e na fidelidade do reparo de DSB. O reparo dirigido pela HR é, em grande parte, um mecanismo

livre de erros, pois utiliza como modelo a informação genética contida na cromátide-irmã não danificada (Li & Heyer, 2008). Em contraste, o NHEJ é normalmente propenso a erros e promove a eliminação de DSBs pela ligação direta das extremidades quebradas, podendo remover ou adicionar bases, causando mutações (Lieber, 2010). O NHEJ é a via de reparo mais frequente nas células de mamíferos operando em todas as fases do ciclo celular, enquanto a HR é restrita às fases tardia S e G2. Os mecanismos básicos destas vias e os fatores envolvidos são resumidos abaixo.

### *2.1.1. Via de recombinação não homóloga (NHEJ)*

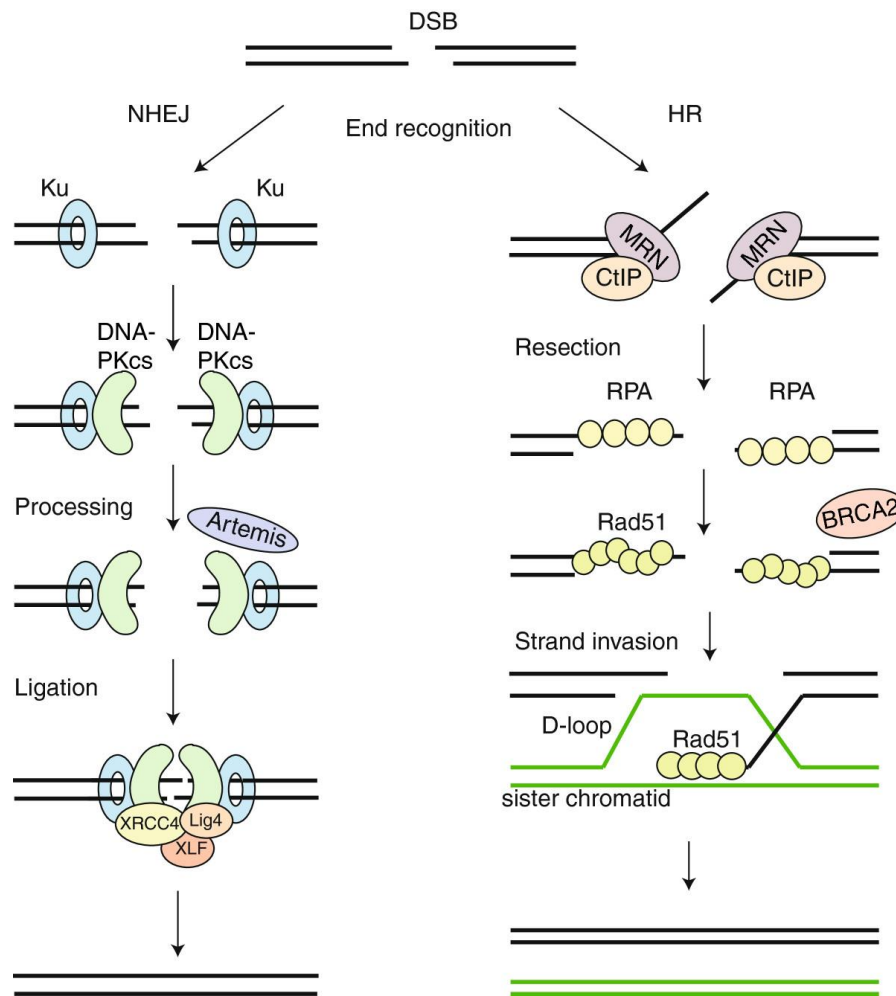
O NHEJ clássico (c-NHEJ) tem o potencial de ligar qualquer tipo de extremidade de DSB sem a necessidade de uma sequência homóloga, ao contrário da HR, o que faz com que o NHEJ seja considerado a mais poderosa e frequente via de reparo de DSBs (Pardo *et al.*, 2009). Para realizar as reações necessárias para o reparo, a maquinaria do NHEJ conta com muitos fatores proteicos que carregam funções de estabilização estrutural, bem como funções de degradação do DNA, polimerização e ligação. Todas as reações de NHEJ requerem o núcleo do maquinário NHEJ que é composto de três complexos proteicos (MR(X)N, KU e os complexos DNA ligases), potencialmente ocorrendo ao longo do ciclo celular, com efeito dominante durante as fases G0/G1 e G2 (Chiruvella *et al.*, 2013; Karanam *et al.*, 2012; Pardo *et al.*, 2009).

Uma vez que ocorra uma DSB, o complexo proteico KU (KU70/KU80) se liga rapidamente às extremidades livres do DNA, protegendo-as da degradação aleatória, que também recruta as proteínas a jusante para o local de reparo. Aparentemente, enquanto a proteína PAXX se liga a KU, estabilizando a maquinaria do NHEJ na cromatina danificada



(Ochi *et al.*, 2015), o complexo Artemis DNA PKcs atua como uma nuclease, abrigando diferentes atividades endonucleolíticas (Lieber, 2010). As polimerases da família Pol X realizam a polimerização durante o NHEJ, com ligação da quebra de DNA sendo catalisada pelo complexo DNA ligase IV-XRCC4-XLF (Davis & Chen, 2013). A Figura 3 ilustra o mecanismo da via NHEJ de reparo de DNA.

O NHEJ tem sido frequentemente considerado uma via de reparo de DSB ilegítima, propensa a erros, uma vez que geralmente causa inserções e deleções de poucas bases (*indels*), resultando em erros (Lieber, 2010). Por ser propensa a erros, essa via é eficaz para estratégias envolvendo a introdução de pequenas mutações ou *indels* aleatórios, o que é necessário, por exemplo, para a ruptura de alelos funcionais para promover o *knock-out* genético. Mutações causadas pelo reparo do DNA pela via NHEJ são a base para a existência de polimorfismos genômicos, como os *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs), que são úteis em diagnóstico em biologia molecular e na seleção assistida por marcadores (*marker-assisted selection*, MAS), por exemplo, entre outras aplicações (Lopes *et al.*, 2016).



**Figura 3.** Vias HR e NHEJ de reparo de DNA. A ativação da via NHEJ inicia com o reconhecimento das extremidades abertas de DNA (DSBs) pelo heterodímero Ku70/80, o qual recruta as DNA-PKcs. Caso as extremidades sejam incompatíveis, nucleases como a Artemis, podem aparar as extremidades. O complexo XRCC4-DNA Ligase 4 e o complexo de ligação XLF consolidam a ligação da quebra de DNA. Já na via HR, o complexo MRN-CtIP inicia a ressecção nas quebras de DNA para gerar DNA de fita simples (ssDNA). Após a ressecção, a DSB não poderá ser mais reparada pela via NHEJ. O ssDNA é primeiramente revestido por RPA, que é subsequentemente substituído por Rad51 com a ajuda da BRCA2. Estes filamentos de nucleoproteína Rad51 mediam a invasão da cadeia no molde homólogo. A extensão do *D-loop* e a captura do segundo terminal levam à finalização do reparo. Adaptado de Brandsma & Gent, 2012.

### 2.1.2. Via de recombinação homóloga (RH)

A recombinação homóloga (HR) é uma via chave de reparo do DNA para manter a integridade genômica, sendo ativa durante as fases S e G2, que envolvem a replicação do DNA e seus *checkpoints*, o que permite uma fidelidade no reparo de alguma DSB presente nos cromossomas em replicação. A via HR, ilustrada na Figura 3, pode ser conceitualmente dividida em três estágios: pré-sinapse, sinapse e pós-sinapse. Na pré-sinapse, o dano ao DNA é processado para formar uma região estendida de ssDNA, que é ligada pela proteína de ligação ao DNA de cadeia simples RPA. Para a DSB, esta etapa envolve um complexo de quatro nucleases (MRX(N), Exo1, Dna2, Sae2 / CtIP) e a helicase Sgs/BLM (Mimitou & Symington, 2009). A ligação da RPA elimina estruturas secundárias em ssDNA, o que é necessário para a montagem de filamentos Rad51 competentes (Heyer *et al.*, 2010). Durante a sinapse, o filamento Rad51 realiza pesquisa de homologia e invasão da cadeia de DNA, gerando um *D-loop* onde a cadeia invasora inicia a síntese de DNA. A proteína Rad54 é necessária para estabilizar o filamento Rad51, aumentando a formação de *D-loop* pela Rad51. Além disso, a proteína Rad54 é necessária para a transição da invasão da cadeia de DNA para a síntese de DNA pela dissociação de Rad51 do DNA heteroduplex (Heyer *et al.*, 2006). Na pós-sinapse, três sub-vias de HR podem ser distinguidas, cada uma com requisitos enzimáticos específicos. Uma delas é a replicação induzida pela ruptura (BIR), em que, na ausência de uma segunda extremidade, a *D-loop* se torna uma bifurcação de replicação completa, restaurando a integridade do cromossomo. Na presença de uma segunda extremidade, a via predominante para a reparação de DSB em células somáticas parece ser o anelamento dependente de síntese de cadeias (SDSA), onde o *D-loop* estendido é invertido, levando ao anelamento da fita recém-sintetizada com a segunda extremidade da

fita recortada. Esta via SDSA evita *crossovers*, o que reduz o potencial de rearranjos genômicos.

A outra via de resolução de reparo no processo pós-sináptico é a dupla junção *Holliday* (dHJ), que gera cruzamentos, principalmente com o propósito de recombinação meiótica. A formação de dHJ envolve a captura da segunda extremidade, um processo que foi demonstrado *in vitro* com o bloqueio pela Rad51, o que sugere uma tendência mecanicista inerente em relação a SDSA (Wu *et al.*, 2008). O dHJ pode ser resolvido por endonucleases em produtos cruzados ou não cruzados e, alternativamente, pode ser dissolvido por um mecanismo complexo envolvendo Sg1/BLM, topoisomerase 3 e cofatores. Então, as duas junções são migradas uma para a outra, levando a um hemi-catenano que é eliminado pela Topo3. Geneticamente, o ponto final da dissolução é sempre um não-*crossover*, evitando o potencial de rearranjos associados com *crossovers* (Heyer *et al.*, 2010).

Os sistemas de edição gênica ZFNs, TALENs e CRISPR/Cas9, como discutido, também podem mediar eventos de HDR, por meio dos quais genes de interesse podem ser conduzidos para locais-alvo e inseridos, uma estratégia prática para a geração precisa de animais transgênicos, quando uma cópia molde de reparo é introduzido no momento do reparo. Além disto, o HDR também permite a mutação precisa de nucleotídeos, únicos ou poucos, o que é necessário para a geração de modelos animais para doenças humanas. No entanto, em eucariotos superiores, a via de reparo NHEJ é geralmente de 1.000 a 10.000 mais frequente do que a via HR (Smith, 2001), o que torna o processo de engenharia genética preciso mais difícil de ser alcançado. Devido a isto, grupos de pesquisa em todo o

mundo têm trabalhado no desenvolvimento de novas estratégias para melhorar a HDR em muitas espécies de mamíferos.

## **2.2. *Safe harbor loci* (SHL)**

Tradicionalmente, animais transgênicos têm sido produzidos por meio da integração de um transgene no genoma hospedeiro de uma maneira aleatória. Assim, a integração e a ação do transgene são limitadas pela interação entre o DNA recém integrado e o genoma hospedeiro. Portanto, um fator importante para a inserção e expressão eficiente de transgenes é a exigência de um *locus* genômico que leve a um processo mais seguro e eficiente, permitindo a integração e expressão dos genes, sem alterar a função genética interna (Sadelain *et al.*, 2012; Ruan *et al.*, 2015). Quando inseridos aleatoriamente, os genes são submetidos a efeitos de posição, gerando fenótipos instáveis e ao silenciamento gênico, o que torna sua expressão pouco confiável e imprevisível (Phelps, 2003). Apesar de não estar completamente elucidada a questão de introduzir um transgene em um genoma hospedeiro em um ponto específico para maximizar a segurança e eficácia, alguns sítios genômicos pré-determinados, conhecidos como *safe harbor loci* (SHL), apresentam-se como uma alternativa para a circunvenção destes problemas. Os SHL são definidos como locais onde o DNA exógeno pode ser direcionado de forma relativamente fácil por meio de recombinação homóloga, garantindo a devida expressão dos transcritos, sem que o transgene sofra o silenciamento gênico (Irion *et al.*, 2007).

Até o momento, o *locus* mais utilizado em mamíferos para o direcionamento de transgenes é o ROSA26, com muitos estudos estabelecidos com células-tronco embrionárias de camundongo (Casola, 2010), ratos (Kobayashi *et al.*, 2012) e humanos

(Irion *et al.*, 2007). A sequência ortóloga do ROSA26 de camundongo também foi descrita em suínos (Kong *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014), bovinos (Tan *et al.*, 2013) e caprinos (Tavares *et al.*, 2016).

### **2.3. Uso de nucleases de edição gênica em animais de produção**

Modificações genéticas começam com a criação de uma DSB no DNA, onde a sequência de DNA exógeno poderá ser inserida por meio de vias endógenas celulares de reparo de DNA. Portanto, a eficiência de uma modificação genética direcionada pode ser significativamente aumentada pela criação de um DSB em um sítio específico no genoma (Rouet *et al.*, 1994). Ferramentas de edição de genoma normalmente consistem estruturalmente em um domínio de ligação ao DNA e um domínio de clivagem da dupla fita, que pode ser projetado para se ligar a praticamente qualquer sequência de DNA no genoma. Ao selecionarem-se diferentes vias de reparo do DNA, pode-se obter o *knockout* ou deleção de uma sequência endógena ou gene, ou a inserção dirigida de um transgene.

A RH é uma via de reparo endógeno do DNA que atua de forma menos frequente nas células, possuindo várias aplicações técnicas, incluindo estudos de mecanismos básicos de desenvolvimento e fisiologia de mamíferos, até a produção de animais transgênicos com o objetivo de xenotransplantes, para modelos de doenças humanas, terapia gênica ou simplesmente para o aumento do potencial produtivo dos animais (Ran *et al.*, 2013; Joanna *et al.*, 2018). Em células-tronco embrionárias, a RH pode ser estimulada utilizando uma abordagem de seleção positiva-negativa baseada na presença de um cassete de seleção com antibiótico dentro da região homóloga desejada, o que conferirá resistência contra um antibiótico, permitindo a seleção de células modificadas (Shy *et al.*, 2016). Utilizando uma

abordagem sem promotor, o cassete de resistência tem de ser introduzido por um promotor ativo endógeno. Esta abordagem reduz significativamente a presença de colônias falso positivas (Shy *et al.*, 2016). A eficiência geral utilizando este tipo de técnica não ultrapassa a  $10^{-6}$  eventos de HR. Em contraste, vários estudos mostraram ocorrência de RH entre 1 a 18% em células, quando a inserção no sítio genômico foi realizada a partir de uma fita dupla, por endonucleases de edição (Choulika *et al.*, 1995; Donoho *et al.*, 1998; Epinat *et al.*, 2003; Vasquez *et al.*, 2001; Szczepek *et al.*, 2007).

As meganucleases foram as primeiras ferramentas de edição gênica a serem descobertas e utilizadas para realizar um corte em local específico do DNA (Rouet *et al.*, 1994). Com o descobrimento de que a indução de uma DSB aumenta significativamente a ocorrência da via de reparo homóloga (*homology directed repair*, HDR), nucleases de edição se tornaram a ferramenta de escolha para aumentar a frequência de HDR nas alterações gênicas sítio-dirigidas (Petersen, 2018).

Através da introdução de nucleases juntamente com um plasmídeo doador, flanqueados por braços homólogos sítio-específicos, mutações simples ou múltiplas podem ser inseridas em basicamente qualquer *locus* do genoma. Nos últimos anos, novas ferramentas de edição gênica foram descobertas, com uma precisão de cortar o DNA em um local específico sem precedentes, de maneira direta e eficiente. Estas novas nucleases de edição incluem as *Zinc Fingers*, *Transcription Activator-like Effector Endonucleases* (TALEN), e mais recentemente, editores gênicos programados por meio do RNA (CRISPR/Cas9).

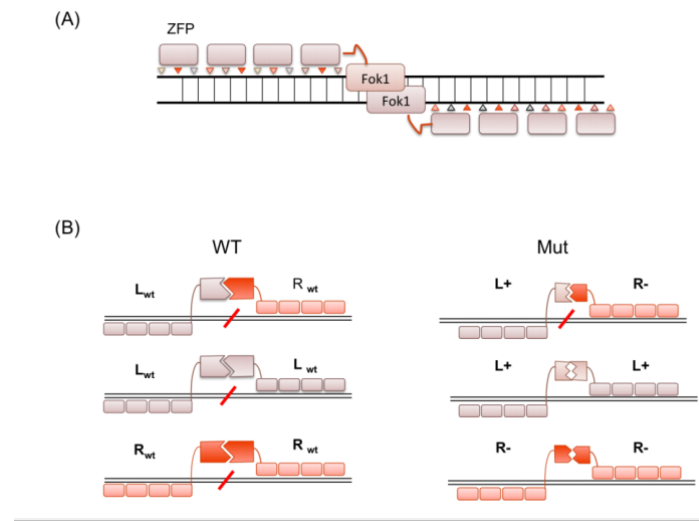
### 2.3.1. Zinc finger nucleases (ZFN)

*Zinc Finger* nucleases (ZFN) foram a primeira tecnologia desenvolvida que utiliza a estratégia de ancoragem de domínios catalíticos de endonucleases a proteínas modulares de ligação ao DNA, para induzir uma DSB sítio-dirigida a um *locus* específico. As ZFNs são proteínas quiméricas que combinam *zinc finger proteins* (ZFP) com endonucleases, geralmente o domínio de clivagem da enzima de restrição *FokI* (Kim & Kim, 2014). Especificamente, as ZFNs são domínios artificiais projetados por domínios 3'-5' Cys<sub>2</sub>-Hys<sub>2</sub> ZFN fundidos ao domínio catalítico da *Fok1*, uma endonuclease de bactéria do tipo II S (Delacôte *et al.*, 2011). Cada domínio de ZFN se liga especificamente ao DNA pelo reconhecimento de tripletos de nucleotídeos; a combinação de diferentes domínios de ZFN reconhece uma sequência de DNA mais longa que depende do número de *Zinc Fingers* (Figura 4A). Portanto, dois domínios ZFNs devem ser projetados; cada ZFN deve ter como alvo uma sequência de DNA que é separada por uma sequência curta do local de reconhecimento das outras ZFNs de um modo pareado (Figura 4). Sua atividade *off target* também foi relatada (Gabriel *et al.*, 2011; Pattanayak *et al.*, 2011). No entanto, estes foram quase superados pela mistura de diferentes domínios *Fok1* que são forçados a formar heterodímeros. Nestas ZFNs otimizadas, a única maneira de criar um DBS é quando os dois domínios ZFNs diferentes se ligam ao local de DNA alvo-específico (Miller *et al.*, 2007; Doyon *et al.*, 2011; Figura 4B). Embora existam algumas bibliotecas de código aberto para o projeto, a engenharia para a construção de ZFNs continua difícil.

As ZFNs constituem uma ferramenta eficaz para realizar o silenciamento gênico (knockout) por meio da via NHEJ, ou então por HR, para corrigir genes defeituosos no genoma ou para introduzir sequências de DNA ou cassetes gênicos, nos locais de quebra



dupla no DNA (Durai *et al.*, 2005; Carroll, 2011). As ZFNs podem ser introduzidas em células ou embriões, como construções de DNA ou RNA, ou ainda como proteínas, por meio de microinjeção, transdução, transfecção ou eletroporação (Harrison *et al.*, 2014).

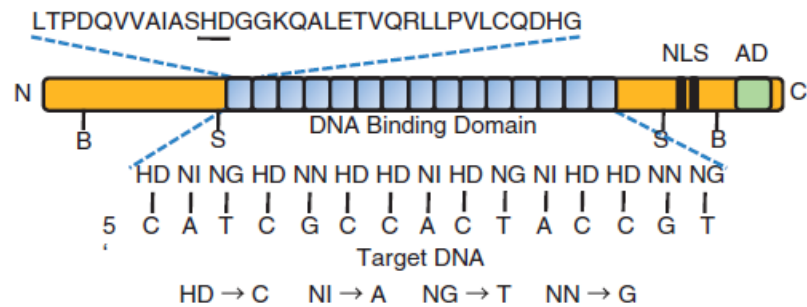


**Figura 4.** Nucleases Zinc Fingers A) Esquema das ZFNs. São formados por duas subunidades, os domínios de ligação que formam homologia por grupos de 3 nucleotídeos, e o domínio de clivagem formado pela nuclease de *Fok1*. B) Esquema dos dois braços que formam as ZFNs (esquerda-L e direita-R) com a endonuclease *Fok1* (polígonos). O esquema à esquerda mostra a *Fok1* wt (polígonos auto-complementares) que produzem clivagem (linha inclinada vermelha) em todas as combinações diferentes (heterodímero, topo, e homodímeros, centro e inferior). O esquema da direita mostra a modificação da endonuclease *Fok1* (polígonos complementares) e suas diferentes combinações, onde somente quando dois braços diferentes (heterodímeros) estão presentes, a clivagem ocorre (linha inclinada vermelha) e quando os braços são os mesmos (homodímero), não ocorre clivagem (centro e inferior). Modificada de Miller *et al.*, 2007.

### 2.3.2. *Transcription activator-like (TAL) effector nucleases (TALENs)*

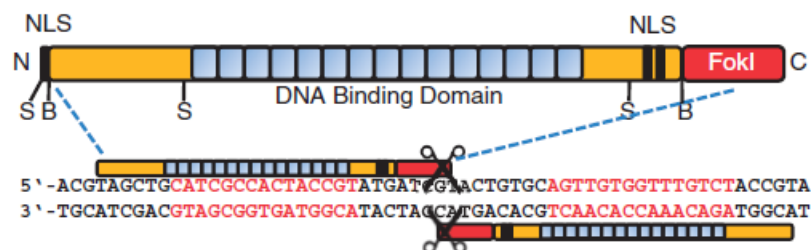
Na natureza, TALs são produzidas por bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas sp.*, com função natural de modular diretamente a expressão gênica do hospedeiro. Após a entrega nas células hospedeiras através do sistema de secreção do tipo III bacteriano, os efetores de TAL entram no núcleo, ligam-se a sequências específicas efectoras nos promotores do gene hospedeiro e ativam a transcrição (Bogdanove *et al.*, 2010).

A especificidade do alvo das TALs é determinada por um domínio central de 33 a 35 repetições de aminoácidos em série, seguido por uma única repetição truncada de 20 aminoácidos (Cermak *et al.*, 2011). A maioria dos efetores TAL que ocorrem se apresentam entre 12 e 27 repetições completas (Boch *et al.*, 2009). Existe um par polimórfico de resíduos adjacentes nas posições 12 e 13 em cada repetição, denominado di-resíduo de repetição variável (RVD) que especifica o alvo de um RVD para um nucleotídeo, e os quatro RVDs mais comuns preferencialmente associados a uma das quatro bases (Moscou & Bogdanove, 2009; Boch *et al.*, 2009), como mostrado na Figura 5. Naturalmente, os locais de reconhecimento de efetores da TAL são uniformemente precedidos por um T que é necessário para a atividade da TAL. Esta especificidade permite a predição dos locais de ligação efetores TAL e o desenho e construção de domínios de TAL para ligar sequências de DNA de interesse (Christian *et al.*, 2010).



**Figura 5.** Estrutura de um efetor TAL que ocorre naturalmente. Uma sequência de repetição consensual é mostrada com o di-resíduo de variável repetida (RVD) sublinhado. A sequência de RVDs determina a sequência nucleotídica alvo. Os quatro RVDs mais comuns são mostrados com seus nucleotídeos mais frequentemente associados. Adaptado de Cermak *et al.* (2011).

Como uma ferramenta de edição de DNA, os efetores TAL são fundidos ao domínio catalítico da nuclease *FokI* para criar DSBs no DNA alvo, para edição do genoma (Christian *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2011). As nucleases efetoras TAL (TALENs) funcionam em pares ligando alvos opostos através de um espaçador sobre o qual os domínios *FokI* se juntam, trabalhando como um dímero, para clivar e criar o DSB no DNA (Cermak *et al.*, 2011), como mostrado na Figura 6.

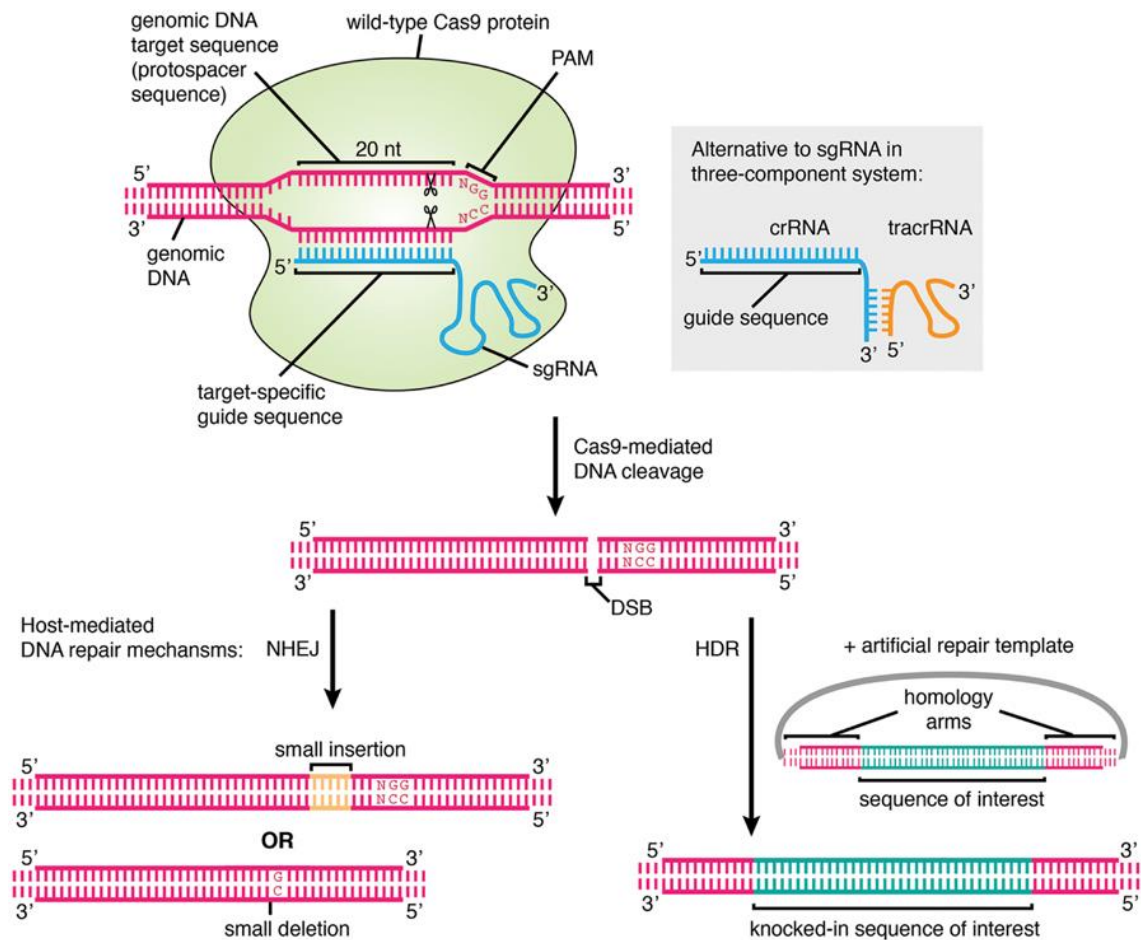


**Figure 6.** Estrutura de uma TALEN. São necessários duas TALENs monoméricas para se ligarem ao local alvo para permitir que a *FokI* dimerize e clive o DNA. Adaptado de Cermak *et al.* (2011).

Quando comparadas com as ZFNs, as TALENs mostram mais especificidade e também são mais fáceis de projetar e construir. Devido a isso, essa ferramenta tem sido utilizada com sucesso para edição de genoma de animais de criação, como suínos (Carlson *et al.*, 2012), bovinos (Carlson *et al.*, 2012; Proudfoot *et al.*, 2015), ovinos (Proudfoot *et al.*, 2015) e caprinos (Cui *et al.*, 2015). No entanto, esta ferramenta vem perdendo espaço para o sistema CRISPR/ Cas9, descrito abaixo.

### 2.3.3. Sistema clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/ CRISPR-associated protein 9 (Cas9), ou sistema CRISPR/Cas9

O sistema CRISPR/Cas9 é um sistema imune adaptativo usado por bactérias para proteção contra vírus invasores e plasmídeos através da clivagem sequencial de ácidos nucleicos estranhos à célula (Doudna & Charpentier 2014; Hsu *et al.*, 2013). Tal característica, que foi aproveitada para edição gênica, consiste de em um RNA guia único (sgRNA) de 20 nucleotídeos que sofre pareamento de bases de Watson-Crick com uma sequência de DNA alvo precedendo um *motif* adjacente ao protoespaçador NGG (sequência PAM, onde N é qualquer uma das quatro bases de DNA), conjugado com uma endonuclease, a Cas9, que realiza uma quebra de fita dupla de DNA após o sgRNA (RNA de fita simples - *single guide RNA*) se ligar à sequência de DNA alvo (Jinek *et al.*, 2012; Cong *et al.*, 2013). Ao contrário das ZFNs ou TALENs, que exigem uma proteína para direcionar um *locus* de DNA específico, o sistema CRISPR-Cas9 requer apenas a definição de um sgRNA de 20 nucleotídeos, que determina o local da clivagem do DNA.



**Figura 7.** Estrutura e mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas9. Adaptado de Agrotis & Kettler, 2015.

O mecanismo de edição do genoma usando CRISPR/Cas9 está ilustrado na Figura 7. O alvo de DNA genômico, que deve estar adjacente a um *motif* adjacente ao protoespaçador (PAM), é determinado pelo usuário/pesquisador utilizando uma sequência guia de 20 nucleotídeos por meio de sgRNA ou crRNA. Uma vez que um espaçador é incorporado e o vírus ataca novamente, uma parte do CRISPR é transcrita e processada em CRISPR RNA, ou “crRNA”. A sequência de nucleotídeos do CRISPR atua como um modelo para produzir uma sequência complementar de RNA de cadeia simples. Cada crRNA consiste em uma repetição de nucleotídeos e uma porção espaçadora. O PAM do

*Streptococcus pyogenes* é apresentado na figura. No núcleo da célula, a proteína Cas9 A proteína normalmente se liga a duas moléculas de RNA: crRNA e outro chamado tracrRNA (ou “crRNA de trans-ativação”). Os dois, em seguida, guiam o Cas9 para o site alvo, onde ele fará seu corte. Esta extensão de DNA é complementar a um estiramento de 20 nucleótidos do crRNA, clivando ambas as fitas do DNA, três nucleotídeos *upstream* ao PAM (Doudna & Charpentier, 2014). A clivagem resulta em uma DSB que é reparada por mecanismos de reparo de DNA mediados pelo hospedeiro. Na ausência de um modelo de reparo, a via de reparação não homóloga (NHEJ) propensa a erros se torna a via de eleição natural, o que pode levar à formação de inserções e/ou deleções (*indels*) curtos aleatórios e, assim, mudar a estrutura das mutações e interromper a função do gene, e isso representa o principal método de geração de *knockout* de genes mediado por CRISPRs. Se for fornecido um modelo de reparação artificial, por exemplo um plasmídeo contendo uma sequência de interesse flanqueada por braços de homologia, então pode ocorrer o reparo por via de recombinação homóloga (HDR), levando à introdução de uma sequência de DNA exógena em uma localização do genoma específica. Esta é a base para a realização de inserções genéticas, marcação e inserções ou deleções pré-especificadas precisas utilizando o sistema CRISPR/Cas9. Se a Cas9 cataliticamente inativa for utilizada em substituição à Cas9 *wild type*, então a proteína simplesmente se liga ao *locus* alvo e não cliva o DNA, o que pode ser utilizado para o bloqueio de expressão gênica, por exemplo (Agrotis & Kettler, 2015).

#### 2.3.3.1 Complexos ribonucleoproteicos (RNP)

O uso das CRISPRs proporcionou um aumento gigantesco na capacidade dos cientistas em produzir alterações genômicas precisas, provocando uma revolução na

engenharia genética, com novas técnicas sendo desenvolvidas rapidamente. Conforme já discutido, para a utilização de CRISPRs, são necessários, no mínimo, dois componentes: a proteína Cas9 e o RNA guia (gRNA) direcionando para o local de interesse no genoma. Uma alternativa recentemente abordada é a utilização de complexos ribonucleoproteicos (RNP).

Cas9 RNPs consistem em proteína Cas9 purificada conjugada com um gRNA. Estes são construídos *in vitro* e podem ser introduzidos diretamente às células utilizando técnicas padrão, como a microinjeção, a eletroporação ou a transfecção. As RNPs Cas9 são capazes de clivar alvos genômicos com eficiência semelhante ao Cas9/gRNA baseada em plasmídeos e podem ser utilizadas para a maioria das aplicações atuais de engenharia de genoma com CRISPRs, incluindo a geração de *knockouts* únicos ou multigênicos em uma ampla variedade de tipos de células, edição de genes usando reparo dirigido por homologia (HDR), e gerando grandes deleções genômicas (Dewitt *et al.*, 2017).

Os Cas9 RNPs diferem da integração baseada em plasmídeo ou infecção viral dos componentes CRISPR com relação à rapidez com que os componentes são expressos e por quanto tempo estes estão presentes dentro da célula. O uso de plasmídeos ou vírus para a introdução de Cas9 e gRNA(s) requer o uso da maquinaria de transcrição/tradução celular para gerar complexos de Cas9-gRNA funcionais, o que resulta num atraso significativo na expressão da proteína Cas9, com um pico de atividade >12 h (Kim & Kim2014). A expressão de cada componente continua indefinidamente (transporte mediado por lentivírus) ou até o DNA ser perdido por divisão celular, para o transporte baseado em plasmídeo ou adenovírus (Paix *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2014). Em contraste, as Cas9 RNPs são transportadas como complexos intactos, são detectáveis em altos níveis logo após a

transfecção, e são rapidamente eliminadas da célula por meio de vias de degradação proteica. Há duas consequências principais do perfil cinético distinto dos Cas9 RNPs. Primeiro, o uso de RNPs pode aumentar a taxa na qual as mutações se formam nos genes alvo em comparação com a entrega mediada por plasmídeo de Cas9 e gRNAs. As RNPs Cas9 são fornecidas como complexos funcionais capazes de segmentar o DNA alvo e não precisam ser transcritas e traduzidas. Em segundo lugar, a eliminação rápida de RNPs Cas9 da célula pode aumentar a especificidade das CRISPRs, reduzindo a quantidade de tempo que a Cas9 está disponível para clivagem fora do alvo. As características acima mencionadas de RNPs Cas9 as tornam úteis para aplicações de CRISPRs onde a expressão limitada de Cas9 é necessária e a especificidade é uma preocupação, tal como geração de *knockouts* ou a recombinação homóloga (DeWitt *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2014; Paix *et al.*, 2015).

#### **2.4. Métodos de inserção de transgenes em embriões**

Muitos são os métodos utilizados na manipulação genética de organismos, como a microinjeção pró-nuclear (MIP) de DNA exógeno em zigotos (Gordon & Ruddle, 1981; Hammer *et al.*, 1985), a transferência de DNA mediada por espermatozoide durante a fecundação *in vitro* (Lavritano *et al.*, 1998), a transdução de células somáticas, gametas e embriões por partículas adenovirais, a transferência de DNA para células ou embriões mediada por lipossomos, eletroporação de DNA/RNA em espermatozoides, zigotos ou embriões, a injeção de células embrionárias previamente modificadas na cavidade blastocélica de embriões, a complementação tetraploide (CT) entre embriões e células-tronco embrionárias geneticamente modificadas, e a clonagem por transferência nuclear

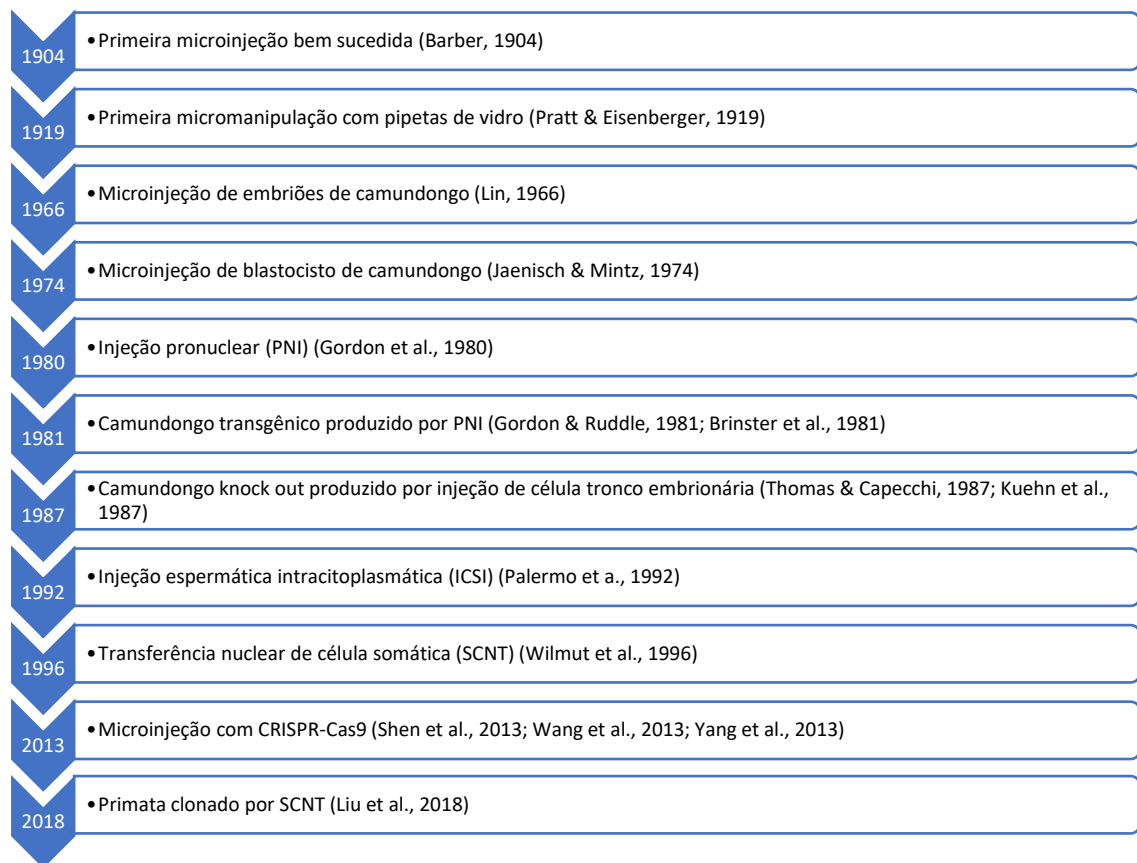


(TN) de células somáticas ou embrionárias também previamente geneticamente modificadas (Schnieke *et al.*, 1997; Cibelli *et al.*, 1998; Carlson *et al.*, 2016; Bogliotti *et al.*, 2017). Dentre todas, a microinjeção pró-nuclear, a complementação tetraploide e a clonagem por TN têm sido as metodologias de maior aplicação e sucesso na geração de animais geneticamente modificados nas últimas quatro décadas. Com o advento da tecnologia de edição gênica, a metodologia simplificada e mais prática de microinjeção intracitoplasmática de zigotos vem sendo utilizada de forma efetiva, muitas vezes com resultados dramaticamente mais eficientes que as demais técnicas, dependendo do escopo das modificações genéticas desejadas.

#### *2.4.1. Microinjeção de zigotos*

A microinjeção/micromanipulação de estruturas biológicas foi estabelecida há mais de 100 anos, por Marshall Albert Barber, que desenvolveu micropipetas para isolar e manipular bactérias e protozoários (Barber *et al.*, 1904). Esta é uma técnica fundamental na pesquisa biomédica e na saúde. A longevidade da técnica reside na precisão da recuperação mecânica, ou entrega de materiais biológicos, que em alguns casos é simplesmente necessário ou mais eficaz do que outros meios de recuperação/entrega. A microinjeção é favorecida pela simplicidade na transferência de conteúdo de micromoléculas para macromoléculas e de organelas para células (Davis *et al.*, 2000). A microinjeção/micromanipulação tem sido praticada ao longo do século como uma forma de arte. Variações na manipulação e nos instrumentos podem ser toleradas em grau surpreendente, com resultados satisfatórios. Ao longo do século passado, a microinjeção se desenvolveu como uma ferramenta indispensável juntamente com a evolução dos campos

biomédicos: da transgênicos ao direcionamento de genes, da clonagem de animais ao tratamento da infertilidade humana, da engenharia genética guiada por nucleases à edição do genoma guiada por RNA (Figura 8). O nascimento da era das CRISPRs trouxe novamente a microinjeção de volta à vanguarda.



**Figura 8.** Cronologia do desenvolvimento e uso da microinjeção/micromanipulação de estruturas biológicas.

A linha do tempo começa com a invenção da microinjeção (1904) e conclui com a clonagem de primatas pela transferência nuclear de células somáticas (2018), abrangendo mais de um século de grandes feitos da microinjeção/micromanipulação. Adaptado de Xu (2018).

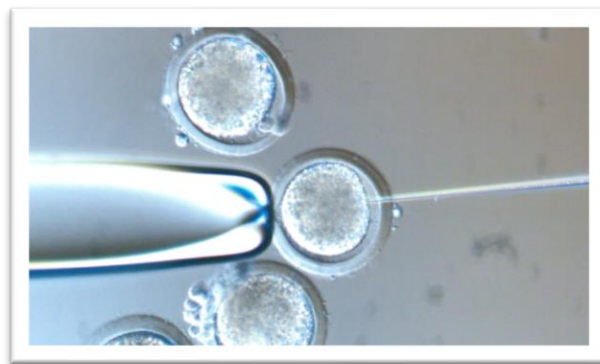
A microinjeção é um método direto para introduzir o DNA (ou outra substância) no citoplasma ou no núcleo de células/zigotos/embriões. É um procedimento microcirúrgico

conduzido individualmente em cada estrutura, usando uma agulha de vidro (ou seja, um microcapilar de vidro), um dispositivo de posicionamento de precisão (um micromanipulador) para controlar o movimento da micropipeta, e um microinjetor. A extrusão de fluido contendo o material genético através da micropipeta usa pressão hidrostática. A microinjeção embrionária é realizada fixando os zigotos com uma pipeta *holding*, e em seguida, a pipeta de microinjeção de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  ou mais de diâmetro na extremidade é introduzida perfurando a zona pelúcida e adentrando o citoplasma do zigoto. No caso dos suínos, a membrana citoplasmática é bastante elástica, necessitando se assegurar que haja o rompimento do oolema para que a injeção seja realizada no citoplasma e não no espaço perivitelínico (Figura 9). As injeções são normalmente realizadas sob controle visual direto, usando um microscópio. Os pequenos diâmetros da extremidade dessas micropipetas, combinados com a alta precisão do micromanipulador, permitem uma entrega precisa da substância desejada. O volume da injeção pode variar de 5 a 20 pL, sendo este volume estimado visualmente. Essa técnica é baseada nos experimentos de Barber (1911) e forma a base dos desenvolvimentos observados hoje (Barber, 1911; 1914). Conceitualmente, a microinjeção é o método mais simples de entrega de genes. No entanto, a aplicação desta técnica exige habilidade e experiência, além de equipamentos caros e especializados.

A microinjeção citoplasmática de embriões no estágio de 1-célula é uma técnica muito poderosa. Pode ser utilizada para entregar basicamente qualquer solução no interior do embrião para, por exemplo, produzir *knockouts* de genes para estudar a função gênica (genômica funcional) ou, mais recentemente, para gerar animais editados geneticamente. A maioria dos zigotos de animais de produção relevantes tem uma composição de ácidos

graxos muito alta que torna o citoplasma opaco e escuro (McEvoy *et al.*, 2000). Estas estruturas também possuem uma membrana plasmática bastante elástica. Essas características fazem com que a microinjeção pró-nuclear seja bastante dificultada, mesmo quando os zigotos a serem injetados são passados por processo de centrifugação, principalmente na espécie suína, onde a quantidade lipídica é bastante elevada. A microinjeção citoplasmática tem vantagens sobre a microinjeção pró-nuclear, pois é mais fácil de ser realizada e causa menos danos aos embriões injetados, resultando em maior viabilidade embrionária (Brinster *et al.*, 1985).

A partir do uso das ferramentas de edição mais recentes, como as CRISPRs, a eficiência da microinjeção citoplasmática é comparável com a pró-nuclear. Em trabalho realizado por Raveux e colaboradores (2017) em camundongos, os autores obtiveram taxas de edição de 34% e 40% utilizando a microinjeção pró-nuclear e citoplasmática, respectivamente.



**Figura 9.** Imagem ilustrativa da microinjeção citoplasmática de zigotos suínos quimicamente ativados.

#### 2.4.2. Clonagem por transferência celular de células somáticas (TNCS)

A transferência nuclear de células somáticas, mais conhecida como clonagem animal, é uma técnica que permite a geração de indivíduos com o mesmo genoma. Assim, os animais clonados carregam o mesmo genoma da célula doadora usada para o processo de TNCS, sendo assim, gêmeos entre si e geração de gêmeo do animal que doou a célula somática. O genoma vem do núcleo de uma célula que pode ser retirada de um embrião, um feto ou um animal em qualquer fase pós-natal, de jovem a adulto. O núcleo deve ser colocado em um oócito maturo, cujos cromossomos são previamente removidos (enucleação). A etapa de transferência nuclear visa reconstruir um embrião, com todo o genoma originário do núcleo da célula doadora, que desenvolver-se-á subsequentemente como qualquer outro embrião concebido por fecundação, embora com menor eficiência.

A clonagem por TNCS que originou o nascimento da ovelha Dolly (Wilmut *et al.*, 1997) é uma conquista histórica que atraiu a atenção do público em geral para uso em animais de produção. Este é um dos melhores exemplos em que a pesquisa de novas técnicas reprodutivas em animais de produção também forneceu conhecimentos biológicos básicos não obtidos anteriormente em animais de laboratório. O trabalho fundamental de clonagem por TN foi conduzido em anfíbios (Gurdon, 2006) na década de 1960. No entanto, avanços significativos da tecnologia foram alcançados com a clonagem de embriões de animais de produção (Willadsen, 1986), quando oócitos maturados, ao invés de zigotos, tornaram-se receptores de núcleos provenientes de animais doadores.

A transferência nuclear de células somáticas facilitou a capacidade de produção de animais transgênicos, contornando a maioria das deficiências de outras técnicas (Cibelli *et al.*, 1998). Uma das primeiras vantagens da clonagem em relação à microinjeção é que o

sexo do animal pode ser pré-determinado pela escolha do material doador (ou seja, tecido masculino ou feminino). Por exemplo, a capacidade de selecionar o sexo do animal aumentaria a eficiência e facilitaria a anulação da produção de leite por meio da transgenia (Brophy *et al.*, 2003). Em segundo lugar, o uso de cultivos celulares para propagar células doadoras pode levar a um grande número de células com modificações genéticas que podem ser congeladas e armazenadas por longos períodos de tempo. Em conjunto com a clonagem por TNCS, células doadoras modificadas geneticamente podem eventualmente dar origem a numerosos animais transgênicos clonados. A estrutura e a expressão de um transgene podem ser testadas por técnicas moleculares, tais como PCR, *Southern blot*, hibridização *in situ* por fluorescência e *Western blot*, antes de iniciar-se o processo da clonagem e transferência de embriões para receptoras com um longo período de gestação, como os bovinos. O uso adequado da clonagem por TNCS também garante que 100% dos animais produzidos sejam geneticamente modificados, e que cada célula de um animal clonado apresente a mesma modificação, sejam *indels* ou transgenes, economizando assim tempo e custo associados aos animais receptores.

A capacidade de utilizar uma população clonal de cultivos transgênicos garante o mesmo local de inserto da construção gênica para cada clone, diminuindo assim a variação de animal para animal nos níveis de expressão de um transgene (Cibelli *et al.*, 2013) Além disso, os transgenes podem ser adicionados a um contexto genético específico. Por exemplo, uma fêmea que está acima da média na produção de proteína do leite pode ser usada como o fundo genético (células somáticas doadoras) em que o transgene é colocado. Por último, a clonagem por TNCS permite não apenas a adição de DNA em locais aleatórios, mas também a inserção direcionada de DNA por recombinação homóloga, que é

vital na modulação da expressão gênica específica, bem como na criação de nocautes gênicos (Hryhorowicz *et al.*, 2017).

O primeiro suíno nascido após a clonagem por transferência nuclear foi criado utilizando blastômeros de embriões em estágio de 4-células como doadores de núcleo (Prather *et al.*, 1989). Isto pode ser claramente explicado pela sensibilidade dos embriões suínos e pelas dificuldades técnicas de seu manuseio *in vitro*. Tal conquista permaneceu única por mais de uma década. No final da década de 1990, pelo menos 10 laboratórios em todo o mundo competiram em quatro continentes para produzir os primeiros leitões por transferência nuclear de células somáticas; portanto, não é de surpreender que o avanço tenha sido alcançado no mesmo ano em três locais distintos (Betthausen *et al.*, 2000; Onishi *et al.*, 2000; Polejaeva *et al.*, 2000).

Nos últimos 20 anos, a eficiência da clonagem por TNCS como um todo não aumentou muito, e sua aplicação prática é limitada à produção de animais que apresentam alto valor agregado como plantel, ou para gerar animais fundadores geneticamente modificados, quando a transferência nuclear é combinada com a engenharia genética de células somáticas (de Aguiar *et al.*, 2017; Secher *et al.*, 2017; Qiu *et al.*, 2108).

Embora a eficiência da clonagem por TNCS possa ainda ser incrementada, atualmente é este considerado um dos métodos mais eficientes para produzir animais geneticamente modificados (Schnieke *et al.*, 1997). O número de estudos que relatam a geração bem-sucedida de animais de produção transgênicos por TNCS aumentou e as empresas comerciais passaram a adotar essa abordagem para produzir seus fundadores transgênicos.

Padrões anormais de metilação do DNA em embriões e clones sugerem uma reprogramação inadequada do DNA do doador pelo oócito (Han *et al.*, 2003). Isto não é surpreendente, pois os oócitos são projetados para reprogramar o DNA derivado do espermatozóide, e não o DNA de uma célula doadora de origem somática. Para auxiliar o processo de reprogramação, diferentes abordagens têm sido realizadas. Como estudos anteriores sugeriram que a metilação do DNA era comumente mal regulada em embriões clonados, distintos compostos que podem reduzir o nível de metilação do DNA doador têm sido utilizados nos últimos anos. Um exemplo é a 5-aza-2'-desoxicitina (5-aza-dC), a qual é uma substância química que pode reduzir o nível de metilação genômica pela inibição de DNA metiltransferases. No entanto, o efeito benéfico em suínos não se mostrou consistente (Ning *et al.*, 2013).

Outra abordagem para alterar marcas epigenéticas em células doadoras ou embriões clonados é pelo uso de inibidores de desacetilases de histonas (HDAC). A inibição de HDAC pode aumentar o nível global de acetilação em embriões derivados da TNCS, levando a uma expressão de genes mais ativa durante o desenvolvimento. Diferentes inibidores de HDAC mostraram melhorar o desenvolvimento de embriões clonados em muitas espécies. Quando os embriões clonados são tratados com hidroxiamida do ácido 6-(1,3-dioxo-1H, 3H-benzo [de] isoquinolin-2-il)-hexanóico (*Scriptaid*) durante 14 a 16 h, a eficiência do desenvolvimento embrionário de embriões clonados foi aumentada. Além disso, suínos miniatura somente puderam ser clonados após a exposição ao *Scriptaid* (Zhao *et al.*, 2009). Desta forma, vislumbra-se que o tratamento de embriões clonados com *Scriptaid* poderia corrigir alguns genes desregulados em embriões derivados da clonagem por TNCS quando comparados com embriões *in vivo* e de FIV (Whitworth *et al.*, 2011).



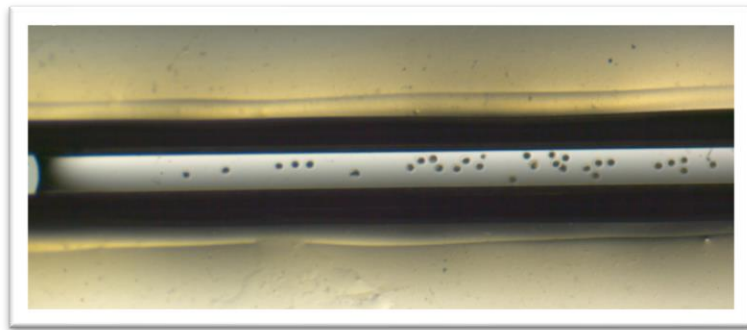
Isto demonstra que certos produtos químicos podem auxiliar o oócito a reprogramar o DNA somático após a clonagem. Atualmente, muitos grupos estão enfocados na avaliação de diferentes inibidores de HDAC para identificar um inibidor ideal para o processo da clonagem por TNCS. O tratamento de embriões clonados com inibidores de HDAC aumenta claramente a eficiência na produção de embriões. No entanto, devido a não entendermos completamente o mecanismo do processo de reprogramação após a clonagem, a busca de mecanismo(s) específico(s) de como exatamente os inibidores de HDAC auxiliam na eficiência da clonagem ainda permanece sob investigação (Aguiar *et al.*, 2017). Mais pesquisas sobre como o oócito reprograma o DNA doador durante a clonagem por TNCS podem nos guiar para a descoberta de processos mais eficientes de produção de embriões clonados por TNCS.

#### 2.4.3. Eletroporação

Com o desenvolvimento de opções aprimoradas de engenharia genética, a microinjeção tornou-se novamente um método de escolha, particularmente em combinação com nucleases programáveis de edição gênica. No entanto, a microinjeção é tecnicamente exigente, requer habilidades especializadas em micromanipulação, é trabalhosa e limita-se a uma produção lenta devido à restrição de os embriões terem que ser injetados individualmente.

A eletroporação potencialmente oferece uma alternativa atraente como uma tecnologia que é adequada para introduzir DNA e RNA em embriões no estágio de 1-célula (Grabarek *et al.*, 2002). A eletroporação é o processo que utiliza pulso elétrico para a transfecção de células com DNA (Figura 10). Acredita-se que a aplicação de um campo

elétrico às células induza poros temporários na membrana celular, permitindo que a célula incorpore sequências de DNA exógeno. O campo elétrico também leva as fitas de DNA (de carga negativa) para longe do cátodo (extremidade negativa), sendo mais atraídos em direção ao ânodo (extremidade positiva) de um campo elétrico. Portanto, um pulso elétrico faz com que parte do DNA entre na célula. Depois que o campo elétrico é desfeito, os poros da membrana celular se fecham, retendo parte do DNA eletroporado dentro da célula.



**Figura 10.** Câmara de eletroporação com zigotos suínos sendo eletroporados.

A introdução de nucleases de edição gênica em zigotos de camundongos e ratos por eletroporação resultou na produção bem-sucedida de animais com *knockout* para genes direcionados específicos (Kaneko *et al.*, 2014). Segundo os autores, a eletroporação com uma sequência definida de pulsos resultou em uma integração eficiente de ácido nucléicos no genoma embrionário e resultou em aumento da viabilidade embrionária. Usando este método, um grande número de embriões (~100) pode ser manuseado de uma só vez, ao contrário da microinjeção, que deve ser realizada em um embrião de cada vez. Logo após este relato, dois outros grupos demonstraram o uso da eletroporação *in vitro* para a edição

bem-sucedida do genoma em embriões murinos em estádios de pré-implantação (Hashimoto *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2015).

Também é possível eletroporar componentes do sistema CRISPR/Cas9 como o complexo de ribonucleoproteína pré-conjugado em zigotos, podendo alcançar eficiências de 88% para edições bi-alélicas de genes, e 42% para a introdução de mutações precisas mediadas por HDR em camundongos (Chen *et al.*, 2016). Além disto, foi demonstrado que a edição após a eletroporação dos complexos de ribonucleoproteínas pode ocorrer antes da primeira replicação do genoma, garantindo que a geração de camundongos não mais contenha alelos de tipo *wild type* não editados (Hashimoto *et al.*, 2016). No entanto, vários obstáculos dentro dos protocolos atuais dificultam a aplicação mais ampla da eletroporação. Em primeiro lugar, o investimento em um dispositivo eletroporador especializado é elevado. A utilização de pré-tratamento corrosivo do embrião com solução ácida de Tyrode ou Proteases para permitir a introdução dos componentes CRISPR/Cas9 também pode ser deletéria, comprometendo a viabilidade dos embriões (Peng *et al.*, 2012), uma vez que o tempo necessário de incubação de apenas 10 s em solução de Tyrode é difícil de ser reproduzido, mesmo para usuários experientes (Qin *et al.*, 2015). Em adição, a atividade específica do lote da Protease e da solução ácida de Tyrode (Chen *et al.*, 2016) desafia sua aplicação segura e reprodutível. Até agora, a eletroporação para o transporte de editores de genoma foi investigada principalmente em roedores e recentemente começou a ser aplicada em outras espécies animais. A eletroporação para a geração de *indels* mediados por CRISPR foi aplicada com sucesso em suínos (Tanihara *et al.*, 2016). Em bovinos, foi relatado que a eletroporação de zigotos livres de zona pelúcida também possibilitou a introdução de mutações precisas como resultado do HDR (Wei *et al.*, 2018). Embora o

aumento das eficiências gerais de edição e a redução do nível de mosaicismo ainda precisam ser abordadas, a eletroporação de embriões de animais é muito promissora. Em contraste com a microinjeção de embriões individuais, o processo de eletroporação é muito simples, e grupos de dezenas de embriões podem ser editados simultaneamente, o que oferece espaço para alta produtividade devido a um potencial muito maior de automação do processo de eletroporação.

Hoje, os pesquisadores têm acesso a uma grande variedade de diferentes tecnologias de edição gênica, oferecendo uma ampla gama de atributos diferentes, incluindo simplicidade, boa relação custo-benefício, alta eficiência e controle preciso. Com esta caixa de ferramentas em mãos, as limitações técnicas iniciais foram parcialmente superadas e os genomas de animais de produção agora podem ser modificados com facilidade, precisão e complexidade anteriormente possíveis apenas em camundongos.

A produção de animais modelos de doenças humanas é uma realidade e está cada vez mais possível e próxima. A revolução provocada pelo uso das tecnologias de edição gênica aproximou à realidade as ideias futuristas de produção de órgãos humanos em animais de produção. Temos agora que incrementar a eficiência de uso destas tecnologias para a geração de animais GM, pelo uso de biotécnicas avançadas da reprodução, as quais por sua vez, necessitam um aumento de eficiência *per se*.

### **3. HIPÓTESES E OBJETIVOS**

#### **3.1. Hipóteses**

- a) A seleção de oócitos para uso na clonagem por TNCS, a ativação química dos oócitos suínos utilizando quelantes de zinco e o uso de inibidores de desacetilases de histona proporciona uma maior produção embrionária.
- b) A eletroporação de zigotos suínos utilizando CRISPR/Cas9 conjugada em ribonucleoproteínas é uma alternativa viável para substituir a microinjeção na produção de animais geneticamente modificados.

#### **3.2. Objetivos gerais**

- a) Otimizar a produção de suínos geneticamente modificados via clonagem por TNCS.
- b) Desenvolver um sistema de eletroporação de zigotos suínos para a produção de animais geneticamente modificados, sem a necessidade de micromanipulação.

#### **3.3. Objetivos específicos**

- a) Determinar a eficiência na produção de suínos geneticamente modificados por TNCS utilizando um sistema não subjetivo de seleção de oócitos.
- b) Aumentar a produção embrionária de embriões clones suínos por meio de uma melhor ativação química, utilizando quelantes de zinco e uma melhor reprogramação celular e qualidade embrionária com o uso de inibidores de desacetilases de histonas.
- c) Estabelecer um protocolo de edição gênica via eletroporação de zigotos suínos, utilizando o sistema CRISPR/Cas9 em ribonucleoproteínas para distintos *loci*, que seja repetível e estável entre distintos laboratórios.

**4. CAPÍTULO 1**

**Influence of oocyte selection, activation with a zinc chelator and inhibition of histone deacetylases on cloned porcine embryo development**

Felipe Ledur Ongaratto, Karine Campagnolo, Paula Rodriguez Villamil, Marcelo Bertolini,

Daniel Fred Carlson

**INFLUENCE OF OOCYTE SELECTION, ACTIVATION WITH A ZINC  
CHELATOR AND INHIBITION OF HISTONE DEACETYLASES ON CLONED  
PORCINE EMBRYO DEVELOPMENT**

Ongaratto FL<sup>1,2</sup>, Campagnolo K<sup>1</sup>, Rodriguez-Villamil P<sup>1,2</sup>, Bertolini M<sup>1§</sup>, Carlson DF<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre,  
RS, Brazil

<sup>2</sup>Recombinetics, St. Paul, MN, USA

<sup>§</sup>Corresponding author: Marcelo Bertolini

Postal address: Embryology and Biotechnology of Reproduction Lab

School of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS)

Av. Bento Goncalves, 9090 -Porto Alegre, RS - Brazil - 91.540-000

E-mail address: marcelo.bertolini@ufrgs.br

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of alternative protocols to improve oocyte selection, embryo activation and genomic reprogramming on *in vitro* development of porcine embryos cloned by somatic cell nuclear transfer (SCNT). In Experiment 1, *in vitro*-matured oocytes were selected by exposure to a hyperosmotic sucrose solution prior to micromanipulation. In Experiment 2, an alternative chemical activation protocol using a zinc chelator as an adjuvant (ionomycin + TPEN + 6DMAP) was compared to a standard protocol (ionomycin + 6-DMAP) for the activation of oocytes (parthenotes) or SCNT-derived embryos. In Experiment 3, presumptive cloned zygotes were incubated after chemical activation in a histone deacetylase inhibitor (Scriptaid) for 15 h, with the evaluation of embryo yield and total cell number in resulting blastocysts on Day 7 of development. In Experiment 1, cleavage rates were higher in sucrose-treated oocytes than controls (123/199, 61.8% vs. 119/222, 53.6%, respectively). However, blastocyst rates were similar between groups. In Experiment 2, cleavage rates were higher in zygotes treated with TPEN than controls, for similar blastocyst rates between groups. Lastly, the use of Scriptaid in Experiment 3 did not improve embryo development after cloning when compared with non-treated embryos. Nevertheless, the total number of cells was higher in cloned zygotes treated with Scriptaid than untreated SCNT controls. In conclusion, the use of strategies for the selection of better quality oocytes may improve embryo yield, with TPEN and Scriptaid having the potential to improve cloning efficiency. The refinement of such alternative treatments could be useful to improve embryo development for the production of SCNT-derived pig embryos.

Keywords: oocyte quality, embryo activation, genomic reprogramming, cloning, pigs.



## INTRODUCTION

Since the production of the first cloned sheep by somatic cell nuclear transfer (SCNT) by Wilmut *et al.*, (1997), many mammalian species have been cloned, including mouse (Wakayama *et al.*, 1998), cattle (Kato *et al.*, 1998), pig (Polejaeva *et al.*, 2000), cat (Shin *et al.*, 2002), rat (Zhou *et al.*, 2003), and dog (Lee *et al.*, 2005). Cloning by SCNT is a powerful tool that can be strategically used for farm animal breeding and research, for the production of genetically engineered animals for biomedical and other purposes, and for the conservation of endangered species. However, the low cloning efficiency and the high incidence of pre- and postnatal developmental abnormalities have limited a wider practical application of the procedure (Solter, 2000; Cibelli *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007; Kishigami *et al.*, 2008).

The process of cloning involves a series of steps that, when under suboptimal conditions, may contribute to failures to obtain live and healthy animals (Callensen *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015; Aguiar *et al.*, 2017). Therefore, numerous efforts have been made to improve each step of the cloning process to increase success rates and, therefore, efficiency. Factors such as oocyte quality are decisive for successful cloning (Lin *et al.*, 2015). In addition, adequate activation and the reprogramming process are key to embryo development and, consequently, to production of viable cloned animals.

One of the parameters to enhance higher developmental rates is the selection of more competent oocytes for manipulation, using alternative procedures other than the subjective

morphological assessment, which is commonly used for *in vitro* embryo production. Sucrose has already been used either as a method to aid enucleation in cloned mice (Wang *et al.*, 2001) or for the selection of oocytes (Dan-Nguyen *et al.*, 2017; Iwasaki *et al.*, 2018). For the latter purpose, for low quality oocytes, exposing oocytes to a hyperosmotic medium induced shrinkage, showing an irregular oolemma shape, whereas good quality oocytes maintain their shape after exposure to sucrose solution. Thus, this could be a cheap and fast tool to select competent oocytes prior to micromanipulation. For activation, several effective protocols for artificial oocyte activation have been developed. However, most protocols require prolonged exposure to non-specific inhibitors with high variability in results (Bang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017). Hence, it has been shown that the use of agents that mimic the physiological activation events, as the zinc chelator TPEN, through the manipulation of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , improved chemical activation and developmental rates of porcine oocytes (Lee *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017; Macedo *et al.*, 2018). Finally, to increase reprogramming efficiency, some authors demonstrated that the use of Scriptaid, an inhibitor of histone deacetylase enzymes (HDACi), enhanced developmental rates after cloning, even correcting epigenetic errors, hence, improving reprogramming (Xu *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2015; Qiu *et al.*, 2018). Thus, the aim of this study was to compare (i) the exposure of oocytes to sucrose as a means to select better quality oocytes, (ii) the use of the zinc chelator TPEN for parthenogenetic embryo activation, and (iii) the use of a HDACi (Scriptaid) after cloning on developmental outcome of porcine embryos cloned by SCNT.

## MATERIALS AND METHODS

All chemicals were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), unless stated otherwise.

### *In vitro maturation and cloning by Somatic Cells Nuclear Transfer*

*In vitro*-matured pig *cumulus*-oocyte complexes (COCs) were obtained from a commercial supplier (DeSoto Biosciences, Inc., Seymour, TN, USA). After 20–22 h of *in vitro* maturation in IVM medium, composed of TCM 199 supplemented with 10% (v/v) porcine follicular fluid, 0.6 mM cysteine, 50 ng/mL EGF, 10 ng/mL IGF1, 15 IU/mL eCG and 10 IU/mL hCG, at 39°C in 5% CO<sub>2</sub>, COCs were further cultured for 24 h in maturation medium without hormones, as previously described (Liu *et al.*, 2014). At the end IVM, *cumulus* cells were removed by vortexing for 6–8 min in HEPES-buffered TCM-199 medium supplemented with 0.1% hyaluronidase. Then, denuded oocytes were rinsed three times in Medium 199+HEPES (Gibco, NY, USA) supplemented with 0.4% BSA (w/v) and moved into holding media until cloning. For manipulation, matured oocytes were transferred into micromanipulation medium composed of TCM-199 supplemented with 7 µg/mL cytochalasin B. By using micropipettes, the polar body along with a portion of the adjacent cytoplasm were removed, and a fibroblast cell was placed into the perivitelline space. Oocyte-cell couplets were placed on a 1-mm cell fusion electrode slide (BTX451, Harvard Apparatus, MA USA), overlaid with 500 µL fusion medium (280 mM mannitol solution, 0.001 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.05 mM MgCl<sub>2</sub>), and given two 1.2-kV/cm DC pulses for 30 µs using a cell fusion electroporation system (BTX ECM-2001, San Diego, CA, USA).

For chemical activation of pig embryos, and following polar body selection (parthenote embryos) or embryo reconstruction by fusion (cloned embryos), control oocytes were activated by chemical activation under standard chemical protocol, by exposure to 5  $\mu$ M ionomycin in TCM-199 HEPES-buffered medium supplemented with 0.4% BSA for 5 min at 39°C in air, protected from light, followed by 4 h incubation in 2 mM 6-DMAP in PZM-3 medium supplemented with 0.4% BSA. Finally, presumptive zygotes were *in vitro*-cultured in PZM-3 culture medium supplemented with 0.4% BSA according to Cao *et al.*, (2012), at 39°C in 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> and high humidity for 7 days. Cleavage rates were determined 48 h after activation, and blastocyst rates on Day 7 of *in vitro* culture (IVC).

*Experiment 1: Oocyte selection by sucrose treatment*

After IVM, groups of 20 to 30 denuded oocytes were treated with 0.2 M sucrose in Medium 199 supplemented with HEPES and 0.4% BSA for 5 min. Based on the changes of cytoplasm and membrane morphology during and after sucrose treatment, good oocytes were selected, according to Dang-Nguyen *et al.* (2018), discarding oocytes with misshaped form. After treatment, good oocytes were washed three times in Medium 199 with HEPES + 0.4% BSA to remove sucrose, for use for embryo production by cloning or by parthenogenesis, as described above. Non-sucrose selected oocytes were used as controls for the production of cloned or parthenote embryos. Cleavage rates were determined 48 h after nuclear transfer and blastocyst rates on Day 7 of IVC.

*Experiment 2: Chemical activation by zinc chelator TPEN*

Groups of embryos produced by SCNT were chemically activated by one of two protocols. Reconstructed presumptive SCNT embryos were treated with 5  $\mu$ M ionomycin for 5 min. After ionomycin treatment, zygotes were washed twice and incubated in 2 mM 6-DMAP for 4 h (SCNT control). The TPEN treatment was performed with a concentration of TPEN based on previous studies by Lee *et al.* (2015). Oocytes were exposed to ionomycin for 5 min followed by 200  $\mu$ M TPEN in PZM-3 + 4mg/mL BSA for 30 min. To prevent extrusion of the second polar body, embryos were cultured in PZM-3 + 4mg/mL BSA in the presence of 2 mM 6-DMAP for 4 h after exposure to TPEN. After 6-DMAP incubation, presumptive zygotes were washed in PZM-3 culture medium and *in vitro*-cultured in PZM-3 + 4 mg/mL BSA at 39°C in 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> up to the blastocyst stage on Day 7 of development. Parthenote embryos activated under the standard protocol (ionomycin + 6-DMAP) were used as controls. Cleavage rates were determined 48 h after nuclear transfer and blastocyst rates on Day 7 of IVC.

*Experiment 3: Inhibition of histone deacetylases (Scriptaid)*

To assess the effect of the Scriptaid treatment, a proportion of the cloned embryos activated under the standard activation protocol was *in vitro*-cultured in PZM-3 + 4 mg/mL BSA supplemented with 500 nM Scriptaid for 15 h, immediately after activation, at 39°C in 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. Embryos were then *in vitro*-cultured in PZM-3 + 4 mg/mL BSA and in a humidified atmosphere at 39°C in 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. Cloned and parthenote embryos not treated with Scriptaid were used as controls. Cleavage rates were determined 48 h after nuclear transfer and blastocyst rates on Day 7 of IVC.

Embryos that developed to the blastocyst stage after 7 days in culture were separated, rinsed in PBS + 0.1% polyvinyl alcohol (PBS-PVA), fixed in 4% paraformaldehyde for 15–20 min, and then stored in PBS containing 0.3% BSA and 0.1% Triton X-100 at 4°C. Nuclei were stained by exposing embryos to 10  $\mu$ M Hoechst 33342 for 10 min. Embryos were then mounted in a drop of glycerol on a glass slide and covered with a cover slip. Blastocysts were gently flattened under the coverslip, so that most cells appeared in the same focal plane. Total cell numbers were counted using an epifluorescent microscope.

#### *Data analyses*

Cleavage and blastocyst rates were compared between groups, for the three experiments, by the Chi square test ( $P < 0.05$ ), whereas total cell number in blastocysts (Experiment 3) were compared by ANOVA, with pairwise comparisons by the Tukey test ( $P < 0.05$ ).

## RESULTS

#### *Sucrose treatment*

The percentage of oocytes classified as good, and therefore selected after sucrose treatment, was 87.7% (199/235). Cleavage and blastocyst rates for parthenote or cloned embryos derived from oocytes treated with sucrose were similar to untreated controls, as shown in Table 1. Cleavage rates in the parthenote sucrose-treated group were higher than the untreated cloned group. In addition, cleavage rates were higher after oocyte selection in sucrose, irrespective of SCNT or parthenote (119/222, 53.6% vs. 126/199, 63.3%, for controls and sucrose-treated embryos, respectively;  $P < 0.05$ ), with no differences in

blastocyst yield. Blastocyst rates for parthenote embryos were higher than for cloned embryos, regardless the sucrose treatment.

#### *TPEN treatment*

Cleavage rates were lower in control cloned zygotes (TPEN-untreated) than parthenote controls and TPEN-treated cloned embryos ( $p < 0.05$ ), which were similar to one another. However, blastocyst rates were similar between treated and untreated cloned groups, but lower than the parthenogenetic control untreated group (Table 2).

#### *Scriptaid treatment*

Scriptaid treatment after fusion did not improve embryo development after cloning when compared with the untreated cloned groups, with both cloned embryo groups showing lower cleavage and blastocyst rates than parthenogenetic control embryos (Table 3). However, the total number of cells in Scriptaid-treated cloned embryos was higher than in untreated cloned embryos (Figure 1).

## DISCUSSION

Although several mammalian species have been successfully cloned using SCNT technology, cloning success rate remains extremely low, especially in pigs (Keefer, 2015). In the present study, we evaluated factors in procedures for SCNT cloning in pigs that may improve cloning efficiency. The oocyte competence is one of such main factors. It is known that oocyte quality has a direct and important influence on developmental rates when used for *in vitro* embryo production (Kempisty *et al.*, 2015). However, the visual evaluation that

is currently used for the process continues to be subjective, to say the least. In this study, oocyte quality was evaluated by incubating oocytes for 5 min in a hyperosmotic medium containing 0.2 M sucrose, with the subsequent morphological assessment of viability. Previous authors reported that the exposure to a hyperosmotic sucrose solution allowed the selection of better quality oocytes, with subsequent increase in *in vitro* developmental rates in pigs (Dan-Nguyen *et al.*, 2018; Iwasaki *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2014). The exposure of oocytes in the hyperosmotic sucrose solution, unlike other methods of selection, such as Brilliant Cresyl Blue (BCB), is faster and proven innocuous to oocytes, neither compromising further embryo development nor causing chromosomal abnormalities, as opposed to what has been reported for viability staining processes (Iwasaki *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2014). Nevertheless, our results demonstrated that despite the selection of oocytes with sucrose producing more blastocyst on a per routine basis, total blastocyst rates were not significantly higher than the groups undergoing no sucrose selection. Cleavage rates were higher in the pre-selected group, but not the blastocyst rate. The deformation observed in the oolemma in the present study was not as significant, as reported elsewhere (Dan-Nguyen *et al.*, 2018), indicating a rather good quality of the used pools of oocytes in each procedure, which may very well be the reason for no differences being detected between treated and non-treated oocytes, in terms of development, as only about 12% of the oocytes were discarded after treatment. Oocytes used in this experiment were purchased from a commercial source, which employs a strict morphologic pre-selection prior to shipping. The selection with the exposure to sucrose could be more valuable for heterogenic pools of oocytes, where the elimination of bad quality oocytes would improve the total efficiency of the *in vitro* embryo culture.



In Experiment 2, a novel activation protocol was attempted to provide better results in terms of embryo yield. It is known that the artificial activation of oocytes occurs under suboptimal conditions, trying to emulate the natural signaling pathway produced by the fertilizing sperm. Artificial activation of oocytes is an essential process after cloning. Oocyte activation is also considered to be the major cause of success or fertilization failures following ICSI (Vanden Meerschaut *et al.*, 2014). The success of activation also depends on the inherent quality of oocytes, adequate selection of good oocytes, adequate maturation, and proper culture conditions. Most of the activation protocols are based on agents that promote the increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , such as calcium ionophores, ethanol and electric stimulation (Ferrer-Buitrago *et al.*, 2018). A recent study confirmed that TPEN, a zinc chelator, can effectively activate pig oocytes. However, the production of blastocysts was lower than the standard chemical activation protocol (Zhao *et al.*, 2014). The authors demonstrated that events of oocyte activation, such as cortical granule release and reduction in MPF occurred when matured oocytes were incubated with TPEN. Such events are a part of oocyte activation (Ducibella & Fissore, 2008), indicating that the depletion of  $\text{Zn}^{2+}$  by TPEN is enough to stimulate the machinery that is normally associated with meiotic resumption. The use of TPEN showed better results when pre-activated oocytes were exposed to the zinc chelator, promoting higher blastocyst rates than only chemical activation or only after TPEN exposure (Lee *et al.*, 2015). Our results showed similar blastocyst rates between cloned embryos (16.6% vs. 12.1%), probably resulting from sub-optimal culture conditions, as parthenote embryo yield was rather low (33.7%). However, cleavage rates were higher in the SCNT cloned embryos incubated in TPEN for 30 min

after chemical activation, confirming the efficient meiotic resumption due to appropriate oocyte activation.

Scriptaid is a HDACi that belongs to an existing class of hydroxamic acid-containing HDACis. In this study, we performed Scriptaid treatment after activation in an attempt to improve epigenetic modifications in SCNT embryos and to increase developmental competence, as demonstrated by others (Zhao *et al.*, 2009). It is known that deacetylase inhibitors increase histone acetylation, keeping the chromatin open, therefore, facilitating access to reprogramming factors present in the cytoplasm (Bannister & Kouzarides, 2011). The abnormal epigenetic reprogramming pattern seen in donor nuclei after cloning is thought to be the main cause of low cloning efficiencies. It is known that the methylation status will change the transition to embryonic transcription after activation of the genome and, consequently, also the initial cell divisions and differentiation (Whitworth *et al.*, 2011). Our findings did not show significant differences in blastocyst yield between treated and not treated embryos with Scriptaid (25.4% vs. 19.8%). In fact, blastocysts produced after exposure to Scriptaid showed a higher cell count in relation to those not treated with Scriptaid, indicating that such higher cell count may be due to a more adequate epigenetic reprogramming in relation to cloned control embryos.

In summary, findings from this study demonstrated that (a) oocyte selection in a sucrose hypertonic solution prior to enucleation did not improve the *in vitro* embryo development; (b) use of TPEN, a zinc chelator, during chemical activation improved the cleavage but did not improve the blastocyst rate; and (c) exposure of cloned activated embryos to Scriptaid,

a histone deacetylase inhibitor, allowed the production of embryos of better quality, according to the total cell number. Such treatments could be new approaches to increased developmental rates for SCNT pig embryos, when further tested and with the refinement of conditions and protocols. However, more studies must be done to understand their mechanisms and using in combination to evaluate the interaction of the different treatments.

## REFERENCES

- Aguiar, L.H., Ticiani, E., Rodriguez-Villamil, P., Ongaratto, F.L., Lazzarotto, C.R., Rodrigues, J.L., Bertolini, L.R. and Bertolini, M. (2017). Probability, odds and random chance: the difficult task of modulating the epigenetic profile of cloned embryos. *Animal Reproduction*, **14**, 102-123.
- Bang, J.I., Yoo, J.G., Park, M.R., Shin, T.S., Cho, B.W., Lee, H.G., Kim, B.W., Kang, T.Y., Kong, I.K., Kim, J.H. and Cho, S.K. (2013). The effects of artificial activation timing on the development of SCNT-derived embryos and newborn piglets. *Reproductive Biology*, **13**, 127-132.
- Callesen, H., Liu, Y., Pedersen, H.S., Li, R. and Schmidt, M. (2014). Increasing efficiency in production of cloned piglets. *Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")*, **16**, 407-410.
- Cao, Z., Sui, L., Li, Y., Ji, S., Zhang, X. and Zhang, Y. (2012). Effects of chemically defined medium on early development of porcine embryos derived from parthenogenetic activation and cloning. *Zygote*, **20**, 229-236.

- Dang-Nguyen, T.Q., Nguyen, H.T., Somfai, T., Wells, D., Men, N.T., Viet-Linh, N., Noguchi, J., Kaneko, H., Kikuchi, K. and Nagai, T. (2018). Sucrose assists selection of high-quality oocytes in pigs. *Animal Science Journal*, **89**, 880-887.
- Ducibella, T. and Fissore, R. (2008). The roles of Ca<sup>2+</sup>, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. *Developmental Biology*, **315**, 257-279.
- Ferrer-Buitrago, M., Bonte, D., De Sutter, P., Leybaert, L. and Heindryckx, B. (2018). Single Ca<sup>2+</sup> transients vs oscillatory Ca<sup>2+</sup> signaling for assisted oocyte activation: limitations and benefits. *Reproduction*, **155**, 105-119.
- Iwasaki, W., Yamanaka, K., Sugiyama, D., Teshima, Y., Briones-Nagata, M.P., Maeki, M., Yamashita, K., Takahashi, M. and Miyazaki, M. (2018). Simple separation of good quality bovine oocytes using a microfluidic device. *Scientific Reports*, **8**, 14273.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J.Y., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. (1998). Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, **282**, 2095-2098.
- Keefer, C.L. (2015). Artificial cloning of domestic animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 8874-8878.
- Kishigami, S., Mizutani, E., Ohta, H., Hikichi, T., Van Thuan, N., Wakayama, S., Bui, H.T. and Wakayama, T. (2006). Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **340**, 183-189.

- Lee, J., Lee, Y., Park, B., Elahi, F., Jeon, Y., Hyun, S.H. and Lee, E. (2014). Developmental competence of IVM pig oocytes after SCNT in relation to the shrinkage pattern induced by hyperosmotic treatment. *Theriogenology*, **81**, 974-981.
- Lin, T., Lee, J.E., Shin, H.Y., Oqani, R.K. and Jin, D.I. (2015). Factors Influencing the Efficiency of In Vitro Embryo Production in the Pig. *Reproductive & Developmental Biology*, **39**, 29-36.
- Liu, S., Cui, K., Li, H.L., Sun, J.M., Lu, X.R., Shen, K.Y., Liu, Q.Y. and Shi, D.S. (2015). Comparison of chemical, electrical, and combined activation methods for in vitro matured porcine oocytes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, **51**, 103-112.
- Meerschaut, F.V., Nikiforaki, D., Heindryckx, B. and De Sutter, P. (2014). Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. *Reproductive Biomedicine Online*, **28**, 560-571.
- Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. and Perry, A.C. (2000). Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, **289**, 1188-1190.
- Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L. and Colman, A. (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, **407**, 86.
- Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L. and Westhusin, M. (2002). Cell biology: a cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, **415**, 859.

- Solter, D. (2000). Mammalian cloning: advances and limitations. *Nature Reviews Genetics*, **1**, 199.
- Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R. and Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, **394**, 369.
- Wang, M.K., Liu, J.L., Li, G.P., Lian, L. and Chen, D.Y. (2001). Sucrose pretreatment for enucleation: An efficient and non-damage method for removing the spindle of the mouse MII oocyte. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, **58**, 432-436.
- Whitworth, K.M., Zhao, J., Spate, L.D., Li, R. and Prather, R.S. (2011). Scriptaid corrects gene expression of a few aberrantly reprogrammed transcripts in nuclear transfer pig blastocyst stage embryos. *Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells")*, **13**, 191-204.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, **385**, 810.
- Yang, X., Smith, S.L., Tian, X.C., Lewin, H.A., Renard, J.P. and Wakayama, T. (2007). Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nature Genetics*, **39**, 295.
- Ye, J., Flint, A.P.F., Campbell, K.H.S. and Luck, M.R. (2002). Synchronization of porcine oocyte meiosis using cycloheximide and its application to the study of regulation by cumulus cells. *Reproduction, Fertility and Development*, **14**, 433-442.
- Zhao, J., Hao, Y., Ross, J.W., Spate, L.D., Walters, E.M., Samuel, M.S., Rieke, A., Murphy, C.N. and Prather, R.S. (2010). Histone deacetylase inhibitors improve in vitro

and in vivo developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos.

*Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")*, **12**, 75-83.

Zhao, M.H., Kim, N.H. and Cui, X.S. (2014). Zinc depletion activates porcine metaphase II oocytes independently of the protein kinase C pathway. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, **50**, 945-951.

Zhou, Q., Renard, J.P., Le Friec, G., Brochard, V., Beaujean, N., Cherifi, Y., Fraichard, A. and Cozzi, J. (2003). Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*, **302**, 1179-1179.

**Table 1.** Developmental rates of *in vitro*-produced pig parthenogenetic or cloned (SCNT) embryos after oocyte selection in sucrose hypertonic solution (SUC) following *in vitro* maturation

Treatment group	Oocytes	Cleavage rate		Blastocyst rate		
	n	n	%	n	%	%*
Parthenotes	103	60	58.3 <sup>ab</sup>	45	43.7 <sup>a</sup>	75.0 <sup>a</sup>
Parthenotes + SUC	89	63	70.8 <sup>a</sup>	44	49.4 <sup>a</sup>	69.8 <sup>a</sup>
SCNT	119	59	49.6 <sup>b</sup>	25	21.0 <sup>b</sup>	42.4 <sup>b</sup>
SCNT + SUC	110	63	57.3 <sup>ab</sup>	27	24.5 <sup>b</sup>	42.9 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>: numbers with distinct superscripts in the same column differ, for P<0.05

\* Blastocyst rates based on total number of cleaved embryos on Day 2 of IVC, per group.



**Table 2.** Developmental rates of *in vitro*-produced pig parthenogenetic or cloned (SCNT) embryos after treatment with TPEN during activation

Treatment group	Oocytes	Cleavage rate		Blastocyst rate		
	n	n	%	n	%	%*
Parthenotes	86	65	75.5 <sup>a</sup>	29	33.7 <sup>a</sup>	44.6 <sup>a</sup>
SCNT	99	53	53.5 <sup>b</sup>	12	12.1 <sup>b</sup>	22.6 <sup>b</sup>
SCNT+ TPEN	108	74	68.5 <sup>a</sup>	18	16.6 <sup>b</sup>	24.3 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>: numbers with distinct superscripts in the column differ, for P<0.05

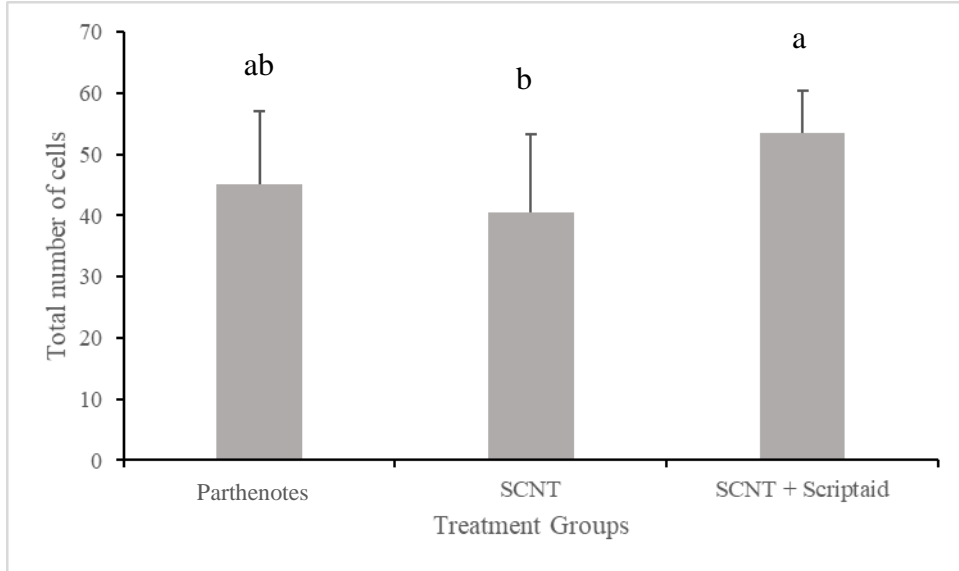
\* Blastocyst rates based on total number of cleaved embryos on Day 2 of IVC, per group.

**Table 3.** Developmental rates of *in vitro*-produced pig parthenogenetic or cloned (SCNT) embryos after treatment with Scriptaid after activation

Treatment group	Oocytes	Cleavage rate		Blastocyst rate		
	N	n	%	n	%	%*
Parthenotes	86	61	70.9 <sup>a</sup>	44	51.1 <sup>a</sup>	72.1 <sup>a</sup>
SCNT	111	56	50.4 <sup>b</sup>	22	19.8 <sup>b</sup>	39.3 <sup>b</sup>
SCNT+ Scriptaid	118	66	55.9 <sup>b</sup>	30	25.4 <sup>b</sup>	45.5 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>: numbers with distinct superscripts in the column differ, for P<0.05

\* Blastocyst rates based on total number of cleaved embryos on Day 2 of IVC, per group.



**Figure 1.** Total number of cells (Means  $\pm$  SD) in Day-7 *in vitro*-produced pig parthenogenetic (Parthenotes) or cloned (SCNT) blastocysts after treatment or not with Scriptaid after activation. <sup>a,b</sup>: Column bars with different superscripts differ, for  $P < 0.05$

**5. CAPÍTULO 2**

Efficient porcine embryo gene editing by electroporation of CRISPR/Cas9  
ribonucleoprotein complexes

Felipe Ledur Ongaratto, Paula Rodriguez Villamil P, Uyanga Ganbaatar, Staci Solin,

Marcelo Bertolini, Daniel Fred Carlson

EFFICIENT PORCINE EMBRYO GENE EDITING BY ELECTROPORATION OF  
CRISPR/CAS9 RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEXES

Ongaratto FL<sup>1,2</sup>, Rodriguez-Villamil P<sup>1,2</sup>, Ganbaatar U<sup>2</sup>, Solin S<sup>2</sup>, Bertolini M<sup>1§</sup>, Carlson  
DF<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre,  
RS, Brazil

<sup>2</sup>Recombinetics Inc., Minnesota, USA

<sup>§</sup>Corresponding author: Marcelo Bertolini

Postal address: Embryology and Biotechnology of Reproduction Lab,  
School of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS)  
Av. Bento Goncalves, 9090 -Porto Alegre, RS - Brazil - 91.540-000  
E-mail addresses: marcelo.bertolini@ufrgs.br

## ABSTRACT

Gene editing by microinjection is an efficient system to produce mutant livestock; however, microinjection requires special skills and is too time-consuming to produce edited animals on a large scale. Therefore, the aim of this study was to develop a system to deliver CRISPR-Cas9/RNP (Ribonucleoprotein) complex by electroporation into parthenogenetic porcine zygotes, targeting two distinct genes. The use of electroporation resulted in highly efficient targeted gene editing, with 100% NHEJ editing rate in the *Rosa26 locus* and 75% in the PAH gene. However, the HDR efficiency was low, requiring improvements in the process to reach higher HDR rates. In conclusion, electroporation of Cas9/RNPs is an efficient alternative to microinjection for gene editing in porcine zygotes.

Keywords: Electroporation, Ribonucleoprotein, CRISPR, safe harbor *loci*, pigs.

## INTRODUCTION

Genome editing technologies have had a profound impact on fundamental, clinical, and industrial research involving genetic manipulation in animals. Genetic engineering to modify the genome of animals has a larger role than just for production traits. For example, since the genome of the domestic pig (*Sus scrofa domestica*) was sequenced in 2012, researchers observed that such animals have genetic as well as anatomical and physiological similarities to humans that could be more advantageous than mice to be used as models for humans (Neff, 2019). Pigs can contribute to our health by serving as model systems for treatment of diseases and disorders as well as a source of biomaterials used for rebuilding tissues and organs (Kues & Niemann, 2004; Snaith & Törnell, 2002). Thus, developing efficient methodologies in the pig that can be applied to produce genetically modified animals is a main task to obtain satisfactory and repeatable results.

Recently, the rapid development of custom-made endonucleases, such as zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs), and especially the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas) technology, has opened a new era for site-specific genome editing. Zygote microinjection with Cas9/gRNA has been shown to be an efficient strategy for generating gene knockout pigs (Hai *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). However, due to the fact that pigs require a rather high number of embryos for the establishment of pregnancies to obtain live births, the processes involving micromanipulation of oocytes and embryos become laborious and time-consuming to attain the required number of structures for a proper

transfer to surrogate females (Rim *et al.*, 2013). In addition, it is known that costly pieces of equipment and high level of training is a must in order to attain consistent, repeatable results.

Electroporation is becoming an alternative to produce genetic engineered animals. Several groups have been demonstrating that electroporation has the capacity to delivery Cas9 mRNA, guide RNAs, short single-stranded oligonucleotides (ssODN) and Cas9/sgRNA ribonucleoproteins as DNA repair templates for gene edition in mouse zygotes (Kaneko *et al.*, 2014; Hashimoto *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2015; Tröder *et al.*, 2018). Nevertheless, the technique has some hurdles, making it more difficult in some species, such as cattle (Wei *et al.*, 2018), with variable results among existing protocols (Tröder *et al.*, 2018).

For swine embryos, electroporation is still an incipient procedure. Currently, only one group has shown results demonstrating the editing of porcine embryos using sgRNA/Cas9 protein (Tanihara *et al.*, 2016; Tanihara *et al.*, 2019). Thus, the increase in efficiency in the procedure will allow the editing of a large number of zygotes in a short time, which contrasts with microinjection. In addition, the use of the CRISPR/Cas9 system combined with ribonucleoprotein complexes may be a reliable and efficient alternative to produce targeted gene modifications (Kim *et al.*, 2014). Electroporation of pre-assembled Cas9/sgRNA ribonucleoproteins (RNP) in mice was proven to drastically enhance transgenic efficiency (Chen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Cas9 RNPs consist of purified Cas9 protein in complex with a gRNA. The complex is assembled *in vitro* and can be delivered directly to cells using standard electroporation or transfection techniques. Cas9



RNPs are capable of cleaving genomic targets with similar efficiency as compared to plasmid-based expression of Cas9/gRNA, and can be used for most of the current genome engineering applications of CRISPR, including generating single or multi-gene knockouts in a wide variety of cell types, gene editing using homology directed repair (HDR), and generating large genomic deletions (Chen *et al.*, 2016). The RNP, when paired with a DNA donor, comprises a “total package” that does not require the cellular environment to synthesize Cas9 and sgRNA, and ensures temporal coordination of the editing reagents (Farboud *et al.*, 2018). Thus, the aim of this study was to evaluate the efficiency of porcine zygote edition by delivering CRISPR/Cas9 RNP complexes by electroporation, comparing different electroporation parameters, such as number of pulses and pulse amplitude, with the commonly used microinjection procedure, evaluating two distinct genes sequences (Rosa26 and PAH) to observe the differences on the mutation rates depending on the *locus* and procedure system. The establishment of a reliable and reproducible protocol in different laboratories that can be performed near the site of *in vivo* zygote collection, without the need of expensive pieces of equipment, along with adequate repeatability in the procedures, will boost the overall efficiency in the generation of genetic engineered animals.

## MATERIAL AND METHODS

All chemicals were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), unless stated otherwise.

### *Ethics statement*

The study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Recombinetics, Inc.

### *In vitro maturation and parthenogenic activation*

*Cumulus*-oocyte complexes (COCs) were obtained from a commercial supplier (DeSoto Biosciences, Inc., Seymour, TN, USA). Approximately 50 oocytes were *in vitro*-matured in transportation plastic tubes at 39°C in 5% CO<sub>2</sub> in air, in 2 mL IVM medium composed of TCM199 supplemented with 10% porcine follicular fluid (PFF), 0.57 mM cysteine, 25 μM β-mercaptoethanol, 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF), 10 ng/mL IGF1, 10 IU/mL pregnant mare serum gonadotropin (PMSG), and 10 IU/mL human chorionic gonadotropin (hCG) for 22 h. In the second stage of IVM (22-44 h), oocytes were placed in four-well multi-dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) in 500 μL of maturation media II, which was the same IVM medium without hormones, as previously described (Liu *et al.*, 2014). After IVM, COCs were briefly exposed to 0.1% hyaluronidase for *cumulus* cell removal by vortexing for 6-8 min. Then, denuded oocytes were moved into holding medium until activation. Chemical activation was performed by exposure to 5 μM ionomycin in HEPES-buffered TCM-199 medium with 0.4% BSA (w/v) for 5 min at 39°C in air, protected from light. After the incubation, oocytes were further incubated for 4 h in 2 mM 6-DMAP in PZM-3 medium. Parthenote embryos were then *in vitro*-cultured in PZM-3 medium + 4 mg/mL BSA, according to Cao *et al.* (2012), at 39°C in 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> under controlled atmosphere up to Day 7 of development (controls), or until microinjection or electroporation.

### *Generation of guide RNAs*

Both crRNA and tracrRNA (IDT, Iowa, USA) were resuspended in injection buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) to 200  $\mu$ M concentration. The crRNAs targeting *Sus scrofa* PAH or ROSA26 gene sequences were duplexed with tracrRNA at an equimolar ratio by heating to 95°C for 5 min and cooling to 22°C at 5°C/min in a thermocycler. To form the RNP complexes, duplexed gRNA was incubated with Cas9 protein (IDT, North Dakota, USA) at a final concentration of 500 ng/ $\mu$ L each (duplexed gRNA and protein). For homology-driven recombination (HDR) experiments, a 90 bp ssODN template to each targeted gene was added to the RNP complexes after RT incubation to a final concentration of 400 ng/ $\mu$ L.

For microinjection, the RNP solution was diluted in injection buffer to a final concentration of 25 ng/ $\mu$ L duplexed gRNA, 25 ng/ $\mu$ L Cas9 protein, and 40 ng/ $\mu$ L ssODN HDR template, when included. For electroporation, the RNP solution was diluted in injection buffer to a final concentration of 250 ng/ $\mu$ L duplexed gRNA, 250 ng/ $\mu$ L Cas9 protein, and 400 ng/ $\mu$ L ssODN HDR template, when included.

### *Microinjection*

Zona-intact parthenote embryos, 4 h after activation, were washed in holding medium and prepared for microinjection. Zygotes were incubated for 5 min in a microinjection medium (TCM 199 + 0.4% BSA + 5  $\mu$ g/mL cytochalasin B) under oil, on a thermal plate at 37.5°C. Complexes Cas9 protein/sgRNA were loaded into the microinjection needle using microloader tips (Eppendorf, Germany). Then, needles were placed in a universal capillary holder controlled by a micromanipulator (Eppendorf) coupled to a microinjection apparatus

(Femtojet 4i Microinjector, Eppendorf, Germany). Microinjection volume was approximately 15 pL (1.5% of total embryo volume). Microinjected parthenogenetic embryos were *in vitro*-cultured to the blastocyst stage in PZM3 medium at 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> under controlled atmosphere for 7 days, as control embryos.

### *Electroporation*

Electroporation was performed as described by Hashimoto *et al.* (2015), with modifications. Briefly, the electrode slide (0.5 mm) was connected to an electroporator (BTX ECM-2001, Harvard Bioscience. Inc, Massachusetts, USA) and set under a stereomicroscope. Parthenote embryos were washed in Opti-MEM I solution (Life Technologies, California, USA) and placed into the gap for the chamber slide (0.5 mm), filled with 5 µL Opti-MEM I solution containing Cas9/sgRNA. Electroporation was then performed under various parameters, varying number of pulses, and pulse amplitude, with duration time set at 3 ms. After electroporation, zygotes were washed in PZM-3 and subsequently *in vitro*-cultured at 39°C in 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> under controlled atmosphere for 7 days, as control embryos.

### *Blastocyst whole genome amplification and genotyping analysis*

Individual Day-7 blastocysts from each group were washed three times and stored in <0.3 µL of 1X DPBS/PVA at -20°C. Blastocysts were thawed and whole genome amplified (WGA) using the REPLI-g Mini Kit (Qiagen, Maryland, USA) using a protocol for amplification from cells, as recommended by the manufacturer. After whole genome amplification, genomic samples were diluted 1:1 with 10 mM Tris-HCl, 0.33 mM EDTA

and stored at -20°C until use. Whole genome amplified samples were analyzed by PCR using Accustart II PCR Supermix 2X (QuantaBio, Massachusetts, USA) with specific primers for the ROSA26 (F: 5'-GCC TGA AGG ACG AGA CTA GC-3', R: 5'-AAC ACG CAG TCT CAA TGC AT-3') and PAH (F: 5'-CTT CAC CTC TCA GCC TGG TC-3', R: 5'- TGC CAC GTT TCG TTC TCT CA-3') gene sequences. Amplicons were purified using QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and Sanger sequenced by ACGT (<http://www.acgtinc.com/research-services/dna-sequencing-services/single-pass-dna-sequencing/>).

### *Experimental design*

In Experiment 1, different parameters for electroporation with Cas9/ssPAH were tested in comparison with the microinjection of 1-cell stage pig parthenote embryos. For the electroporation, a concentration of 250 ng/μL Cas9 protein and 250 ng/μL gRNA complex was used, for four distinct parameters, using the combinations of 40 or 60 V/mm, in 1 or 3 pulses, with all pulses set at 3 ms. For the microinjection, a concentration of 25 ng/μL Cas9 protein and 25 ng/μL gRNA was used. Zygotes for the Control group were only activated without micromanipulation or electroporation. In Experiment 2, complexes Cas9/ssRosa26 at the same concentrations as described above were used for either microinjection or electroporation. However, in this experiment, a lower voltage parameter was used for the electroporation, set as 20 and 40 V/mm, in 1 or 3 pulses of 3 ms. The Control group was composed of activated zygotes without micromanipulation or electroporation. In Experiments 3 and 4, the ssPAH and ssRosa26 were used, but along with templates for HDR. For the electroporation, a concentration of 250 ng/μL Cas9 protein, 250 ng/μL gRNA, and 400 ng/μL HDR were set as standards, and for the microinjection, 25 ng/μL

Cas9 protein, 25 ng/ $\mu$ L gRNA and 40 ng/ $\mu$ L HDR were the established concentrations. However, for Experiment 3, the ssPAH+HDR was electroporated at 20 or 40 V/mm, in three pulses of 3 ms, whereas for Experiment 4, the ssRosa26+HDR was electroporated using the best voltage obtained in Experiment 3 (40 V/mm), in three pulses of 3 ms. The Control group was composed of activated zygotes without micromanipulation or electroporation. Then, all zygotes were washed in PZM-3 and subsequently *in vitro*-cultured at 39°C in 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> under controlled atmosphere for 7 days to the blastocyst stage, which were used for genotyping analysis. Cleavage and blastocyst rates were evaluated on Days 2 and 7 after activation, respectively. Figure 1 illustrates the main steps in the procedures involving the microinjection or electroporation of Cas9/sgRNA RNPs into pig parthenogenetic zygotes.

#### *Data analyses*

Cleavage and blastocyst rates were compared between groups by the Chi-square test, and gene editing rates were analyzed by the Fisher's Exact test, for P<0.05.

## **RESULTS**

In Experiment 1, the Cas9/RNP complex targeted the PAH gene, which is responsible for changes that lead to the appearance of the Phenylketonuria disease. Data regarding embryo development and gene editing efficiency are presented in Table 1. After three replicates, cleavage rates for electroporated zygotes were similar to controls, for a reduction in cleavage rates in microinjected zygotes (p<0.05) in relation to the control. Also, blastocyst rates were lower in both the microinjection and the electroporation groups with the higher

pulse frequency (three pulses), for both pulse amplitudes (20 and 40 V/mm;  $p < 0.01$ ). In addition, developmental rates were similar to controls when one pulse was used for the electroporation of pig zygotes. After blastocyst whole genome amplification and genotyping analysis, microinjection had a higher efficiency for gene editing than electroporation using 20 V/mm, and the same efficiency as the electroporation with 40 V/mm. Furthermore, for electroporation, higher pulse amplitude (voltage) increased the efficiency of ssPAH edition in Day-7 blastocysts (Table 1). Figure 2 illustrates a Sanger sequence of one embryo that was electroporated. Using the guide sequence to predict the size of the deletions, 7-8 was the number of base pairs expected to be deleted, using FORECasT – Favoured Outcomes of Repair Events at Cas9 Targets (Allen *et al.*, 2019).

In Experiment 2, the target of the induced mutations was the *Rosa26* gene, known as a safe harbor *locus* more conducive to be edited without loss of function or repair by the cell. In this experiment, the amplitude electroporation pulses (40 or 60 V/mm) was increased to attempt greater mutation rates and to evaluate the effects of the higher voltage on embryo development. Cleavage rates were similar between the microinjected, electroporated and control zygotes, although a reduction in cleavage was observed when the higher voltage (60 V/mm) and greater number of pulses (three) were applied. Similarly, blastocyst rates were also lower only in the 60 V/mm and three pulses group compared to controls (Table 2). Regarding gene editing, and contrary to what was observed in Experiment 1, microinjected embryos had the lowest editing rate of the experimental groups (30%), and all the electroporation conditions showed the same editing rates, proving the efficiency of the procedure for the gene editing of the *Rosa26 locus* using RNP (Table 2). Figure 4 shows a

Sanger sequence of one electroporated blastocyst, with a 6 base pairs deletion, consistent with the *in-silico* prediction (Allen *et al.*, 2019).

When comparing the outcome between Experiments 1 and 2, based on the electroporation parameters, the number of pulse repeats had important effects on embryos (Figure 3). Embryo development rates were affected in both *loci* depending on the number of pulses, irrespective of the voltage applied. Embryos electroporated with three pulse repeats had lower blastocyst rates for all groups in comparison with only one repeat (Figure 3a). However, the number of pulses did not affect the editing efficiency in each *locus*, with a better editing rate in the *Rosa26 locus* (Figure 3b).

In Experiment 3, microinjection and electroporation set at 20 or 40 V/mm aimed to edit zygotes using RNP complexes adding a template for repair by homologous recombination (HDR) at the PAH gene sequence. Cleavage rates were similar between all groups, but a reduction in blastocyst development was observed in microinjected and 40 V/mm electroporated groups when compared to the control group, being similar between one another (Table 3). Despite the small number of resulting embryos, the edition was higher in the microinjected group, followed by the electroporated embryos using 40 V/mm, with the lowest proportion of edited embryos seen in the 20 V/mm group. Regarding HDR, only blastocysts produced by electroporation using 40 V/mm showed gene edition by homologous recombination (Table 3).



In Experiment 4, microinjection and electroporation comparing one or three pulses of 40 V/mm aimed to edit zygotes using RNP complexes adding a template for repair by homologous recombination (HDR) at the *Rosa26 locus* (Table 4). Cleavage rates were lower for microinjected embryos, compared to the other groups. All experimental groups had a lower embryo production rate than the control group. The mutation rates were higher for the electroporated group subjected to three 40 V/mm pulses, but embryos showing HDR mutations only appeared in embryos electroporated with one 40 V/mm pulse and in microinjected embryos.

## **DISCUSSION**

The importance of the domestic pig as a model for agricultural and biomedical applications is well documented (Perleberg *et al.*, 2018; Bollen *et al.*, 2018). From a biomedical standpoint, arguably the pig (and other livestock species) is better suited for investigating diabetes, cardiovascular and metabolic disorders than the mouse or other phylogenetically distant animal models (Park *et al.*, 2017).

Cloning by SCNT is a powerful tool and the gold standard procedure to generate genetically modified pigs. However, because of the complex procedure needed to prepare mutant embryos, the efficiency of the tool depends on the operator skills (Tanihara *et al.*, 2018). In the same way, the microinjection of porcine zygotes is an alternative to produce genetically modified animals. Nevertheless, microinjection has the disadvantage of being a technique that also requires expensive pieces of equipment and highly trained personnel,

aside from being difficult to standardize between laboratories due to the many variables to obtain a constant volume of injection (i.e., pipette thickness, pressure, density of the solution, etc.; Lee, 1989; Chow *et al.*, 2016).

Several authors have proven the effectiveness of the use of electroporation to deliver single or dual guide RNA/Cas9 to produce genetically modified (GM) animals in mice, cattle and pigs (Kaneko & Mashimo, 2015; Wei *et al.*, 2018; Tanihara *et al.*, 2016). Also, some studies have already approached the use of RNP complexes to produce mutant animals. However, most of such studies using such approach were performed in mice (Chen *et al.*, 2016; Teixeira *et al.*, 2018; Tröder *et al.*, 2018), obtaining satisfactory gene editing results. Until now, the use of RNP in pig embryos was only performed using microinjection, with 33–60% of mutation levels among viable piglets (Park *et al.*, 2017). Furthermore, the production of transgenic pigs by electroporation was performed by a few research groups, using single guide RNA (Nishio *et al.*, 2018; Tanihara *et al.*, 2016; Tanihara *et al.*, 2018). Thus, our studies attempted to study and accomplish the use of RNP complexes to generate genetic modifications in pig zygotes through the electroporation system.

With the objective to create a standard electroporation protocol, we devised a procedure that does not require zona pellucida (ZP) removal. It is known that the chemical ZP removal with Tyrode or Pronase solutions may have harmful effects on embryo development (Modliński, 1970; Phophong *et al.*, 2001). In this way, by avoiding the ZP removal pretreatment, as commonly applied for the electroporation of mouse (Chen *et al.*,

2016; Wang *et al.*, 2016) and cattle (Wei *et al.*, 2018) embryos, we were able to produce GM porcine embryos with intact ZP, as also reported elsewhere (Tanihara *et al.*, 2016).

The electroporation of zygotes usually takes place in electroporation cuvettes (Kaneko & Mashimo, 2015; Chen *et al.*, 2016; Tröder *et al.*, 2018), with such cuvettes having a volume ranging from 90  $\mu\text{L}$  to 800  $\mu\text{L}$ , requiring a large amount of components for the electroporation (Cas9 protein, gRNA, etc). Our protocol used 0.5mm microslides, normally used in fusion during SCNT cloning procedures, and a total volume of only 5  $\mu\text{L}$  of the CRISPR/Cas9 RNP solution. This drastic reduction in volume allows electroporation to be economically viable. Thus, aside from economic feasibility, we established a protocol for editing porcine zygotes by electroporation with high editing rate (64 – 100%), and a high survival rate. Such results are even higher than those presented by other groups using electroporation of Cas9 and sgRNA (90% editing; Tanihara *et al.*, 2016).

Studies by Nishio *et al.* (2018) demonstrated that modifications in electroporation parameters, as pulse number, duration, and amplitude, were determinant on the survival and gene editing rates in porcine zygotes. Thus, our experiments, in attempt to standardize the best protocol for each targeted gene to modify porcine zygotes by electroporation, we varied the electroporation voltage and number of pulse repeats. Our results corroborated with those authors, confirming that electroporation parameters had major effects on embryo survival and development, and on mutation rates of porcine embryos (Figure 3), but also demonstrated that such effects appeared to be dependent on the target gene.

We observed a trend for higher mutation rates when higher voltage values were applied (70% at 40 V/mm; 100% at 60 V/mm). We also observed that embryonic survival appeared to be inversely proportional to gene editing. In this way, we attempted to determine the proper parameters for best editing: survival ratio to be applied to subsequent experiments. Gene editing outcome behaved differently according to the target gene (PAH vs. Rosa26). The genetic manipulation of the PAH gene aimed at the generation of animals predisposed to phenylketonuria, as animal models, which has a great importance for the study of such disease in humans and animals. As expected, the editing rate in a safe Harbor *locus*, such as the Rosa26, was more effective than in the PAH gene (Figure 3). Safe harbor *loci* are described as regions where an exogenous DNA can be targeted with relative ease by homologous recombination, supporting strong ubiquitous expression of inserted sequences while not being subjected to gene silencing (Irion *et al.*, 2007). The proportion of the embryos edited in the safe harbor Rosa26 *locus* was quite consistent, demonstrating that electroporation is a very valuable procedure for the production of mutant pigs.

In the first two experiments, electroporation was used to generate double strand breaks (DSB) and deletions of some base pairs at the desired *loci* (PAH and ROSA26). This deletion was most often consistent with the *in-silico* prediction (Fig. 4), according to the sequence of primers used. However, the major challenge for transgenic animal production is to induce the HDR pathway, in which a template is used for the perfect repair and insertion of the desired sequence into the desired genome location. Our results showed that the use of CRISPR/Cas9 RNP complexes with the addition of an HDR template was not effective to homologously integrate the exogenous DNA sequence in both *loci*. The

production of *knockin* animals by HDR is still a rather unknown process in embryos, with the majority of the studies focused on an increase in HDR frequency made in cultured cells, using NEHJ blocking molecules, such as SCR7 or NU7441 (Gerlach *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2017) or via RNAi. A few studies have obtained satisfactory HDR frequencies after microinjecting ssODN and using several different sgRNA (Wang *et al.*, 2016). We hypothesized that the addition of a 90-pb template would generate a large RNP complex, which could preclude the transfer of the complex through the ZP during the electroporation process, reducing the editing rates even by NHEJ. In this study, at the best-case scenario, as we aimed the *Rosa26 locus*, we observed a frequency of 100% of edited embryos without HDR, and 77% when using the HDR template. Our next step will be to test whether the thinning of the zona pellucida may facilitate the entry of the gene editing/HDR components, as a means to increase editing rates through the HDR repair pathway.

In summary, the electroporation of pig zygotes using the new editing tools, such as the CRISPR/Cas9 system, is an extremely modern procedure that needs to be refined for its use in embryos, so that a reliable protocol for the production of GM animals can be attained, with consistent results for most genome sequences. We have developed a viable and efficient electroporation system for the production of genetically modified pigs by NHEJ at different *loci*, promoting the deletion of base pairs at targeted genes, using the electroporation of CRISPR/Cas9 RNP complexes. The electroporation process and the generation of guide RNAs should be more studied to improve the HDR frequency. Thus, the optimized method for electroporating pig zygotes should override the time-consuming method of micromanipulation.

## REFERENCES

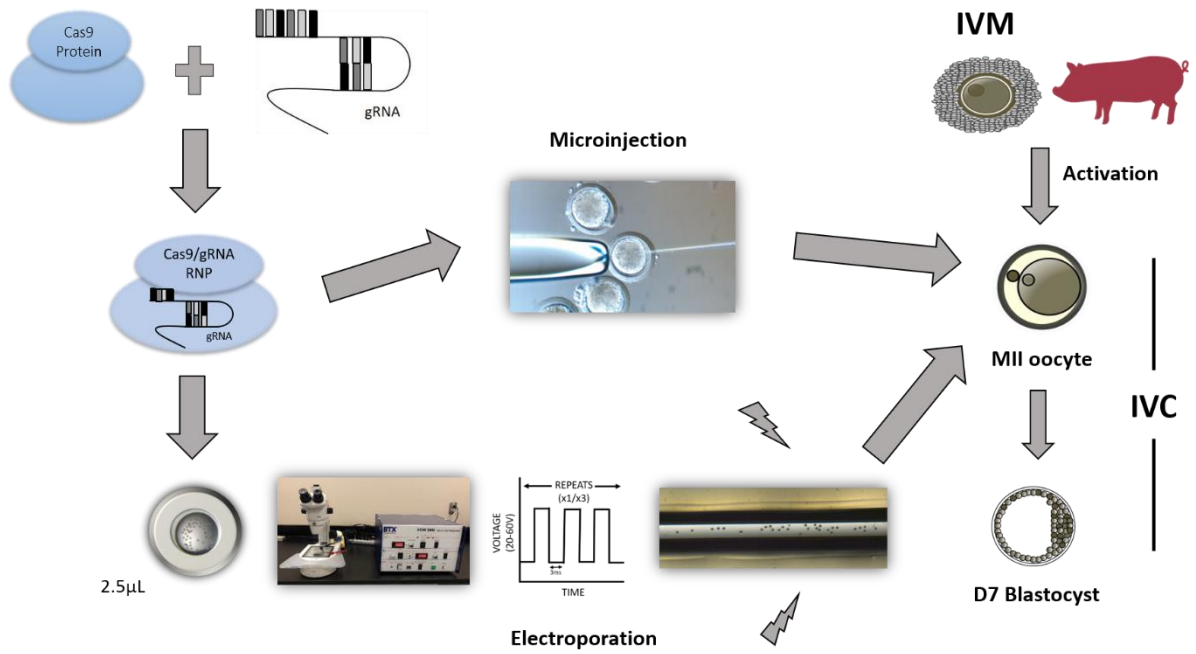
- Allen, F., Crepaldi, L., Alsinet, C., Strong, A.J., Kleshchevnikov, V., De Angeli, P., Páleníková, P., Khodak, A., Kiselev, V., Kosicki, M. and Bassett, A.R., 2019. Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nature Biotechnology*, 37(1), p.64.
- Bollen, Y., Post, J., Koo, B.K., & Snippert, H.J., 2018. How to create state-of-the-art genetic model systems: strategies for optimal CRISPR-mediated genome editing. *Nucleic Acids Research*, 46(13), 6435-6454.
- Chen, S., Lee, B., Lee, A.Y.F., Modzelewski, A.J. and He, L., 2016. Highly efficient mouse genome editing by CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes. *Journal of Biological Chemistry*, 291(28), pp.14457-14467.
- Farboud, B., Jarvis, E., Roth, T.L., Shin, J., Corn, J.E., Marson, A., Meyer, B.J., Patel, N.H. and Hochstrasser, M.L., 2018. Enhanced genome editing with Cas9 ribonucleoprotein in diverse cells and organisms. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (135).
- Gerlach, M., Kraft, T., Brenner, B., Petersen, B., Niemann, H. and Montag, J., 2018. Efficient knock-in of a point mutation in porcine fibroblasts using the CRISPR/Cas9-GMNN fusion gene. *Genes*, 9(6), p.296.
- Hai, T., Teng, F., Guo, R., Li, W. and Zhou, Q., 2014. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Research*, 24(3), p.372.
- Hashimoto, M. and Takemoto, T., 2015. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Scientific Reports*, 5, p.11315.

- Kaneko, T., Sakuma, T., Yamamoto, T. and Mashimo, T., 2014. Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Scientific Reports*, 4, p.6382.
- Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J. and Kim, J.S., 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research*, 24(6), pp.1012-1019.
- Kues, W.A. and Niemann, H., 2004. The contribution of farm animals to human health. *TRENDS in Biotechnology*, 22(6), pp.286-294.
- Modliński, J.A., 1970. The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo. *Development*, 23(3), pp.539-547.
- Neff, E.P., 2019. Cancer modeling thinks big with the pig. *Lab Animal*, p.1.
- Nishio, K., Tanihara, F., Nguyen, T.V., Kunihara, T., Nii, M., Hirata, M., Takemoto, T. and Otoi, T., 2018. Effects of voltage strength during electroporation on the development and quality of in vitro-produced porcine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(2), pp.313-318.
- Park, K.E., Powell, A., Sandmaier, S.E., Kim, C.M., Mileham, A., Donovan, D.M. and Telugu, B.P., 2017. Targeted gene knock-in by CRISPR/Cas ribonucleoproteins in porcine zygotes. *Scientific Reports*, 7, p.42458.
- Phophong, P., Doshi, A. and Harper, J.C., 2001. Comparison of embryonic development in cleavage stage mouse embryo biopsy between acid Tyrode's solution and laser assisted techniques. *Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmai het thangphaet*, 84(8), pp.1190-1198.

- Qin, W., Dion, S.L., Kutny, P.M., Zhang, Y., Cheng, A., Jillette, N.L., Malhotra, A., Geurts, A.M., Chen, Y.G. and Wang, H., 2015. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing in mice by zygote electroporation of nuclease. *Genetics*, pp.genetics-115.
- Snaith, M.R. and Törnell, J., 2002. The use of transgenic systems in pharmaceutical research. *Briefings in Functional Genomics*, 1(2), pp.119-130.
- Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, N.T., Le, Q.A., Hirano, T., Takemoto, T., Nakai, M., Fuchimoto, D.I. and Otoi, T., 2019. Generation of PDX-1 mutant porcine blastocysts by introducing CRISPR/Cas9-system into porcine zygotes via electroporation. *Animal Science Journal*, 90(1), pp.55-61.
- Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, N.T., Le, Q.A., Hirano, T., Takemoto, T., Nakai, M., Fuchimoto, D.I. and Otoi, T., 2018. Generation of a TP53-modified porcine cancer model by CRISPR/Cas9-mediated gene modification in porcine zygotes via electroporation. *PloS One*, 13(10), p.e0206360.
- Tanihara, F., Takemoto, T., Kitagawa, E., Rao, S., Do, L.T.K., Onishi, A., Yamashita, Y., Kosugi, C., Suzuki, H., Sembon, S. and Suzuki, S., 2016. Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. *Science Advances*, 2(9), p.e1600803.
- Teixeira, M., Py, B.F., Bosc, C., Laubretton, D., Moutin, M.J., Marvel, J., Flamant, F. and Markossian, S., 2018. Electroporation of mice zygotes with dual guide RNA/Cas9 complexes for simple and efficient cloning-free genome editing. *Scientific Reports*, 8(1), p.474.



- Tröder, S.E., Ebert, L.K., Butt, L., Assenmacher, S., Schermer, B. and Zevnik, B., 2018. An optimized electroporation approach for efficient CRISPR/Cas9 genome editing in murine zygotes. *PloS One*, 13(5), p.e0196891.
- Wang, K., Tang, X., Liu, Y., Xie, Z., Zou, X., Li, M., Yuan, H., Ouyang, H., Jiao, H. and Pang, D., 2016. Efficient generation of orthologous point mutations in pigs via CRISPR-assisted ssODN-mediated homology-directed repair. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 5, p.e396.
- Wang, X., Cao, C., Huang, J., Yao, J., Hai, T., Zheng, Q., Wang, X., Zhang, H., Qin, G., Cheng, J. and Wang, Y., 2016. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 6, p.20620.
- Wei, J., Gaynor, P., Cole, S., Brophy, B., Oback, B. and Laible, G., 2018. Developing the condition for bovine zygote-mediated genome editing by electroporation. Proceedings of the World Congress on *Genetics Applied to Livestock Production* 11.1118.
- Xie, Z., Pang, D., Wang, K., Li, M., Guo, N., Yuan, H., Li, J., Zou, X., Jiao, H., Ouyang, H. and Li, Z., 2017. Optimization of a CRISPR/Cas9-mediated Knock-in Strategy at the Porcine Rosa26 Locus in Porcine Foetal Fibroblasts. *Scientific Reports*, 7(1), p.3036.



**Figure 1.** Diagram to illustrate the microinjection and electroporation procedures in parthenogenic pig embryos using Cas9/sgRNA RNPs.

**Table 1.** Developmental rates and editing efficiency following microinjection or electroporation of parthenote 1-cell stage pig embryos with Cas9/RNP complex targeting the PAH gene (ssPAH)

Group	n	Cleavage n (%)	Blastocyst		Blastocyst analyzed n	Edited n (%)
			n (%)	% <sup>‡</sup>		
Control	89	65 (73.0) <sup>a</sup>	21 (23.6) <sup>a</sup>	32.3 <sup>a</sup>	NA	-
Microinjection	86	50 (58.1) <sup>b</sup>	7 (8.1) <sup>c</sup>	14.0 <sup>c</sup>	2	2 (100) <sup>a</sup>
20 V/mm x 1*	96	68 (70.8) <sup>ab</sup>	20 (20.8) <sup>ab</sup>	29.4 <sup>ab</sup>	16	1 (6.3) <sup>b</sup>
20 V/mm x 3*	90	62 (68.9) <sup>ab</sup>	10 (11.1) <sup>bc</sup>	16.1 <sup>bc</sup>	7	1 (14.3) <sup>b</sup>
40 V/mm x 1*	93	60 (64.5) <sup>ab</sup>	16 (17.2) <sup>abc</sup>	26.7 <sup>ab</sup>	14	9 (64.3) <sup>a</sup>
40 V/mm x 3*	90	56 (62.2) <sup>ab</sup>	9 (10.0) <sup>c</sup>	16.1 <sup>bc</sup>	8	6 (75.0) <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup>: numbers with distinct superscripts in the column differ, for P<0.05.

\*Electroporation groups. Group descriptions indicate voltage, and number of pulses. Pulse duration was set at 3 ms in all groups.

<sup>‡</sup>Blastocyst rates based on total number of cleaved embryos on Day 2 of IVC, per group.



**Figure 2.** Sanger sequencing of the PAH *locus* comparing the sequence of a wild type embryo with an edited embryo, showing deletion of eight base pairs in an electroporated pig embryo.

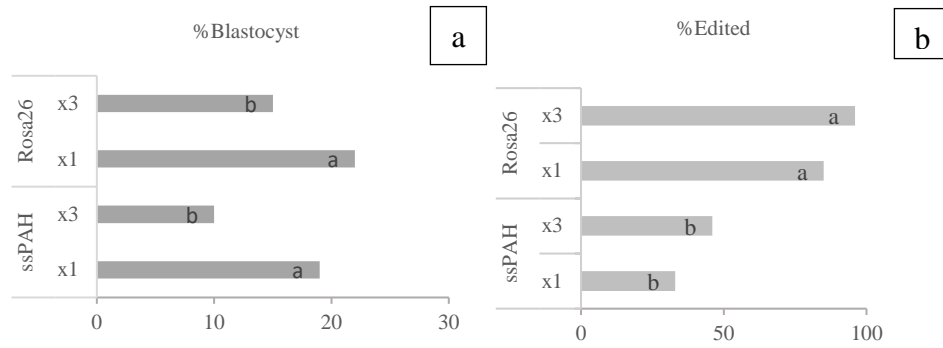
**Table 2.** Developmental rates and editing efficiency following microinjection or electroporation of parthenote 1-cell stage pig embryos with Cas9/RNP complex targeting the *Rosa26 locus* (ssRosa26).

Group	n	Cleavage n (%)	Blastocyst		Blastocyst analyzed n	Edited n (%)
			n (%)	% <sup>‡</sup>		
Control	116	73 (62.9) <sup>a</sup>	41 (35.5) <sup>a</sup>	56.2 <sup>a</sup>	NA	
Microinjection	120	82 (68.3) <sup>a</sup>	25 (20.8) <sup>b</sup>	30.5 <sup>bc</sup>	13	4 (30.8) <sup>b</sup>
40 V/mm x 1*	106	77 (72.6) <sup>a</sup>	23 (21.7) <sup>b</sup>	29.9 <sup>bc</sup>	10	7 (70.0) <sup>a</sup>
40 V/mm x 3*	105	65 (61.9) <sup>a</sup>	20 (19.0) <sup>b</sup>	30.8 <sup>bc</sup>	15	14 (93.3) <sup>a</sup>
60 V/mm x 1*	110	68 (61.8) <sup>a</sup>	26 (23.6) <sup>b</sup>	38.2 <sup>b</sup>	24	22 (91.7) <sup>a</sup>
60 V/mm x 3*	106	55 (51.9) <sup>b</sup>	11 (10.4) <sup>c</sup>	20.0 <sup>c</sup>	10	10 (100) <sup>a</sup>

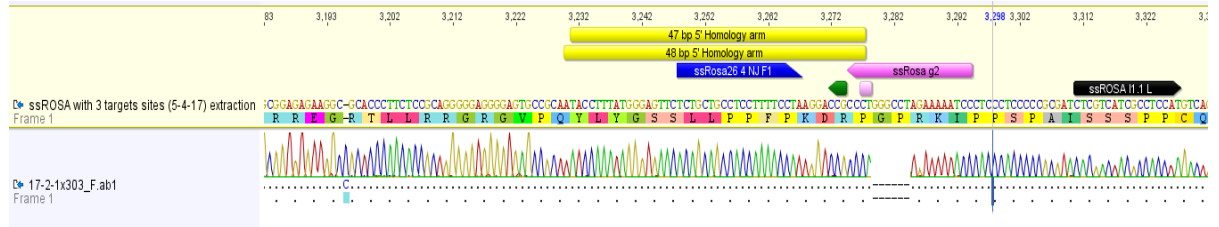
<sup>a,b,c</sup>: numbers with distinct superscripts in the column differ, for P<0.05.

\*Electroporation groups. Group descriptions indicate voltage, and number of pulses. Pulse duration was set at 3 ms in all groups.

<sup>‡</sup>Blastocyst rates based on total number of cleaved embryos on Day 2 of IVC, per group.



**Figure 3.** Effect of electroporation pulse repeats (one or three) in 1-cell pig embryos on (a) embryo development to the blastocyst stage, and (b) gene editing efficiency of Day-7 porcine blastocysts. <sup>a,b</sup>: column bars with distinct letters differ, for  $P < 0.05$ .



**Figure 4.** Sanger sequencing of the *Rosa26* locus comparing the sequence of a wild type embryo with an edited embryo, showing deletion of six base pairs in an electroporated pig embryo.

**Table 3.** Developmental rates and editing efficiency following microinjection or electroporation of parthenote 1-cell stage pig embryos with Cas9/RNP complex and PAH template targeting the ssPAH+HDR

Group	n	Cleavage n (%)	Blastocyst		Blastocyst Analyzed n	Edited		
			n (%)	% <sup>‡</sup>		NHEJ n (%)	HDR n (%)	Total n (%)
Control	50	35 (70.0) <sup>a</sup>	11 (22.0) <sup>a</sup>	31.4 <sup>a</sup>	NA	-	-	-
Microinjection	36	25 (69.4) <sup>a</sup>	4 (11.1) <sup>a</sup>	16.0 <sup>a</sup>	3	3 (100) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>b</sup>	3 (100) <sup>a</sup>
20 V/mm*	146	108 (73.9) <sup>a</sup>	28 (19.2) <sup>a</sup>	25.9 <sup>a</sup>	16	6 (37.5) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>b</sup>	6 (37.5) <sup>b</sup>
40 V/mm*	148	107 (72.3) <sup>a</sup>	20 (13.5) <sup>a</sup>	18.7 <sup>a</sup>	10	6 (60.4) <sup>a</sup>	3 (30.0) <sup>a</sup>	9 (90.0) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>: numbers with distinct superscripts in the column differ, for P<0.05.

\*Electroporation groups. Group descriptions indicate voltage. All groups were subjected to three pulses, and pulse duration was set at 3 ms in all groups.

<sup>‡</sup>Blastocyst rates based on total number of cleaved embryos on Day 2 of IVC, per group.



**Table 4.** Developmental rates and editing efficiency for electroporated parthenote pig embryos with ssRosa26+HDR under different conditions

Group	n	Cleavage n (%)	Blastocyst		Blastocyst analyzed n	Edited		
			n (%)	% <sup>‡</sup>		NHEJ n (%)	HDR n (%)	Total n (%)
Control	60	45 (75.0) <sup>ab</sup>	15 (25.0) <sup>a</sup>	33.3 <sup>a</sup>	NA	-	-	-
Microinjection	101	63 (62.4) <sup>b</sup>	9 (8.9) <sup>b</sup>	14.3 <sup>b</sup>	7	4 (57.1) <sup>a</sup>	1 (14.3) <sup>a</sup>	5 (71.4) <sup>a</sup>
1 pulse	123	96 (78.0) <sup>a</sup>	20 (16.3) <sup>ab</sup>	20.8 <sup>ab</sup>	14	8 (57.1) <sup>a</sup>	1 (7.0) <sup>a</sup>	9 (64.3) <sup>a</sup>
3 pulses	117	93 (79.8) <sup>a</sup>	10 (8.5) <sup>b</sup>	10.6 <sup>b</sup>	9	7 (77.8) <sup>a</sup>	0 (0.0) <sup>a</sup>	7 (77.8) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>: numbers with distinct superscripts in the column differ, for P<0.05.

\*Electroporation groups. Group descriptions indicate number of pulses. All groups were subjected to an amplitude of 40 V, and pulse duration was set at 3 ms in all groups.

<sup>‡</sup>Blastocyst rates based on total number of cleaved embryos on Day 2 of IVC, per group.

## 6. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados observados neste estudo, é possível concluir que:

- a) O uso de solução hipertônica a base de sacarose para a seleção de oócitos de superior qualidade é uma alternativa viável e não subjetiva para se obter melhores resultados na produção *in vitro* de embriões suínos;
- b) Com base nas taxas de clivagem, o uso de TPEN como adjuvante na ativação química de embriões suínos tem um efeito benéfico e pode aumentar a produção *in vitro* de embriões suínos;
- c) O uso de Scriptaid durante as 15 horas pós ativação química promove a produção de embriões suínos de melhor qualidade, baseado no número total de células;
- d) A eletroporação de zigotos suínos é uma alternativa eficiente para a produção de animais geneticamente modificados;
- e) É possível a produção de embriões suínos GM sem a utilização de micromanipulação;
- f) A edição sítio-dirigida à *safe harbor loci* como o Rosa26 foi mais eficiente que o *locus* PAH;
- g) Ainda é preciso avaliar as condições de eletroporação e construções gênicas para aumentar a frequência de edição por Recombinação Homóloga.

## 7. PERSPECTIVAS

A produção de suínos geneticamente modificados para a geração de modelos de enfermidades e futuramente fonte de xenotransplantes é uma demanda que a cada dia se vê mais necessária. A eficiência e precisão neste processo ainda é baixa, visto que para se obter um número razoável de animais são necessários produzir um número extremamente elevado de embriões. Para isto, pesquisas na área de embriologia e biologia molecular devem andar lado-a-lado em busca de melhores resultados.

A clonagem de suínos para a produção de animais GM é uma técnica que permanecerá na vanguarda por um bom tempo, principalmente pelas dificuldades ainda não superadas na fecundação *in vitro* de oócitos suínos (poliespermia) e pelo fato da coleta *in vivo* de zigotos ser um processo difícil e caro, para o caso de coleta *post-mortem*. Melhorar este processo passa pela obtenção e seleção de melhores oócitos utilizados no processo, além do aumento das taxas de ativação. Além destes passos já abordados, a reprogramação celular é ponto crucial na produção de clones em todas as espécies. Nossos próximos passos deverão ser o de avaliar a melhor combinação das técnicas abordadas, desde a seleção, até a ativação e reprogramação, assim como realizar uma avaliação no perfil de metilação e acetilação dos embriões produzidos após a exposição ao Scriptaid.

Quanto à eletroporação, as perspectivas são de aprimorar a técnica para a edição de zigotos suínos, visando comparar as taxas ao utilizar diferentes fontes de obtenção de zigotos (*in vivo*, partenotos ou produzidos *in vitro*). Da mesma forma, é importante continuar aprimorando a técnica para padronizar o procedimento para os diferentes *loci*.

Devido às várias combinações de procedimentos possíveis, seria importante focar também nos parâmetros de eletroporação (amplitude, duração e número de pulsos) para

padronizar igualmente dependendo do tipo de construção utilizada, devido aos diferentes comportamentos de edição por eletroporação ao se utilizar *single* ou *double guide* RNA, TALENS ou RNP. Outro aspecto a ser estudado individualmente, dentro dos fatores da eletroporação, seria a utilização de Cas9 mRNA ou Cas 9 proteína, que apresentam distintas eficiências no processo de edição.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrotis, A. and Ketteler, R., 2015. A new age in functional genomics using CRISPR/Cas9 in arrayed library screening. *Frontiers in Genetics*, 6, p.300.
- Aguiar, L.H., Ticiani, E., Rodriguez-Villamil, P., Ongaratto, F.L., Lazzarotto, C.R., Rodrigues, J.L., Bertolini, L.R. and Bertolini, M., 2017. Probability, odds and random chance: the difficult task of modulating the epigenetic profile of cloned embryos. *Animal Reproduction*, 14(1), pp.102-123.
- Baldassarre, H., Keefer, C., Wang, B., Lazaris, A. and Karatzas, C.N., 2003. Nuclear transfer in goats using in vitro matured oocytes recovered by laparoscopic ovum pick-up. *Cloning & Stem Cells*, 5(4), pp.279-285.
- Barber, M., 1904 A new method of isolating microorganisms. *Journal of Kansas Medical Society*, 4, pp.489–494.47
- Barber, M.A., 1911. A technic for the inoculation of bacteria and other substances into living cells. *The Journal of Infectious Diseases*, pp.348-360.
- Barber, M.A., 1914. The pipette method in the isolation of single micro-organisms and in the inoculation of substances into living cells. With a technique for dissection, staining, and other processes carried out under the higher powers of the microscope. *Philippine Journal of Science Biology* 9, pp.307–360.
- Bedoya, J., Meyer, C.A., Timmins, L.H., Moreno, M.R. and Moore, J.E., 2006. Effects of stent design parameters on normal artery wall mechanics. *Journal of Biomechanical Engineering*, 128(5), pp.757-765.

- Bertolini, L.R., Meade, H., Lazzarotto, C.R., Martins, L.T., Tavares, K.C., Bertolini, M. and Murray, J.D., 2016. The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. *Transgenic Research*, 25(3), pp.329-343.
- Bethhauser, J., Forsberg, E., Augenstein, M., Childs, L., Eilertsen, K., Enos, J., Forsythe, T., Golueke, P., Jurgella, G., Koppang, R. and Lesmeister, T., 2000. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nature Biotechnology*, 18(10), p.1055.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. and Bonas, U., 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326(5959), pp.1509-1512.
- Bogdanove, A.J., Schornack, S. and Lahaye, T., 2010. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(4), pp.394-401.
- Borlaug, N.E., 2000. Ending world hunger. The promise of biotechnology and the threat of antiscience zealotry. *Plant Physiology*, 124(2), pp.487-490.
- Brandsma, I. and van Gent, D.C., 2012. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integrity*, 3(1), p.9.
- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M., Senear, A.W., Warren, R. and Palmiter, R.D., 1981. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*, 27(1), pp.223-231.
- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Yagle, M.K. and Palmiter, R.D., 1985. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(13), pp.4438-4442.

- Brophy, B., Smolenski, G., Wheeler, T., Wells, D., L'Huillier, P. and Laible, G., 2003. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of  $\beta$ -casein and  $\kappa$ -casein. *Nature Biotechnology*, 21(2), p.157.
- Carlson, D.F., Tan, W., Lillico, S.G., Stverakova, D., Proudfoot, C., Christian, M., Voytas, D.F., Long, C.R., Whitelaw, C.B.A. and Fahrenkrug, S.C., 2012. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p.201211446.
- Carroll, D., 2011. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 188(4), pp.773-782.
- Casola S (2010). Mouse models for miRNA expression: the ROSA26 locus. *Methods in Molecular Biology*, 667, pp.145-163.
- Cesar, S.A., Rajan, V., Prykhozhij, S.V., Berman, J.N. and Ignacimuthu, S., 2016. Insert, remove or replace: a highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(9), pp.2333-2344.
- Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F., 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*, 39(12), pp.e82-e82.
- Chen, S., Lee, B., Lee, A.Y.F., Modzelewski, A.J. and He, L., 2016. Highly efficient mouse genome editing by CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes. *Journal of Biological Chemistry*, pp.jbc-M116.
- Chiruvella, K.K., Liang, Z. and Wilson, T.E., 2013. Repair of double-strand breaks by end joining. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(5), pp.012757.

- Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B. and Nicolas, J.F., 1995. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 15(4), pp.1968-1973.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F., 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186(2), pp.757-761.
- Cibelli, J., Wilmut, I.S., Jaenisch, R., Gurdon, J., Lanza, R., West, M. and Campbell, K.H. eds., 2013. *Principles of Cloning*. Academic press.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., de Leon, F.A.P. and Robl, J.M., 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280(5367), pp.1256-1258.
- Clark, J. and Whitelaw, B., 2003. A future for transgenic livestock. *Nature Reviews Genetics*, 4(10), p.825.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., Boyer, H.W. and Helling, R.B., 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(11), pp.3240-3244.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. and Zhang, F., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, p.1231143.
- Costantini, F. and Lacy, E., 1981. Introduction of a rabbit  $\beta$ -globin gene into the mouse germ line. *Nature*, 294(5836), p.92.
- Cui, C., Song, Y., Liu, J., Ge, H., Li, Q., Huang, H., Hu, L., Zhu, H., Jin, Y. and Zhang, Y., 2015. Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs



- production of  $\beta$ -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Scientific Reports*, 5, p.10482.
- Davis, A.J. and Chen, D.J., 2013. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translational Cancer Research*, 2(3), p.130.
- Davis, B.R., Yannariello-Brown, J., Prokopishyn, N.L., Luo, Z., Smith, M.R., Wang, J., Carsrud, N.V. and Brown, D.B., 2000. Glass needle-mediated microinjection of macromolecules and transgenes into primary human blood stem/progenitor cells. *Blood*, 95(2), pp.437-444.
- Delacôte, F., Perez, C., Guyot, V., Mikonio, C., Potrel, P., Cabaniols, J.P., Delenda, C., Pâques, F. and Duchateau, P., 2011. Identification of genes regulating gene targeting by a high-throughput screening approach. *Journal of Nucleic Acids*, 2011.
- DeWitt, M.A., Corn, J.E. and Carroll, D., 2017. Genome editing via delivery of Cas9 ribonucleoprotein. *Methods*, 121, pp.9-15.
- Dixon, J.A. and Spinale, F.G., 2009. Large animal models of heart failure: a critical link in the translation of basic science to clinical practice. *Circulation: Heart Failure*, 2(3), pp.262-271.
- Donoho, G., Jasin, M. and Berg, P., 1998. Analysis of gene targeting and intrachromosomal homologous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology*, 18(7), pp.4070-4078.
- Doudna, J.A. and Charpentier, E., 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), p.1258096.

- Doyon, Y., Vo, T.D., Mendel, M.C., Greenberg, S.G., Wang, J., Xia, D.F., Miller, J.C., Urnov, F.D., Gregory, P.D. and Holmes, M.C., 2011. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nature Methods*, 8(1), p.74.
- Durai, S., Mani, M., Kandavelou, K., Wu, J., Porteus, M.H. and Chandrasegaran, S., 2005. Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 33(18), pp.5978-5990.
- Epinat, J.C., Arnould, S., Chames, P., Rochaix, P., Desfontaines, D., Puzin, C., Patin, A., Zanghellini, A., Pâques, F. and Lacroix, E., 2003. A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 31(11), pp.2952-2962.
- Fahrenkrug, S.C., Blake, A., Carlson, D.F., Doran, T., Van Eenennaam, A., Faber, D., Galli, C., Gao, Q., Hackett, P.B., Li, N. and Maga, E.A., 2010. Precision genetics for complex objectives in animal agriculture. *Journal of Animal Science*, 88(7), pp.2530-2539.
- Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauman, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., Johnston, M., Mueller, N.D., O'Connell, C., Ray, D.K., West, P.C. and Balzer, C., 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478(7369), p.337.
- Gabriel, R., Lombardo, A., Arens, A., Miller, J.C., Genovese, P., Kaepfel, C., Nowrouzi, A., Bartholomae, C.C., Wang, J., Friedman, G. and Holmes, M.C., 2011. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nature Biotechnology*, 29(9), p.816.

- Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R. and Lazzari, G., 2003. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*, 424(6949), p.635.
- Galli, C., Lagutina, I., Perota, A., Colleoni, S., Duchi, R., Lucchini, F. and Lazzari, G., 2012. Somatic cell nuclear transfer and transgenesis in large animals: current and future insights. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, pp.2-11.
- Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M. and Toulmin, C., 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327(5967), pp.812-818.
- Golovan, S.P., Meidinger, R.G., Ajakaiye, A., Cottrill, M., Wiederkehr, M.Z., Barney, D.J., Plante, C., Pollard, J.W., Fan, M.Z., Hayes, M.A. and Laursen, J., 2001. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnology*, 19(8), p.741.
- Gordon, J.W. and Ruddle, F.H., 1981. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*, 214(4526), pp.1244-1246.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. and Ruddle, F.H., 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(12), pp.7380-7384.
- Grabarek, J.B., Plusa, B., Glover, D.M. and Zernicka-Goetz, M., 2002. Efficient delivery of dsRNA into zona-enclosed mouse oocytes and preimplantation embryos by electroporation. *Genesis*, 32(4), pp.269-276.
- Gurdon, J.B., 2006. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. *Annual Reviews in Cell and Developmental Biology*, 22, pp.1-22.

- Gyöngyösi, M., Strehblow, C., Sperker, W., Hevesi, A., Garamvölgyi, R., Petrási, Z., Pavo, N., Ferdinandy, P., Csonka, C., Csont, T. and Sylvén, C., 2006. Platelet activation and high tissue factor level predict acute stent thrombosis in pig coronary arteries: prothrombotic response of drug-eluting or bare stent implantation within the first 24 hours. *Thrombosis and Haemostasis*, 96(08), pp.202-209.
- Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad Jr, C.E., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L., 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315(6021), p.680.
- Han, Y.M., Kang, Y.K., Koo, D.B. and Lee, K.K., 2003. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 59(1), pp.33-44.
- Harrison, M.M., Jenkins, B.V., O'Connor-Giles, K.M. and Wildonger, J., 2014. A CRISPR view of development. *Genes & Development*, 28(17), pp.1859-1872.
- Hashimoto, M. and Takemoto, T., 2015. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Scientific Reports*, 5, p.11315.
- Hashimoto, M., Yamashita, Y. and Takemoto, T., 2016. Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. *Developmental Biology*, 418(1), pp.1-9.
- Heinritz, S.N., Mosenthin, R. and Weiss, E., 2013. Use of pigs as a potential model for research into dietary modulation of the human gut microbiota. *Nutrition Research Reviews*, 26(2), pp.191-209.
- Heyer, W.D., Ehmsen, K.T. and Liu, J., 2010. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual Reviews in Genetics*, 44, pp.113-139.

- Heyer, W.D., Li, X., Rolfsmeier, M. and Zhang, X.P., 2006. Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Research*, 34(15), pp.4115-4125.
- Hryhorowicz, M., Zeyland, J., Słomski, R. and Lipiński, D., 2017. Genetically modified pigs as organ donors for xenotransplantation. *Molecular Biotechnology*, 59(9-10), pp.435-444.
- 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. and Cradick, T.J., 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(9), p.827.
- Irion, S., Lucbe, H., Gadue, P., Fehling, H.J., Kennedy, M. and Keller, G., 2007. Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 25(12), p.1477.
- Jaenisch, R. and Mintz, B., 1974. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(4), pp.1250-1254.
- Jaenisch, R., 1976. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(4), pp.1260-1264.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, p.1225829.
- Joanna, Z., Magdalena, H., Agnieszka, N.T., Jacek, J., Ryszard, S., Zdzisław, S., Barbara, G. and Daniel, L., 2018. The production of UL16-binding protein 1 targeted pigs using CRISPR technology. *3 Biotech*, 8(1), p.70.

- Kaneko, T., Sakuma, T., Yamamoto, T. and Mashimo, T., 2014. Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Scientific Reports*, 4, p.6382.
- Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A. and Lahav, G., 2012. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Molecular Cell*, 47(2), pp.320-329.
- Kararli, T.T., 1995. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 16(5), pp.351-380.
- Keefer, C.L., 2015. Artificial cloning of domestic animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(29), pp.8874-8878.
- Khanna, K.K. and Jackson, S.P., 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27(3), p.247.
- Kim, H. and Kim, J.S., 2014. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 15(5), p.321.
- Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J. and Kim, J.S., 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research*, 24(6), pp.1012-1019.
- Kobayashi, T., Kato-Itoh, M., Yamaguchi, T., Tamura, C., Sanbo, M., Hirabayashi, M. and Nakauchi, H., 2012. Identification of rat Rosa26 locus enables generation of knock-in rat lines ubiquitously expressing tdTomato. *Stem Cells and Development*, 21(16), pp.2981-2986.

- Kong, Q., Hai, T., Ma, J., Huang, T., Jiang, D., Xie, B., Wu, M., Wang, J., Song, Y., Wang, Y. and He, Y., 2014. Rosa26 locus supports tissue-specific promoter driving transgene expression specifically in pig. *PLoS One*, 9(9), p.107945.
- Kuehn, M.R., Bradley, A., Robertson, E.J. and Evans, M.J., 1987. A potential animal model for Lesch–Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature*, 326(6110), p.295.
- Kues, W.A. and Niemann, H., 2004. The contribution of farm animals to human health. *TRENDS in Biotechnology*, 22(6), pp.286-294.
- Lai, L., Kang, J.X., Li, R., Wang, J., Witt, W.T., Yong, H.Y., Hao, Y., Wax, D.M., Murphy, C.N., Rieke, A. and Samuel, M., 2006. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nature Biotechnology*, 24(4), p.435.
- Laible, G. and Alonso-González, L., 2009. Gene targeting from laboratory to livestock: current status and emerging concepts. *Biotechnology Journal*, 4(9), pp.1278-1292.
- Laible, G., 2018. Production of Transgenic Livestock: Overview of Transgenic Technologies. In *Animal Biotechnology 2* (pp. 95-121). Springer, Cham.
- Lavitrano, M., Lulli, V., Maione, B., Sperandio, S. and Spadafora, C., 1998. Sperm-mediated gene transfer. In *Microinjection and Transgenesis*, pp. 229-254.
- Li, X. and Heyer, W.D., 2008. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, 18(1), p.99.
- Li, X., Yang, Y., Bu, L., Guo, X., Tang, C., Song, J., Fan, N., Zhao, B., Ouyang, Z., Liu, Z. and Zhao, Y., 2014. Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing. *Cell Research*, 24(4), p.501.

- Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Zou, Y., Quintanilla, R., Sridharan, M., Carte, J., Chen, W., Roark, N., Ranganathan, S. and Ravinder, N., 2015. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *Journal of Biotechnology*, 208, pp.44-53.
- Lieber, M.R., 2008. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1), pp.1-5.
- Lieber, M.R., 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79, pp.181-211.
- Lin, S., Staahl, B.T., Alla, R.K. and Doudna, J.A., 2014. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife*, 3, p.04766.
- Lin, T.P., 1966. Microinjection of mouse eggs. *Science*, 151(3708), pp.333-337.
- Liu, Z., Cai, Y., Wang, Y., Nie, Y., Zhang, C., Xu, Y., Zhang, X., Lu, Y., Wang, Z., Poo, M. and Sun, Q., 2018. Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 172(4), pp.881-887.
- Lopes, M.S., Bovenhuis, H., van Son, M., Nordbø, Ø., Grindflek, E.H., Knol, E.F. and Bastiaansen, J.W.M., 2017. Using markers with large effect in genetic and genomic predictions. *Journal of Animal Science*, 95(1), pp.59-71.
- Maeder, M.L., Thibodeau-Beganny, S., Sander, J.D., Voytas, D.F. and Joung, J.K., 2009. Oligomerized pool engineering (OPEN): an 'open-source' protocol for making customized zinc-finger arrays. *Nature Protocols*, 4(10), p.1471.



- Mak, I.W., Evaniew, N. and Ghert, M., 2014. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *American Journal of Translational Research*, 6(2), p.114.
- McEvoy, T.G., Coull, G.D., Broadbent, P.J., Hutchinson, J.S. and Speake, B.K., 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118(1), pp.163-170.
- McMichael, A.J., 2012. Insights from past millennia into climatic impacts on human health and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13), pp.4730-4737.
- Miller, J.C., Holmes, M.C., Wang, J., Guschin, D.Y., Lee, Y.L., Rupniewski, I., Beausejour, C.M., Waite, A.J., Wang, N.S., Kim, K.A. and Gregory, P.D., 2007. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology*, 25(7), p.778.
- Miller, J.C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K.A., Wang, J., Xia, D.F., Meng, X., Paschon, D.E., Leung, E., Hinkley, S.J. and Dulay, G.P., 2010. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*, 29(2), p.143.
- Mimitou, E.P. and Symington, L.S., 2009. Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(5), pp.264-272.
- Moscou, M.J. and Bogdanove, A.J., 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326(5959), pp.1501-1501.
- Murray, J.D., Nancarrow, C.D., Marshall, J.T., Hazelton, I.G. and Ward, K.A., 1989. Production of transgenic merino sheep by microinjection of ovine metallothionein-ovine growth hormone fusion genes. *Reproduction, Fertility and Development*, 1(2), pp.147-155.

- Ning, S.F., Li, Q.Y., Liang, M.M., Yang, X.G., Xu, H.Y., Lu, Y.Q., Lu, S.S. and Lu, K.H., 2013. Methylation characteristics and developmental potential of Guangxi Bama minipig (*Sus scrofa domestica*) cloned embryos from donor cells treated with trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Zygote*, 21(2), pp.178-186.
- Ochi, T., Blackford, A.N., Coates, J., Jhujh, S., Mehmood, S., Tamura, N., Travers, J., Wu, Q., Draviam, V.M., Robinson, C.V. and Blundell, T.L., 2015. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science*, 347(6218), pp.185-188.
- Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. and Perry, A.C., 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 289(5482), pp.1188-1190.
- Paix, A., Folkmann, A., Rasoloson, D. and Seydoux, G., 2015. High efficiency, homology-directed genome editing in *Caenorhabditis elegans* using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Genetics*, pp.genetics-115.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. and Van Steirteghem, A.C., 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*, 340(8810), pp.17-18.
- Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C. and Evans, R.M., 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 300(5893), p.611.
- Pardo, B., Gómez-González, B. and Aguilera, A., 2009. DNA repair in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6), pp.1039-1056.

- Pattanayak, V., Ramirez, C.L., Joung, J.K. and Liu, D.R., 2011. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nature Methods*, 8(9), p.765.
- Peng, H., Wu, Y. and Zhang, Y., 2012. Efficient delivery of DNA and morpholinos into mouse preimplantation embryos by electroporation. *PloS One*, 7(8), p.43748.
- Perleberg, C., Kind, A. and Schnieke, A., 2018. Genetically engineered pigs as models for human disease. *Disease Models & Mechanisms*, 11(1), p.030783.
- Petersen, B., 2018. DNA Nucleases and their Use in Livestock Production. In *Animal Biotechnology 2* (pp. 123-148). Springer, Cham.
- Phelps, C.J., Koike, C., Vaught, T.D., Boone, J., Wells, K.D., Chen, S.H., Ball, S., Specht, S.M., Polejaeva, I.A., Monahan, J.A. and Jobst, P.M., 2003. Production of  $\alpha 1$ , 3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 299(5605), pp.411-414.
- Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L. and Colman, A., 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407(6800), p.86.
- Prather, R.S., Barnes, F.L., Sims, M.M., Robl, J.M., Eyestone, W.H. and First, N.L., 1987. Nuclear Transplantation in the Bovine Embryo: Assessment of Donor Nuclei and Recipient Oocyte. *Biology of Reproduction*, 37(4), pp.859-866.
- Pratt, F.H. and Eisenberger, J.P., 1919. The quantal phenomena in muscle: methods, with further evidence of the all-or-none principle for the skeletal fiber. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 49(1), pp.1-54.

- Proudfoot, C., Carlson, D.F., Huddart, R., Long, C.R., Pryor, J.H., King, T.J., Lillico, S.G., Mileham, A.J., McLaren, D.G., Whitelaw, C.B.A. and Fahrenkrug, S.C., 2015. Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Research*, 24(1), pp.147-153.
- Qin, W., Dion, S.L., Kutny, P.M., Zhang, Y., Cheng, A.W., Jillette, N.L., Malhotra, A., Geurts, A.M., Chen, Y.G. and Wang, H., 2015. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing in mice by zygote electroporation of nuclease. *Genetics*, 200(2), pp.423-430.
- Qiu, X., Xiao, X., Martin, G.B., Li, N., Ling, W., Wang, M. and Li, Y., 2018. Strategies for improvement of cloning by somatic cell nuclear transfer. *Animal Production Science*.
- 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. and Zhang, F., 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), pp.1380-1389.
- Raveux, A., Vandormael-Pournin, S. and Cohen-Tannoudji, M., 2017. Optimization of the production of knock-in alleles by CRISPR/Cas9 microinjection into the mouse zygote. *Scientific Reports*, 7, p.42661.
- Rogers, C.S., Stoltz, D.A., Meyerholz, D.K., Ostedgaard, L.S., Rokhlina, T., Taft, P.J., Rogan, M.P., Pezzulo, A.A., Karp, P.H., Itani, O.A. and Kabel, A.C., 2008. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science*, 321(5897), pp.1837-1841.
- Rouet, P., Smih, F. and Jasin, M., 1994. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(13), pp.6064-6068.

- Rouet, P., Smih, F. and Jasin, M., 1994. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(12), pp.8096-8106.
- Ruan, J., Li, H., Xu, K., Wu, T., Wei, J., Zhou, R., Liu, Z., Mu, Y., Yang, S., Ouyang, H. and Chen-Tsai, R.Y., 2015. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated transgene knockin at the H11 locus in pigs. *Scientific Reports*, *5*, p.14253.
- Sachs, D.H., 1994. The pig as a potential xenograft donor. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *43*(1-3), pp.185-191.
- Sadelain, M., Papapetrou, E.P. and Bushman, F.D., 2012. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nature Reviews Cancer*, *12*(1), p.51.
- Schmidhuber, J. and Tubiello, F.N., 2007. Global food security under climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(50), pp.19703-19708.
- Schnieke, A.E., Kind, A.J., Ritchie, W.A., Mycock, K., Scott, A.R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A. and Campbell, K.H., 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, *278*(5346), pp.2130-2133.
- Schubert, R., Frank, F., Nagelmann, N., Liebsch, L., Schuldenzucker, V., Schramke, S., Wirsig, M., Johnson, H., Kim, E.Y., Ott, S. and Hölzner, E., 2016. Neuroimaging of a minipig model of Huntington's disease: feasibility of volumetric, diffusion-weighted and spectroscopic assessments. *Journal of Neuroscience Methods*, *265*, pp.46-55.
- Secher, J.O., Liu, Y., Petkov, S., Luo, Y., Li, D., Hall, V.J., Schmidt, M., Callesen, H., Bentzon, J.F., Sørensen, C.B. and Freude, K.K., 2017. Evaluation of porcine stem cell competence for somatic cell nuclear transfer and production of cloned animals. *Animal Reproduction Science*, *178*, pp.40-49.

- Shen, B., Zhang, J., Wu, H., Wang, J., Ma, K., Li, Z., Zhang, X., Zhang, P. and Huang, X., 2013. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Research*, 23(5), p.720.
- Smith, K., 2001. Theoretical mechanisms in targeted and random integration of transgene DNA. *Reproduction Nutrition Development*, 41(6), pp.465-485.
- Snaith, M.R. and Törnell, J., 2002. The use of transgenic systems in pharmaceutical research. *Briefings in Functional Genomics*, 1(2), pp.119-130.
- Swindle, M.M., Makin, A., Herron, A.J., Clubb Jr, F.J. and Frazier, K.S., 2012. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Veterinary Pathology*, 49(2), pp.344-356.
- Szczepek, M., Brondani, V., Büchel, J., Serrano, L., Segal, D.J. and Cathomen, T., 2007. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology*, 25(7), p.786.
- Tan, W., Carlson, D.F., Lancto, C.A., Garbe, J.R., Webster, D.A., Hackett, P.B. and Fahrenkrug, S.C., 2013. Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(41), pp.16526-16531.
- Tan, W.S., Carlson, D.F., Walton, M.W., Fahrenkrug, S.C., Hackett, P.B., 2012. Precision editing of large animal genomes. *Advances in Genetics*, 80:37-97.
- Tanihara, F., Takemoto, T., Kitagawa, E., Rao, S., Do, L.T.K., Onishi, A., Yamashita, Y., Kosugi, C., Suzuki, H., Sembon, S. and Suzuki, S., 2016. Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. *Science Advances*, 2(9), p.e1600803.

- Tavares, K.C.S., de Oliveira Dias, A.C., Lazzarotto, C.R., Neto, S.G., de Sá Carneiro, I., Ongaratto, F.L., Pinto, A.F.M., de Aguiar, L.H., Calderón, C.E.M., Toledo, J.R. and Castro, F.O., 2016. Transient expression of functional glucocerebrosidase for treatment of Gaucher's disease in the goat mammary gland. *Molecular Biotechnology*, 58(1), pp.47-55.
- Thomas, K.R. and Capecchi, M.R., 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51(3), pp.503-512.
- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J. and Befort, B.L., 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), pp.20260-20264.
- Uchida, M., Shimatsu, Y., Onoe, K., Matsuyama, N., Niki, R., Ikeda, J.E. and Imai, H., 2001. Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. *Transgenic Research*, 10(6), pp.577-582.
- van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H. and Kanaar, R., 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Reviews Genetics*, 2(3), p.196.
- Vasquez, K.M., Marburger, K., Intody, Z. and Wilson, J.H., 2001. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), pp.8403-8410.
- Vilahur, G., Padro, T. and Badimon, L., 2011. Atherosclerosis and thrombosis: insights from large animal models. *BioMed Research International*, 2011.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F. and Jaenisch, R., 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4), pp.910-918.

- Watson, J.D. and Crick, F.H., 1953. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 171(4361), pp.964-967.
- Watson, J.D. and Crick, F.H., 1953a. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171(4356), pp.737-738.
- Wei J, Gaynor P, Cole S, Brophy B, Oback B, Laible G (2018) Developing the condition for bovine zygote-mediated genome editing by electroporation. *Proceedings of the World Congress on Genetics Applied to Livestock Production* 11.11.18
- Whitworth, K.M., Zhao, J., Spate, L.D., Li, R. and Prather, R.S., 2011. Scriptaid corrects gene expression of a few aberrantly reprogrammed transcripts in nuclear transfer pig blastocyst stage embryos. *Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells")*, 13(3), pp.191-204.
- Willadsen, S.M., 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320(6057), p.63.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. and Campbell, K.H., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), p.810.
- Wolkovich, E.M., Cook, B.I., Allen, J.M., Crimmins, T.M., Betancourt, J.L., Travers, S.E., Pau, S., Regetz, J., Davies, T.J., Kraft, N.J. and Ault, T.R., 2012. Warming experiments underpredict plant phenological responses to climate change. *Nature*, 485(7399), p.494.
- Wu, Y., Kantake, N., Sugiyama, T. and Kowalczykowski, S.C., 2008. Rad51 protein controls Rad52-mediated DNA annealing. *Journal of Biological Chemistry*, 283(21), pp.14883-14892.
- Yang, H., Wang, H., Shivalila, C.S., Cheng, A.W., Shi, L. and Jaenisch, R., 2013. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 154(6), pp.1370-1379.



Zhao, J., Ross, J.W., Hao, Y., Spate, L.D., Walters, E.M., Samuel, M.S., Rieke, A., Murphy, C.N. and Prather, R.S., 2009. Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 81(3), pp.525-530.