

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos

Ana Carolina Rocha Viotto

**A utilização da técnica CRISPR no melhoramento do cacau: revisão
bibliográfica**

São Paulo

2023

Ana Carolina Rocha Viotto

**A utilização da técnica CRISPR no melhoramento do cacau: revisão
bibliográfica**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos.

Orientador (a): Dra. Andrea Borrego

São Paulo

2023

**Catlogação na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Viotto, Ana Carolina Rocha

A utilização da técnica CRISPR no melhoramento do cacau: revisão bibliográfica / Ana Carolina Rocha Viotto ; orientador(a) Andrea Borrego - São Paulo, 2023.

60 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. CRISPR/Cas9 2. CRISPRa. 3. Theobroma cacao. 4. Moniliophthora perniciosa I. Borrego, Andrea. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Ana Carolina Rocha Viotto, aluno(a) do Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 31 de Janeiro de 2023



.....
Aluno(a): Ana Carolina Rocha Viotto



De acordo:.....
Orientador(a): Andrea Borrego

Primeiramente, a Deus por ter me abençoado com essa oportunidade.

A minha mãe, por ter me dado o apoio e a força que tanto precisei no decorrer da minha formação acadêmica.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Andrea Borrego e ao José Ricardo Jensen pelos ensinamentos e dedicação.

Aos amigos pelo auxílio, trabalho em equipe e agradável convivência.

Aos professores pelas ótimas aulas e compartilhamento de conhecimentos.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

"Tudo é possível. O impossível apenas demora mais."

Dan Brown

RESUMO

VIOTTO, A. C. R. **A utilização da técnica CRISPR no melhoramento do cacau:** revisão bibliográfica. 2023. 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Uma ferramenta de engenharia genética chamada CRISPR possibilita, além de novos recursos terapêuticos e soluções para distúrbios genéticos e doenças, o melhoramento na agricultura. O aprimoramento do CRISPR/Cas9 vem evoluindo e recentemente, dois derivados dele foram desenvolvidos, o CRISPRa e o CRISPRi. Com esses sistemas é possível a modulação gênica sem a necessidade da clivagem do local-alvo. Utilizar esses sistemas na agricultura demonstra ter um bom potencial econômico, podendo garantir uma melhor qualidade de vida à população e um meio ambiente mais sustentável, sendo úteis para diminuir o desperdício e o risco de extinção de alguns alimentos, como o cacau. O cacau é um fruto oriundo da árvore *Theobroma cacao* e, infelizmente, é alvo de várias doenças causadas por fitopatógenos que resultam em perdas globais, além de fatores abióticos. Dessa forma, encontramos um gene na literatura e bancos de dados, chamado aleno óxido sintase (AOS), o aumento de sua expressão, pode resultar no aumento da resistência do cacaueiro contra uma dessas doenças, a vassoura-de-bruxa provocada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*. A metodologia proposta é baseada na literatura e a descrição dos resultados condiz com as atividades práticas desenvolvidas no laboratório de Desenvolvimento e Inovação do Instituto Butantan, dentro da linha de pesquisa de edição gênica por CRISPR/Cas9. O que foi apresentado é uma hipótese de melhoramento da resistência da *T. cacao* contra a *M. perniciosa*, com o aumento da expressão do gene AOS utilizando o sistema CRISPRa.

Palavras-chave: CRISPR/Cas9. CRISPRa. Aleno óxido sintase. *Theobroma cacao*. *Moniliophthora perniciosa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<u>Figura 1 - Ilustração da estrutura de ZFN e da TALEN</u>	22
<u>Figura 2 - Ilustração do mecanismo de defesa de uma bactéria contra bacteriófagos</u>	24
<u>Figura 3 - Ilustração que retrata a diferença entre CRISPR/Cas9, CRISPRi e CRISPRa</u>	28
<u>Figura 4 - Sequência de nucleotídeos a montante do éxon</u>	39
<u>Figura 5 - Região de 125 nucleotídeos marcada</u>	40
<u>Figura 6 - Região de 162 nucleotídeos marcada</u>	40
<u>Figura 7 - Região de 138 nucleotídeos marcada</u>	40
<u>Figura 8 - Sequências de gRNAs e PAMs prováveis</u>	41
<u>Figura 9 - Amplificação dos genes Ahrr e Arnt</u>	42
<u>Figura 10 - Sequências de 2 clones da região editada com CRISPR/Cas9 no gene 1</u>	43
<u>Figura 11 - Gel para confirmação do heteroduplex nos clones do gene 1</u>	44
<u>Figura 12 - Gel heteroduplex do clone 7 - 2 horas</u>	45
<u>Figura 13 - Gel heteroduplex do clone 7 - 4 horas</u>	45
<u>Figura 14 - Crescimento de colônias bacterianas transformadas com o plasmídeo 4</u>	48
<u>Figura 15 - Crescimento de colônias bacterianas transformadas com o plasmídeo 10</u>	49
<u>Figura 16 - Colônias isoladas dos plasmídeos 4 (A) e 10 (B)</u>	50
<u>Figura 17 - Colônias isoladas dos plasmídeos controle 4 e 10</u>	51
<u>Figura 18 - Gel de agarose do PCR de colônia do gene 2</u>	52
<u>Figura 19 - Clones identificados no gel de agarose</u>	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

12-OPDA – Ácido 12-oxo-fitodienólico

13S-HPOT – 13(S)-hidroperoxi-(9Z,11E,15Z)-octadecatrienoico

AhR – Receptor de aril hidrocarboneto

Ahrr – Repressor do AhR

AJ – Ácido Jasmônico

AOS – Aleno Óxido Sintase

Arnt – Translocador nuclear do AhR

AS – Ácido Salicílico

bp – *base pair*

Cas – *CRISPR associated genes*

CENTD – *Centre of Excellence in New Target Discovery*

CRISPR – Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Interespaçadas

CRISPRa – *CRISPR-mediated gene activation*

CRISPRi – *CRISPR interference*

crRNA – CRISPR RNA

dCas9 – *dead Cas9*

D.O. – Densidade óptica

E. coli – *Escherichia coli*

ET – Etileno

gRNA – *guide RNA*

HR – Recombinação Homóloga

HSF1 – *Heat Shock Factor 1*

KRAB – *Kruppel-associated Box*

LDI – Laboratório de Desenvolvimento e Inovação

MCP – *MS2 Coat Protein*

*M. pernicios*a – *Moniliophthora pernicios*a

NHEJ – Junção de Extremidades Não Homóloga

OPR3 – OPDA redutase 3

PAM – Motivo Adjacente ao Protoespaçador

PIA – Artrite induzida por pristane

PNK - Polinucleotídeo *Kinase*

pré-crRNA – precursor de CRISPR RNA

qPCR – *Real Time Quantitative PCR*

Rta – transativador R do vírus *Epstein Barr*

SAM – *Synergistic Activation Mediator*

Sca6 – *Scavina-6*

sgRNA – *single-guide RNA*

TAD – Domínio de ativação de transcrição autônomo

TALENs – *Transcription activator-like effector nucleases*

T. cacao – *Theobroma cacao*

tracrRNA – *Trans-activating CRISPR RNA*

TSS – Sítio de Início da Transcrição

ZFNs – *Zinc Finger Nucleases*

SUMÁRIO

<u>1 INTRODUÇÃO</u>	14
<u>2 DESENVOLVIMENTO</u>	19
<u>2.1 Breve história sobre a engenharia genética</u>	19
<u>2.1.1 Enzimas de restrição</u>	19
<u>2.1.2 Zinc Finger Nucleases</u>	21
<u>2.1.3 Transcription activator-like effector nucleases</u>	22
<u>2.1.4 CRISPR/Cas9</u>	23
<u>2.1.5 CRISPRa e CRISPRi</u>	26
<u>2.2 Theobroma cacao</u>	29
<u>3 OBJETIVOS</u>	33
<u>3.1 Geral</u>	33
<u>3.2 Específicos</u>	33
<u>4 METODOLOGIA</u>	34
<u>4.1 Linhagens celulares</u>	34
<u>4.2 Plasmídeos</u>	34
<u>4.3 Desenho in silico dos RNA guias</u>	35
<u>4.4 Desenho do cassete de transformação para ativação transcricional via dCas9</u>	35
<u>4.5 Bactéria</u>	36
<u>4.6 Ensaios de Clonagem</u>	36
<u>4.7 Confirmação da clonagem com PCR de colônia</u>	37
<u>4.8 Transfecção por <i>Agrobacterium</i> nas folhas Sca6</u>	37
<u>4.9 Testes funcionais</u>	38
<u>5 RESULTADOS E ATIVIDADES DESENVOLVIDAS</u>	39
<u>5.1 Resultados iniciais para o melhoramento do cacau com CRISPR</u>	39

<u>5.2 Atividades Desenvolvidas</u>	41
<u>6 DISCUSSÃO</u>	53
<u>7 CONCLUSÃO</u>	55
<u>REFERÊNCIAS</u>	56

1 INTRODUÇÃO

Uma ferramenta de engenharia genética chamada CRISPR (Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Interespaçadas), do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, abriu um leque de possibilidades que, além de terapias e soluções para distúrbios genéticos e doenças, também possibilita o melhoramento nas áreas de fruticultura, aquicultura, zootecnia, fitotecnia e fitossanidade, sendo uma potencial ferramenta econômica. Desde a caracterização da dupla hélice de DNA, a comunidade científica busca uma ferramenta que possibilite a edição de genomas de maneira fácil, rápida e específica. Começou a se tornar realidade com as enzimas de restrição, com as *Zinc Finger Nucleases* (ZFNs) e com as *Transcription activator-like effector nucleases* (TALENs), respectivamente, entretanto, os cientistas encontraram empecilhos com elas, então o surgimento do CRISPR ofuscou essas técnicas anteriores a partir de 2012 (ADDGENE, c2023; PEREIRA, 2016; SCHNEIDER *et al.*, 2018).

A princípio, essa ferramenta era apenas considerada uma imunidade adaptativa peculiar de bactérias e Archaeas contra a reinfecção aos bacteriófagos e plasmídeos. Foi descoberta no genoma da *Escherichia coli* (*E. coli*) em 1987 e apenas em 2007 foi elucidado a função de CRISPR nos procariontes e seus componentes, sendo eles, os genes Cas (*CRISPR associated genes*) que codificam proteínas Cas com função de endonucleases e estão adjacentes ao loco CRISPR, o crRNA (CRISPR RNA) que é um pequeno RNA produzido a partir da transcrição do loco CRISPR e do processamento de um longo precursor de CRISPR RNAs (pré-crRNA), e o *Trans-activating* CRISPR RNA (tracrRNA), que é um pequeno RNA codificado em trans que serve como um andaime para a endonuclease Cas (ADDGENE, c2023; PEREIRA, 2016; TENG *et al.*, 2021).

Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna publicaram um artigo científico em 2012 que revolucionou a ciência, nesse artigo está descrito como elas isolaram e adaptaram os componentes do sistema CRISPR/Cas9, utilizando um único RNA quimérico (crRNA e tracrRNA fundidos), chamado *single-guide* RNA (sgRNA), e a endonuclease Cas9 para funcionar em um tubo de ensaio, e demonstraram que esse sistema poderia ser programado para clivar locais específicos de um DNA. O sistema programável de edição de genes inspirou e possibilitou uma variedade de aplicações na medicina, agricultura e ciência básica (JINEK *et al.*, 2012; LEDFORD;

CALLAWAY, 2020). Em 2020, as duas cientistas ganharam o prêmio Nobel de Química: “Pelo desenvolvimento de um método de edição do genoma. ” (NOBELPRIZE, 2020).

Graças a essa descoberta, agora, são necessários apenas dois componentes: um sgRNA para parear a um gene alvo desejado e a endonuclease Cas9 que causa a quebra de fita dupla no DNA para que ocorra modificações no genoma. A Cas9 é direcionada ao seu alvo através de uma sequência, ou *guide* RNA (gRNA), de aproximadamente 20 nucleotídeos. Esse gRNA faz o pareamento com a sequência alvo de interesse que possui uma sequência adjacente de 2 a 6 pares de bases chamada Motivo Adjacente ao Protoespaçador (PAM). A sequência PAM é extremamente importante para que ocorra a clivagem pela Cas9, mesmo com o RNA guia pareando, sem a sequência não funcionará. A clivagem da dupla fita gera a necessidade de correção pelos mecanismos de reparo de danos de DNA, nesse caso, duas principais vias de reparo de DNA são importantes e só uma delas é ativada, a via de junção de extremidades não homóloga (NHEJ) ou a via de recombinação homóloga (HR) (RAN *et al.*, 2013; REDMAN *et al.*, 2016).

O reparo por NHEJ é mais propenso a erros, podendo ocorrer inserções e deleções (*indels*), já o reparo por HR é mais preciso, mas precisa de uma fita molde para completar as lacunas que sofreram danos, pois é uma via que normalmente ocorre em frequências mais baixas se comparada com a de NHEJ. Apesar de NHEJ parecer ser uma via de reparo a ser evitada, na verdade é bastante útil se for necessário nocautear um gene, já que os indels ocorrem dentro de um éxon do gene, trazendo mudança no quadro de leitura, conseqüentemente, tornando-o inativo para um tal objetivo. A fita molde para HR pode ser entregue junto com o sgRNA e a Cas9 para realizar a correção teoricamente precisa de um gene defeituoso (RAN *et al.*, 2013; REDMAN *et al.*, 2016).

O sistema CRISPR/Cas9 vem evoluindo ao longo dos anos e recentemente, dois sistemas derivados dele foram desenvolvidos, o *CRISPR-mediated gene activation* ou de ativação gênica (CRISPRa) e o *CRISPR interference* ou de interferência (CRISPRi). Com esses dois sistemas é possível a modulação genética sem a necessidade de clivagem do gene-alvo, pois em ambos sistemas, a endonuclease Cas9 está cataliticamente inativa, no qual é chamada de *dead* Cas9 (dCas9), mas que ainda possui a capacidade de se ligar especificamente ao alvo. Esses sistemas consistem em uma dCas9 fundida ou interagindo com um ou mais

efetores transcricionais e um único sgRNA que complementa a região promotora de um gene. No geral, o CRISPRa e o CRISPRi fornecem aos pesquisadores opções quase ilimitadas de regulação gênica, já que alcança regiões inacessíveis a outras técnicas (por exemplo, regiões não-codificantes) e são poderosas para investigar a função do gene em várias vias biológicas e em doenças, inclusive para estudar a farmacoterapia, pois imita a ação de uma droga melhor que o nocaute de um gene (BITESIZEBIO, 2020; DING *et al.*, 2022; KARLSON *et al.*, 2021; SYNTHEGO, c2023).

Um dos desafios maiores do CRISPR é a entrega dos componentes, pois se não escolher o vetor de expressão correto pode levar o experimento ao erro, além da problemática de causar toxicidade no hospedeiro in vivo. As etapas a serem seguidas são: planejamento (escolha da sequência de DNA e do vetor de expressão); amplificação (seleção de *primers* para amplificar somente a sequência desejada no PCR); clonagem (inserção da sequência em um vetor de clonagem e depois em um hospedeiro para expansão de mais material); subclonagem (preparo do inserto, preparo do vetor e ligação); confirmação e análise; e teste de expressão. O planejamento é a etapa mais importante antes de iniciar o processo. Existem inúmeros vetores de expressão, podendo ser plasmídeos, vírus ou bactéria, a escolha dependerá do tamanho do fragmento de DNA e de qual organismo deseja expressá-lo posteriormente (VEDOVELI; CASTRO, 2016).

Utilizar a técnica na agricultura demonstra ter um bom potencial econômico, além de gerar uma melhor qualidade de vida à população e sustentabilidade ambiental. A técnica também pode ser usada para tornar o rebanho de animais de criação mais produtivo, aumentando a produção de leite e/ou da própria massa corporal do animal. Com a edição genética é possível expressar, reprimir ou nocautear um gene de interesse, dependendo do objetivo, podendo resultar em um alimento mais durável, com alto teor de proteína, vitamina e outros nutrientes, ou quem sabe, com menos teor calórico (PEREIRA, 2016).

O aumento da população, a exigência alimentar e a alta produção de alimentos são questões problemáticas para o meio ambiente, problemas que vão desde a degradação do solo até as mudanças climáticas, por conta disso, alguns alimentos correm o risco de não existir mais, um desses alimentos é o chocolate, que desde 2017, cientistas estão alertando que o cacau pode ser extinto por volta de 40 anos em todo o mundo. A redução das chuvas e o aumento da temperatura por

causa das mudanças climáticas aumentaram os ataques de pragas e de doenças as plantações de cacau, com o CRISPR, a expectativa é que o cacau fique mais resistente a esses ataques e doenças, permitindo que a sua extinção, predestinada, seja revertida (GAKPO, 2019).

Além do risco de extinção de alguns alimentos, tem-se o desperdício que é um agente potencializador da insegurança alimentar e da fome no mundo, desde as fases de pós-colheita até a venda, estima-se que 30% da produção mundial de alimentos é desperdiçada. Além do fato de corroborar com a insegurança alimentar, o desperdício gera prejuízo à preservação ambiental, pois a produção agrícola em larga escala exige um volume maior de água, mais energia, terra, capital e uso de insumos agrícolas, fertilizantes e agrotóxicos são exemplos. As causas de desperdício são devido a perecibilidade do alimento, condições inadequadas de embalagem, manuseio, transporte e armazenamento. Mesmo que não dê para solucionar essas causas, somente com a técnica de CRISPR, pode-se realizar edição genética para que frutas e outros alimentos tenham uma longevidade maior, e, como a plantação de cacau, se tornem mais resistentes a mudanças climáticas e doenças (OXFAM, 2021; UNITED NATIONS, 2021).

O cacau é um fruto proveniente da árvore *Theobroma cacao* (*T. cacao*), tem alta importância e valor econômico, principalmente para indústrias alimentícias, empresas farmacêuticas, indústrias de tabaco, entre outras. Existem três variedades de cacau, a variedade Criollo, cultivada na América do Sul, a variedade Forastero, cultivada na África, em países como a Costa do Marfim, Gana, Nigéria, etc, e a variedade Trinitario, que é um cruzamento não intencional do Criollo e do Forastero e é cultivada em muitas partes da América do Sul e Central, África, Sudeste Asiático e Oceania. A partir dos grãos são produzidos derivados do cacau (chocolates, cacau em pó e manteiga de cacau). Infelizmente, o cultivo dos cacauzeiros é limitado por várias doenças causadas por fungos, oomicetos e vírus que resultam em perdas globais de 20 a 30%, além de fatores abióticos (ETAWARE, 2021; PREWITT *et al.*, 2021).

Dessa forma, é importante a busca por genes de interesse da árvore *T. cacao* em bancos de dados, e que esses possam resultar na melhoria das características do fruto, em questão de sabor, metabólitos benéficos à saúde, rendimento e resistência a doenças e fatores abióticos (PREWITT *et al.*, 2021). Visando o melhoramento da resistência à doença vassoura-de-bruxa provocada pelo fungo

Moniliophthora perniciosa (*M. perniciosa*), foi localizado, a partir de revisão bibliográfica de organismos homólogos, como *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), um gene aleno óxido sintase (AOS) que codifica uma enzima chave na biossíntese de ácido jasmônico, uma via de sinalização importante para ativar as respostas de resistência a patógenos necrotróficos, ataques de insetos e ferimentos. Aplicar o sistema CRISPRa para ativar a expressão do gene AOS do *T. cacao*, demonstra ser promissor para garantir uma maior resistência ao *M. perniciosa*.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Breve história sobre a engenharia genética

Conhecer o histórico da engenharia genética é importante para compreender o estado atual do campo. Eventos importantes como a conceituação da dupla hélice de DNA, a descoberta das enzimas de restrição, das ZFNs e das TALENs, tornaram possível a invenção do CRISPR. Por volta de 8.000 anos A.C., já se utilizavam métodos tradicionais de modificação genética, como reprodução seletiva e cruzamento para criar plantas e animais com características mais desejáveis. No ano de 1940, criadores de plantas aprenderam a utilizar radiação ou produtos químicos para alterar aleatoriamente o DNA de um organismo, sem saber exatamente onde e como ocorriam essas modificações (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020).

Com a descrição da estrutura de dupla hélice do DNA em 1953, foi iniciada a era da engenharia genética, no qual cientistas buscaram maneiras e métodos mais específicos de editar genomas. A partir desse evento outras diversas descobertas e feitos foram surgindo, um atrás do outro, como a descoberta das enzimas DNA polimerase e DNA ligase e suas funções, o isolamento e síntese de DNA em um tubo de ensaio, o conhecimento da quantidade de cromossomos no ser humano, entre outros. Uma descoberta importante para engenharia genética foi a do DNA recombinante em 1972, que fez com que fosse possível a entrega dos componentes do CRISPR/Cas9 para edição de genomas futuramente (GENOME, 2015).

2.1.1 Enzimas de restrição

As enzimas de restrição foram descobertas por Werner Arber na década de 1960 enquanto ele estudava o fenômeno conhecido anteriormente, “restrição de bacteriófagos controlada pelo hospedeiro”, e observou que o DNA do bacteriófago era degradado e cortado em pedaços depois de invadir cepas resistentes de bactérias. Para explicar esse fenômeno, ele deduziu que a célula bacteriana poderia expressar duas enzimas, uma que faz o reconhecimento e corta o genoma invasor e outra de modificação que reconhece e protege o próprio genoma da ação da enzima

degradante adicionando grupos metil. Ele sugeriu que as moléculas de DNA possuem sítios específicos de ligação com essas enzimas a partir de sequências de pares de bases específicas. As enzimas agem nesses locais cortando a molécula de DNA ou metilando-a. No fim da década de 1960, essas suposições foram provadas verdadeiras por ele e Stuart Linn (CHIAL, 2010; NOBELPRIZE, 2018).

Pouco tempo depois, em 1970, Hamilton Smith verificou independentemente a hipótese de Arber e também enriqueceu a descoberta inicial de Linn e Arber, purificando uma enzima de restrição de outra bactéria, a *Haemophilus influenzae*. A enzima de restrição dessa bactéria degrada o DNA estranho em grandes fragmentos, mas não toca no DNA da própria bactéria. O mais importante, Smith mostrou que todos os fragmentos, em seu início e fim, tinham os mesmos três pares de bases, mostrando que a enzima havia clivado o DNA no meio onde quer que uma sequência específica simétrica de 6 pares de bases estivesse presente. Outras enzimas de restrição possuem características semelhantes, mas reconhecem sequências diferentes. Ainda na década de 1970, Dan Nathans demonstrou o uso das enzimas de restrição para construção de mapas genéticos e desenvolveu e aplicou um novo método envolvendo as enzimas para resolver problemas genéticos (CHIAL, 2010; NOBELPRIZE, 2018).

Desde os estudos de Arber, Smith e Nathans, ganhadores do Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1978, a caracterização de enzimas de restrição se desenvolveu com muita rapidez, devido à vasta diversidade genética entre as bactérias. Em especial, as sequências de reconhecimento dessas enzimas são de 4 a 6 pares de bases e geralmente são palindrômicas, ou seja, a leitura da sequência de reconhecimento é na mesma direção 5' para 3' em ambas as fitas de DNA. Existem quatro tipos diferentes de enzimas de restrição, mas as do tipo II são as mais utilizadas para experimentos laboratoriais, pois cortam dentro ou perto da sequência de reconhecimento (CHIAL, 2010; DI FELICE; MICHELI; CAMILLONI, 2019).

Uma das utilizações das enzimas de restrição do tipo II é a clivagem de DNA em locais específicos e, em seguida, a ligação com diferentes sequências de DNA recombinadas com a enzima DNA ligase. Esse método é chamado de clonagem de DNA ou tecnologia de DNA recombinante. Além disso, certos tipos de enzimas de restrição são fundamentais para o mapeamento de DNA, mapeamento de epigenoma e construção de bibliotecas de DNA. Para a edição de genes, elas

acabam sendo limitadas, já que normalmente reconhecem sítios palindrômicos de DNA de 4 a 8 pares de bases e, clivam o DNA uma vez a cada 4.096 a 65.536 bases, em média (CHANDRASEGARAN; CARROLL, 2016; CHIAL, 2010; MAH, 2019).

2.1.2 Zinc Finger Nucleases

Ao passar dos anos, a necessidade de uma técnica de edição de genes que fosse mais precisa se tornou evidente. Era preciso uma técnica que evitasse que edições fora do alvo ocorresse, pois os efeitos poderiam ser deletérios. A descoberta das ZFNs em 1985 tratou essa questão. As ZFNs são proteínas quiméricas produzidas pela combinação de proteínas com formato de dedo que contém zinco com uma endonuclease, geralmente a enzima de restrição Fok1. Essas proteínas possuem domínios de ligação com o DNA, no qual cada um reconhece 3 nucleotídeos, e um domínio de clivagem com a endonuclease Fok1 (GUPTA; MUSUNURU, 2014; MAH, 2019).

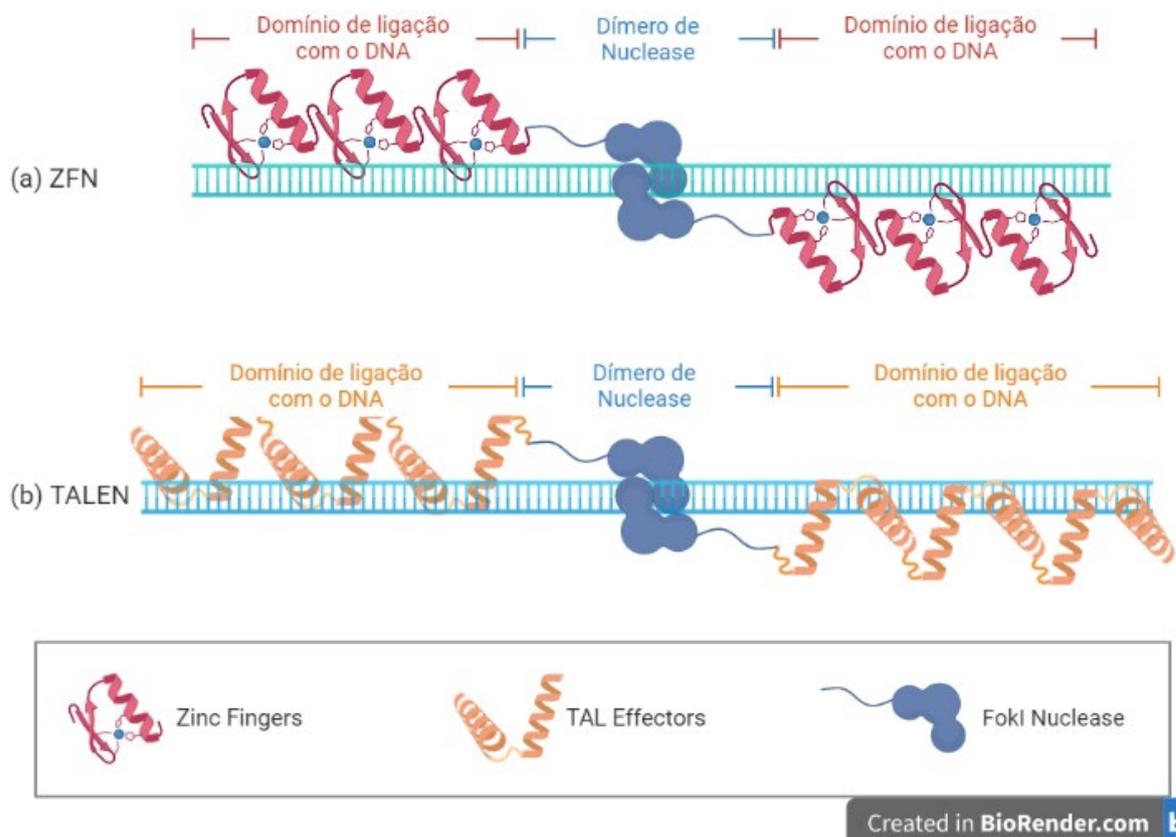
As ZFNs são compostas por aproximadamente 30 módulos de aminoácidos que interagem com trincas de nucleotídeos e são projetadas para reconhecer todas as 64 combinações de trincas de nucleotídeos possíveis. Como as endonucleases funcionam apenas como dímeros, são necessários pares de proteínas para se ligarem ao locus específico, um se liga a sequência a montante e a outra a sequência a jusante. Após ligação, a Fok1 cliva o DNA, geralmente em um comprimento de 6 pares de bases, e gera dano de dupla fita, recrutando a maquinaria das vias de NHEJ ou HDR para corrigi-las. É possível que as proteínas reconheçam sequências de DNA de 9 a 18 pares de bases de comprimento (Figura 1a) (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013; YEADON, 2014; XIONG; DING; LI, 2015).

Por conta do requisito de interagir com trincas de nucleotídeos e pela peculiaridade dos sítios alvo ricos em guanina parecerem produzir uma edição mais eficiente do que os sítios alvo não ricos, ficou desafiador projetar as ZFNs. Além disso, as proteínas são modulares, ou seja, interagem com o DNA de forma independente, comprometendo a eficiência da edição também (MAH, 2019).

2.1.3 Transcription activator-like effector nucleases

Em 2011, surgiu uma nova técnica de edição de genes, que basicamente é uma melhoria das ZFNs. As TALENs são proteínas quiméricas estruturalmente semelhantes às ZFNs, ambas são projetadas pelo homem e utilizam uma endonuclease FokI. O que as diferem são as proteínas, ao invés de proteínas com formato de dedo que contém zinco, utiliza-se as proteínas naturais de bactérias patogênicas exclusivas de plantas. Essas proteínas contêm de 33 a 35 domínios de repetição de aminoácidos que interagem com o DNA, no qual cada domínio interage com um par de bases, tornando a ferramenta mais específica e com menos efeitos fora do alvo (Figura 1b) (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013; KHAN, 2019; MAH, 2019).

Figura 1 - Ilustração da estrutura de ZFN e da TALEN



Fonte: Adaptada de BioRender.com, 2022.

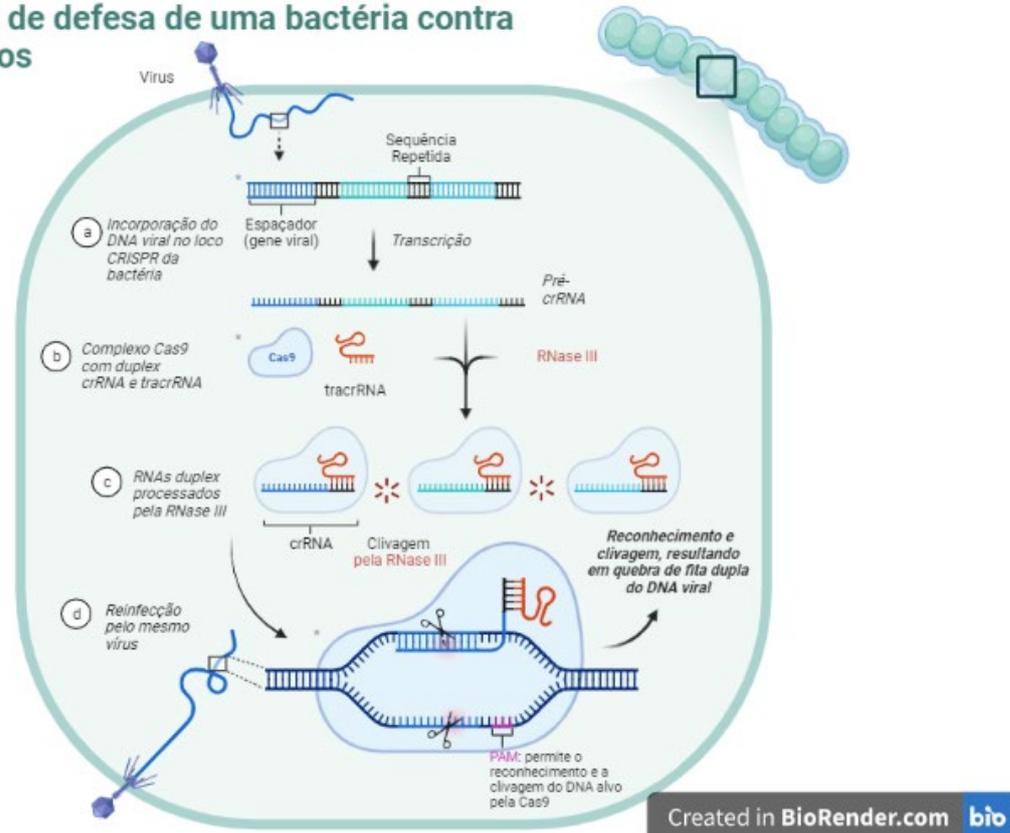
Apesar de precisar de apenas um único nucleotídeo, a utilização das TALENs para editar genes ainda é demorada e custosa, pois desenvolver o design da ferramenta possui restrições. A estrutura das TALENs exige que o locus alvo tenha uma timina na extremidade 5' e uma adenina na extremidade 3', limitando a personalização do alvo. Outra problemática é a eficiência de edição reduzida em regiões muito metiladas. As entregas também são um desafio por conta do tamanho das TALENs de aproximadamente 6 kb, aumentando a quantidade de tempo e custo para uma edição eficiente e sucedida. Embora tenham facilitado a tecnologia de edição de genoma, o alto custo de mão de obra e financeiro dificulta a adoção em laboratórios. Contudo, antes mesmo que as TALENs pudessem melhorar e se consolidar como uma alternativa viável para as ZFNs, a descoberta da ferramenta CRISPR/Cas9 já estava iminente (CHANDRASEGARAN; CARROLL, 2016; MAH, 2019).

2.1.4 CRISPR/Cas9

Após um ano do surgimento das TALENs, foi revelado um novo método de edição de genoma, a ferramenta CRISPR/Cas9, que mostrou ser o que os cientistas queriam há muito tempo, pois ela é específica, rápida, fácil de ser utilizada e menos custosa que as técnicas anteriores. Basicamente, o CRISPR/Cas permite que procariotos se protejam contra a reinfecção de bacteriófagos e plasmídeos indesejados, e esse mecanismo de defesa ocorre em três etapas: na primeira etapa ocorre a aquisição de um novo espaçador no loco CRISPR oriundo de um invasor que infecta a bactéria pela primeira vez; na segunda etapa ocorre a transcrição incessante do loco CRISPR para pré-crRNA que, após processado pela RNase III, resulta em diversos RNAs menores, os crRNAs e os tracrRNAs, no qual cada crRNA corresponde a um espaçador específico; e na terceira etapa ocorre na reinfecção pelo invasor, o crRNA se associa a um tracrRNA, resultando em uma estrutura secundária crRNA-tracrRNA que ativa e conduz a proteína Cas a clivar o DNA exógeno através do reconhecimento do domínio PAM (Figura 2) (MAH, 2019; PEREIRA, 2016; TENG *et al.*, 2021).

Figura 2 - Ilustração do mecanismo de defesa de uma bactéria contra bacteriófagos

Mecanismo de defesa de uma bactéria contra bacteriófagos



Fonte: Adaptada de BioRender.com, 2022.

Existe mais de um sistema CRISPR/Cas que está presente na maioria das archeas e em aproximadamente 50% das bactérias, estando ausente em eucariotos e em vírus. Esses sistemas apresentam grande diversidade e são classificados em duas classes diferentes, a Classe 1 e a Classe 2. A Classe 1 contém complexos proteicos Cas com múltiplas subunidades, enquanto a Classe 2 é caracterizada por possuir uma única proteína efetora grande (Cas9, Cas12 ou Cas13). Os sistemas da Classe 1 podem ser divididos em três tipos (Tipo I, Tipo III e Tipo IV) e quinze subtipos, e estão presentes em 90% dos loci CRISPR das archeas e das bactérias. Já os sistemas da Classe 2 são divididos em três tipos (Tipo II, Tipo V, Tipo VI) e dezoito subtipos, e representam 10% dos loci CRISPR, sendo encontrados apenas em bactérias (MOTA *et al.*, 2020; SYNTHOGO, 2019).

Os tipos mais comuns da Classe 1 são os Tipos I e III. Os subtipos e as proteínas envolvidas no Tipo IV são desconhecidos ainda. O Tipo I e o Tipo III são

semelhantes, mas se distinguem pelos subtipos. Em todos os nove subtipos do Tipo I contém uma componente chave, a Cas3, que tem domínios com capacidade para desenrolar o DNA e DNA-RNA para facilitar a clivagem do DNA-alvo, no entanto, as proteínas efetoras nos diferentes subtipos são compostas por elementos diferentes. O Tipo III é parecido com o Tipo I em questão de todos os seis subtipos compartilharem a mesma Cas, que, no caso do Tipo III, é a Cas10. A Cas10 é responsável pelo processamento do crRNA e pela clivagem do alvo, que pode ser tanto o DNA quanto o RNA. Embora tenha menos subtipos que o Tipo I, cada subtipo do Tipo III apresenta muita diversidade entre eles (FURTADO *et al.*, 2021; SYNTHOGO, 2019).

Na Classe 2, o Tipo II, que foi ilustrado na Figura 2, é o mais comum e mais conhecido. Os três subtipos do Tipo II são caracterizados pela presença da endonuclease Cas9, pelas proteínas auxiliares cas1 e cas2, por uma RNase III que faz o processamento do pré-crRNA, e um tracrRNA necessário para o sistema funcionar. O Tipo V é mais diversificado com dez subtipos e inclui a Cas12, já o Tipo VI possui cinco subtipos e a Cas13. A Cas12 tem como alvo o DNA, enquanto a Cas13 tem como alvo o RNA. Os três Tipos se diferem quanto aos mecanismos de processamento do crRNA (FURTADO *et al.*, 2021; SYNTHOGO, 2019).

A endonuclease Cas9 do Tipo II, descoberta através de estudos com a bactéria *Streptococcus pyogenes*, foi a primeira endonuclease associada ao CRISPR a ser utilizada de forma ampla na engenharia genética. Ela consiste em dois lóbulos, um de reconhecimento (REC) e um com atividade nucleásica (NUV). O lóbulo NUV possui dois domínios catalíticos, o RuvC e HNH, além de um domínio de interação com o PAM (PI) no terminal C. O HNH cliva a fita complementar ao crRNA, enquanto o RuvC cliva a fita de DNA não complementar, onde a sequência PAM está adjacente. O sítio PAM que a Cas9 reconhece é rico em guanina, geralmente 5'-NGG-3' (N pode ser qualquer base de nucleotídeo), e é um sítio fácil de ser encontrado no genoma se comparado com os sítios das outras Cas (FURTADO *et al.*, 2021; MOTA *et al.*, 2020; PEREIRA, 2016).

Os estudos com a bactéria *Streptococcus pyogenes* foram conduzidos por Emmanuelle Charpentier que, a princípio, descobriu uma molécula antes desconhecida, o tracrRNA, e publicou um artigo demonstrando que a molécula fazia parte do sistema imune adaptativo da bactéria. Pouco tempo depois, iniciou uma parceria com a Jennifer Doudna que, juntas, recriaram o sistema CRISPR/Cas9 e

simplificaram os componentes dele para facilitar seu uso na engenharia genética, além de provar que o sistema pode ser programado para cortar qualquer DNA em um local predeterminado (NOBELPRIZE, 2020).

Programar o sistema CRISPR/Cas9 é muito simples e fácil, pois precisa apenas do desenho do gRNA, de uma única endonuclease Cas9 constante e ainda possui a capacidade de abordar vários alvos ao mesmo tempo utilizando diferentes gRNAs, ao contrário das ZFNs e TALENS que requerem o design e a engenharia de duas proteínas, uma a montante e outra a jusante de uma sequência alvo, onde cada uma reconhece um meio-sítio (CHANDRASEGARAN; CARROLL, 2016).

Logo essa ferramenta teve o impacto revolucionário merecido na engenharia genética, já que com ela é possível alterar o DNA de animais, plantas e microrganismos com enorme precisão e com maior rapidez, podendo realizar um trabalho em poucas semanas. Cientistas de todo o mundo não tardaram em utilizar a ferramenta em suas pesquisas, no qual ela contribuiu para descobertas importantes na ciência básica, na agricultura e na medicina, inclusive para o melhoramento de plantas e para novas terapias contra o câncer (NOBELPRIZE, 2020).

2.1.5 CRISPRa e CRISPRi

Recentemente, dois sistemas derivados do CRISPR/Cas9 foram desenvolvidos para modular a expressão gênica, sem que seja necessário realizar a edição, o CRISPRa e o CRISPRi. Em ambos sistemas consiste em uma dCas9 fundida ou interagindo com um ou mais domínios de efetores transcricionais, e um único sgRNA que complementa a região promotora de um gene. A dCas9 do complexo dCas9/sgRNA mantém a sua capacidade de se ligar especificamente ao alvo, mas se torna incapaz de clivá-lo, devido a mutação H840A no domínio catalítico HNH e a mutação D10A no domínio catalítico RuvC. Em vez de clivar o alvo, o efetor, que está ligado a dCas9, ativa ou reprime a expressão gênica a jusante. No CRISPRi, a ligação do complexo resulta em interferência da expressão gênica, já no CRISPRa, resulta na ativação dela (DING *et al.*, 2022; KARLSON *et al.*, 2021).

Os efetores de transcrição são proteínas quiméricas que contém domínios de ligação ao DNA, um exemplo de efetor transcricional sintético para repressão é o *Kruppel-associated Box* (KRAB) que é comumente utilizado em estudos de

repressão com a dCas9. Já os domínios ativadores mais comuns incluem VP64 (tetrâmero da proteína viral VP16 da *herpes simplex*), o domínio p65 de NF- κ B, o transativador R do vírus *Epstein Barr* (Rta) e o domínio *heat shock factor 1* (HSF1) (KARLSON *et al.*, 2021).

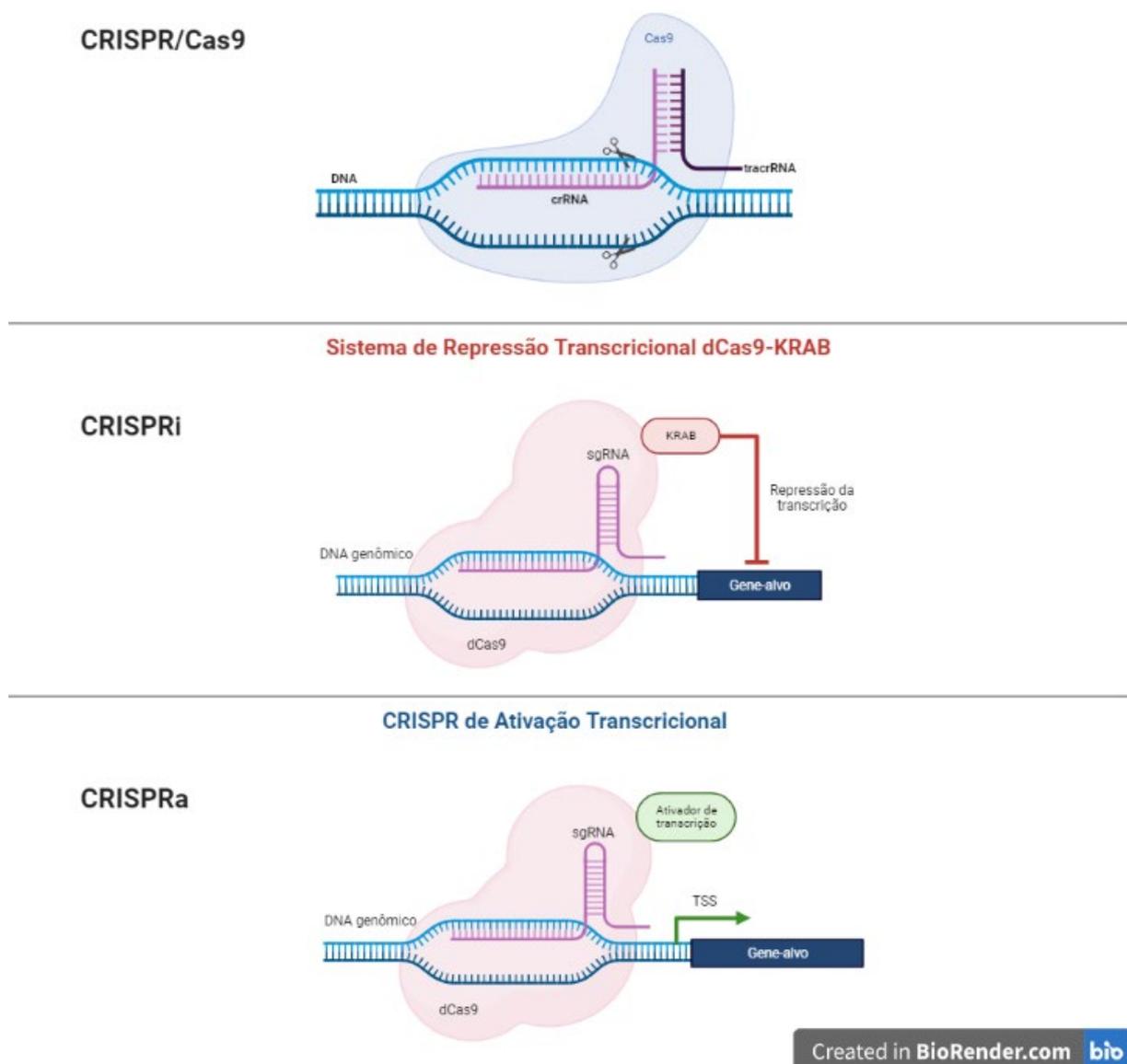
Os sistemas de CRISPRa que recrutam vários ativadores de transcrição para uma região promotora superam aqueles que possuem um único domínio ativador ou cópias redundantes do mesmo efector (BITESIZEBIO, 2020). Há pelo menos oito sistemas de CRISPR/dCas9, onde dois são de repressão e sete de ativação, os de repressão são: via obstrução da RNA polimerase pelo complexo dCas9-sgRNA e o de fusão *in tandem* de efetores transcripcionais à dCas9, que também pode ser de ativação (MORGANTE *et al.*, 2020).

Os sistemas de ativação, além do de fusão *in tandem* de efetores transcripcionais à dCas9, temos o dCas9:VT, que consiste na combinação de VP64 e um domínio de ativação de transcrição autônomo (TAD), o dCas9-VPR, que consiste na combinação do VP64:p65:Rta, o scRNA, que é um sistema de RNA *scaffold*, no qual o sgRNA contém um aptâmero MS2 em sua extremidade 3' que recruta o VP64 via fusão a MCP (MS2 *Coat Protein*), o CRISPR-Act2.0, em que a dCas9:VP64 é utilizada em combinação a um sgRNA modificado com dois aptâmeros MS2 que recrutam VP64 via MCP, o sistema CRISPR *Synergistic Activation Mediator* (SAM), que é um melhoramento do CRISPR-Act2.0, mudando apenas que os dois aptâmeros MS2 recrutam uma combinação de ativadores via MCP, o p65 e o HSF1, e o sistema SunTag, no qual a dCas9 é fusionada a repetições *in tandem* do peptídeo GCN4 ligado ao anticorpo scFv que recruta o VP64 (MORGANTE *et al.*, 2020). Um dos sistemas CRISPRa mais eficazes e populares é o SAM, pois ele mostra níveis de ativação de genes mais altos em comparação com os outros sistemas, como o SunTag e o VPR (CLOUSE, 2020).

O design de gRNAs do CRISPRa ou CRISPRi é diferente do CRISPR/Cas9, ao invés de desenhar gRNAs para direcionar a região codificadora do gene, o desenho deve ser feito para direcionar a região promotora do gene (Figura 3), mas para isso é necessário ter um conhecimento mínimo dessa região, o que pode ser um agente limitante quando se trabalha com espécies sem informação genômica detalhada (BITESIZEBIO, 2020; MORGANTE *et al.*, 2020). Foi realizada uma triagem de todos os gRNAs possíveis ao redor do sítio de início da transcrição, do inglês *transcriptional start site* (TSS), de 49 genes possibilitando identificar as

janelas de direcionamento ideais para o CRISPRi e para o CRISPRa. Utilizando o sistema repressor dCas9-KRAB, os gRNAs demonstraram ser eficientes em uma janela de -50 a +300 nucleotídeos de cada TSS. Para o CRISPRa, os gRNAs demonstraram ser eficientes em uma janela de -400 a -50 nucleotídeos a montante do TSS e essa janela pode ser aplicada a todos os sistemas CRISPRa (BITESIZEBIO, 2020).

Figura 3 - Ilustração que retrata a diferença entre CRISPR/Cas9, CRISPRi e CRISPRa



Fonte: Adaptada de BioRender.com, 2022.

Grandes potenciais e benefícios são oferecidos ao utilizar esses sistemas, como alcançar regiões inacessíveis à outras técnicas (regiões não-codificantes), permitir investigar a função de um gene em várias vias biológicas e em doenças, e contribuir em estudos de farmacoterapia, pois derrubar um gene parcialmente pode imitar a ação de um fármaco melhor do que um nocaute, entretanto, desafios e limitações existem e devem ser ponderados, estes incluem efeitos fora do alvo, requisitos de PAM, métodos de entrega eficientes, design de sRNAs (ainda mais limitante quando a espécie da pesquisa não possui informação genômica detalhada) e culturas geradas sendo rotuladas como organismos geneticamente modificados e transgênicos em vários países, além do processo longo e incômodo para liberação comercial (KARLSON *et al.*, 2021; MORGANTE *et al.*, 2020; SYNTHIGO, c2023).

2.2 *Theobroma cacao*

A *T. cacao* é uma árvore neotropical nativa da floresta Amazônica, pertence à classe Magnoliopsida, ordem Malvales e família Malvaceae. Seu genoma é relativamente pequeno, de 411 Mb a 494 Mb, no qual se organiza em 10 cromossomos, 20 alelos, sendo uma espécie diplóide (ENSEMBLPLANTS, [s.d.]). Mais de 20 espécies fazem parte do gênero *Theobroma*, mas apenas a *T. cacao* é cultivada extensivamente. Essa espécie é uma dicotiledônea e possui três variedades genéticas, o Criollo, o Forastero e o Trinitario (CROPLIFE, 2020).

Cada uma dessas variedades tem suas singularidades quanto ao aroma, sabor, produção e sensibilidades a fatores bióticos e abióticos. Por exemplo, o Criollo apresenta sabor mais refinado e superior, mas por conta do aumento da suscetibilidade a pragas e doenças, baixo vigor e rendimento, este representa apenas 5%-10% da produção mundial de chocolate. Já o Forastero, apesar do sabor inferior, representa aproximadamente 80% da produção mundial de chocolate, isso ocorre devido a sua natureza mais resistente a doenças e alto rendimento, e aos grãos de cacau dessa variedade serem mais baratos em comparação com a variedade Criollo. A terceira variedade, Trinitario, é um híbrido produzido através de cruzamentos entre as variedades Criollo e Forastero, por conta do seu aroma, produtividade e natureza resistente a doenças é cultivada em muitas partes da América do Sul e Central, África, Sudeste Asiático e Oceania (CROPLIFE, 2020; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2017).

Os grãos de cacau produzidos pelo cacaueiro (nome não científico) são economicamente importantes para a indústria do chocolate e são o sustento de mais de 40 milhões de pessoas que dependem deles. Seu cultivo é realizado por cerca de 6 milhões de agricultores, sendo que a maior produção mundial, aproximadamente 80-90% da produção, vem de pequenos agricultores. Além disso, é fundamental para exportação em muitos países em desenvolvimento (WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2017). Desses grãos também são produzidos a manteiga de cacau, utilizada em cosméticos e medicamentos, e cacau em pó, utilizado na confeitaria. A polpa do fruto é utilizada na produção de suco, licor, vinho, geléia e vinagre (ALMEIDA, 2016).

Os grãos também apresentam fitoquímicos benéficos para a saúde humana. Por exemplo, os flavonóides são muito úteis para reduzir o nível de pressão arterial. Já o ácido esteárico pode reduzir a hipercolesterolemia. A teofilina e a xantina são eficazes para relaxar os espasmos brônquicos com dilatação rápida dos tubos brônquicos contraídos, aliviando reações alérgicas, falta de ar e outras condições asmáticas. Enquanto a teobromina e a cafeína, presentes em quantidades mínimas, são benéficas para melhorar o humor e para reduzir a fadiga. O consumo frequente pode ser positivo para reduzir o risco de amnésia e Alzheimer e melhorar o metabolismo da glicose, sendo bom para a diabetes tipo 2 (WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2017).

O chocolate oriundo dos grãos apresenta parte ou todas as classes de fitoquímicos e também aqueles que são acrescentados durante a produção, como aditivos alimentares, fortificantes e outros ingredientes. No entanto, para que o chocolate tenha a qualidade e quantidade de fitoquímicos dos grãos, vários fatores devem ser levados em consideração, entre eles deve ser considerado a variedade e a qualidade dos grãos, as técnicas de processamento (período de fermentação, tipo de processo e duração de secagem etc), as condições de armazenamento e a natureza química dos aditivos e outros ingredientes que são adicionados na produção (WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2017).

Como visto, o cacau traz grandes benefícios para a economia e para a saúde, porém a cacauicultura é acometida por diversas doenças que prejudicam o crescimento econômico. Uma dessas doenças assolou as plantações de cacau na Bahia em 1989, fazendo com que ela deixasse de ser uma das principais exportadoras de cacau do mundo, devido a doença diminuir significativamente a sua

produção. A partir desse acontecimento, muitas fazendas declararam falência e o índice de desemprego aumentou na região. Essa doença é a vassoura-de-bruxa, que é causada pelo fitopatógeno *M. pernicioso*. Até hoje, ela acomete cacauzeiros e prejudica agricultores de vários países, principalmente situados na América do Sul e na ilha do Caribe. O fungo *M. pernicioso* é hemibiotrófico, ou seja, possui duas fases, uma fase biotrófica ou parasítica, que dura, em média, de 45 a 60 dias, e uma fase necrotrófica ou saprotrófica, que é mais intenso aos 90 dias após infecção do hospedeiro (ALMEIDA, 2016; DÍAZ-VALDERRAMA; LEIVA-ESPINOZA; AIME, 2020).

Assim que o hospedeiro é infectado ocorrem desequilíbrios hormonais, acarretando mudanças fisiológicas, histológicas e morfológicas no tecido. Os sintomas iniciam quando o fungo libera basidiósporos (esporos) pelo basidiocarpo, sob condições de clima quente e úmido, que atingem a superfície da planta, ultrapassando a defesa e instalando-se no hospedeiro. O primeiro sintoma é a hipertrofia apical dos tecidos observado entre 15 e 30 dias e com o avanço da doença, é observado o crescimento de ramos anormais chamados vassoura-verde. Após 60 dias de avanço, o crescimento do micélio dentro das células e a necrose de tecidos já estão numa fase avançada e com 90 dias tem o aparecimento da vassoura-seca, depois o fungo libera novamente basidiósporos pelo basidiocarpo e está pronto para reiniciar o ciclo em outro hospedeiro. O fruto pode ser infectado durante todo seu crescimento e as vagens jovens, se infectadas durante as primeiras semanas, perderão completamente as sementes com a podridão, assim que amadurecerem. Já as vagens maduras quando infectadas perdem parcialmente as sementes (ALMEIDA, 2016; MEINHARDT *et al.*, 2008).

As vias de sinalização de hormônios de plantas são bem conhecidas por atuarem na resposta de defesa a patógenos e estresses abióticos, como as vias de Ácido Salicílico (AS), Ácido Jasmônico (AJ) e Etileno (ET) (ALMEIDA, 2016). A via de sinalização AJ desempenha um papel central nas defesas de plantas contra patógenos necrotróficos e insetos herbívoros. Após exposição a estresses abióticos e bióticos, incluindo infecção por patógenos necrotróficos, ferimentos e ataque de insetos, é desencadeado uma cascata de fosforilação que leva a biossíntese de AJ, que por sua vez, é detectado por receptores que ativam a via de transdução de sinal envolvida na expressão de genes que respondem ao AJ, resultando na formação de barreiras químicas e físicas contra esses estresses (CARVALHAIS *et al.*, 2013).

O gene AOS codifica uma enzima chave na biossíntese de AJ. Essa enzima oxida um ácido graxo monohidroperoxi poliinsaturado chamado 13(S)-hidroperoxi-(9Z,11E,15Z)-octadecatrienoico (13S-HPOT) em uma forma epóxido instável. Primeiramente, a biossíntese de AJ começa com os fosfolipídios ácido linolênico (18:2) e ácido α -linolênico (18:3) liberados das membranas dos cloroplastos devido a ação de fosfolipases. Após serem liberados, lipoxigenases catalisam a dioxigenação dos ácidos transformando-os em 13S-HPOT, que, então é oxidado pela AOS e depois é ciclizado por uma aleno óxido ciclase para ácido 12-oxo-fitodienóico (12-OPDA). Por último, o OPDA é reduzido em AJ pela OPDA redutase 3 (OPR3) (LYONS; MANNERS; KAZAN, 2013; ZENG *et al.*, 2021).

Visto a importância deste gene e da via de sinalização AJ na defesa de plantas, foi buscado no Ensembl Plants (<https://plants.ensembl.org/index.html>) o gene AOS na espécie *Theobroma cacao Matina 1-6*, no qual foi encontrado apenas um gene AOS. Buscando o melhoramento da resistência da *T. cacao*, o método CRISPRa será utilizado para aumentar a expressão do gene AOS na folha de cacau do genótipo *Scavina-6* (Sca6) no estágio C, o que pode ser promissor para combater o fitopatógeno *M. pernicioso* na fase necrotrófica.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar um gene promissor para aumentar a resistência do *Theobroma cacao* contra o patógeno *Moniliophthora perniciosa*.

3.2 Específicos

- a) Identificar a melhor forma de utilizar a técnica de edição gênica CRISPR/Cas9;
- b) Desenhar guides RNA (gRNAs);
- c) Escolher vetores de expressão;
- d) Delinear ensaios de clonagem.

4 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento deste trabalho foi realizada uma revisão bibliográfica por meio de artigos científicos, revistas e jornais publicados na literatura nacional e internacional, publicados em bancos de dados pertinentes, incluindo NCBI, SCIELO e PUBMED. Teve-se como critério de inclusão artigos científicos, jornais e revistas publicados recentemente, de exclusão, não foram utilizados dados desatualizados.

A coleta de dados foi realizada através da utilização de termos como: “CRISPR/Cas9”, “CRISPR *activation*” e “*Theobroma cacao*”. Para garantir que todas as publicações relevantes fossem incluídas, os seguintes termos foram utilizados combinados com CRISPR/Cas9 e CRISPR *activation*: enzimas de restrição, ZFNs, TALENs, CRISPR *interference*. Os termos seguintes foram combinados com *Theobroma cacao*: CRISPR *activation*, *Moniliophthora perniciosa*, melhoramento genético, genes de defesa.

A metodologia proposta é baseada na literatura e a descrição dos resultados condiz com as atividades práticas que eu desenvolvi no Laboratório de Desenvolvimento e Inovação do Instituto Butantan, dentro da linha de pesquisa de edição gênica por CRISPR/Cas9.

4.1 Linhagens celulares

Como modelo de estudo, utilizaremos a folha de cacau do genótipo Sca6 no estágio C para transformação genética transiente com *Agrobacterium tumefaciens*, a partir da adaptação de um protocolo publicado por FISTER *et al.* (2016).

4.2 Plasmídeos

Os plasmídeos que iremos utilizar para esta proposta de estudo serão o pHSN6A01 (Addgene 50586), que contém a dCas9-V64 e o plasmídeo para controle de qualidade pCAMBIA1391z fornecido junto com a linhagem de bactéria *Agrobacterium* eletrocompetente adquirida comercialmente.

4.3 Desenho in silico dos RNA guias

Os sgRNAs serão desenhados in silico no site CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>). A partir de uma sequência genômica de interesse, o site fornece as sequências de todos os oligos e *primers* necessários para preparar os sgRNAs, testar a eficiência da modificação no alvo e acessar clivagem em potenciais sítios fora do alvo (*off-target sites*). Desenharemos mais de um sgRNA a fim de complementar a região promotora do gene, entre -425 a -50 nucleotídeos a montante do TSS, para que recrute fatores de transcrição e aumente a expressão gênica.

4.4 Desenho do cassete de transformação para ativação transcricional via dCas9

Utilizaremos o sistema SAM (*Synergistic Activation Mediator*) para transformação e este deverá ser inserido no plasmídeo a partir de digestão enzimática. Para expressão da dCas9, o promotor que será utilizado é o *CaMV35S*, os sítios de localização nuclear (NLS) do vírus do macaco SV40 serão posicionados *in tandem* devidamente espaçados por aminoácidos neutros (*linkers*) para ligar a região carboxiterminal da dCas9 a região aminoterminal da combinação de ativadores transcricionais p64 e HSF1. Dois terminadores serão posicionados *in tandem*, o terminador 35S e o NOS. Para expressão do sgRNA, utilizaremos o promotor da própria *Theobroma cacao* ou o promotor *AtU6-26* de *Arabidopsis* para espécies dicotiledôneas. Depois do sgRNA, será posicionado o *RNA scaffold*, uma porção constante importante na ancoragem e interação com a dCas9, dentro do *RNA scaffold* serão inseridos aptâmeros MS2, depois será posicionado um terminador U6 no final. Para expressão da proteína de fusão adaptador: ativadores de transcrição, será utilizado o promotor *CaMV35S*. A proteína adaptadora será a MC2 (*MS2 Coat Protein*). Com relação aos ativadores transcricionais, eles vão estar fusionados *in tandem* com a carboxiterminal da MC2, devidamente separados por *linkers*. Será inserido NLS, entre a MC2 e o primeiro ativador transcricional, no qual ele funcionará como *linker* também, além da função de transportar a proteína de fusão para o núcleo. Por fim, serão inseridos dois terminadores *in tandem*, 35S e NOS. Para expressão do marcador de seleção, será posicionado um promotor da

Theobroma cacao, em seguida, será posicionado um gene repórter, como GFP ou um gene que confere resistência a um antibiótico ou herbicida, e no final, será posicionado um terminador correspondente ao promotor. Se o plasmídeo obtido comercialmente tiver um gene que confere resistência já introduzido nele, será mantido ele. Este desenho de cassete foi delineado através da leitura do livro Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura por MOLINARI *et al.* (2020).

4.5 Bactéria

Será utilizada a bactéria *Agrobacterium* eletrocompetente da linhagem *EHA105* adquirida comercialmente (Gold Biotechnology®, EUA). Essa cepa contém um gene de resistência à rifampicina (rif) e um plasmídeo Ti básico pEHA105 (pTiBo542DT-DNA) sem função de autotransporte e contendo o gene *vir*.

4.6 Ensaios de Clonagem

A fosforilação, anelamento e inserção de sgRNA em vetor pHSN6A01 (Addgene 50586) serão realizados de acordo com o protocolo descrito por RAN *et al.* (2013) com as modificações propostas por BORREGO *et al.* (2022). Resumidamente, a etapa de fosforilação e anelamento começa com o mix de componentes a seguir: 1 µL de oligo gDNA *TOP* [100 µM], 1 µL de oligo gDNA *BOTTOM* [100 µM], 1 µL de T4 *Ligation Buffer* 10X com ATP, 1 µL de T4 PNK (Polinucleotídeo *Kinase*) e dH₂O (água destilada) q.s.p. 10 µL. Após realizar o mix, é realizado o anelamento no termociclador PCR, cujo programa é: 37°C por 30 min., 95°C por 5 min e um *Rampdown* para 25°C com taxa de 5°C por minuto. Terminando o anelamento, deve-se diluir o mix em 100x a temperatura ambiente (1 µL do oligo e 99 µL de dH₂O) e armazená-lo à -20°C.

O protocolo para a inserção de sgRNA em plasmídeo é descrito a seguir: 2 µL do vetor [50 ng], 2 µL de oligo anelado e diluído, 2 µL de Tango *Buffer* 10x, 1 µL de DTT [10 mM], 1 µL de ATP [10 mM], 0,5 µL de enzima de restrição, 0,5 µL de T4 Ligase e dH₂O q.s.p. 20 µL. O mix deve ser colocado no termociclador PCR, cujo programa é: 37°C por 5 min. e 21°C por 5 min. em 24 ciclos. 37°C por 15 min. e 4°C *forever*.

O plasmídeo bacteriano de expressão em plantas contém a dCas9, os genes de resistência aos antibióticos canamicina e espectinomicina e o cassete de transformação adicional descrito anteriormente.

A introdução do plasmídeo em linhagem competente de bactéria *Agrobacterium*, linhagem *EHA105*, será realizada por eletroporação num equipamento Eporator® (Eppendorf, Alemanha). Após a eletroporação, as bactérias serão recuperadas em meio SOC por 1h a 37 °C, sob agitação. Em seguida, as bactérias serão semeadas em placas de petri contendo meio LB ágar com canamicina ou espectinomicina. As colônias que crescerem serão coletadas para a extração e purificação do plasmídeo com o *ChargeSwitch - Pro Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA).

4.7 Confirmação da clonagem com PCR de colônia

A confirmação da clonagem será realizada escolhendo algumas colônias da placa e inserindo-as em um mix de PCR contendo Tampão (10X), dNTP (2,5 µM), MgCl₂ (25 mM), *primer forward* da região promotora AtU6-26 do plasmídeo (20 µM), 5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC-3'), Ran et al; 2013, *primer reverse* sgRNA (20 µM), Taq DNA polimerase (5U) e H₂O RNase-free q.s.p. 23 µL. O estágio de desnaturação (*Stage 1*) do programa do PCR de colônia será em 95°C-10 min. O estágio de anelamento (*Stage 2*) será programado para 35 ciclos, com as temperaturas alternando em: 95°C por 30 seg., 49°C por 30 seg., 60°C por 30 seg., 72°C por 30 seg. Finalizando com o estágio de extensão (*Stage 3*) em 72°C por 8 min e depois com a temperatura (∞) em 4°C. O produto do PCR será preparado para ser aplicado em gel de agarose e se houver a presença da banda, será confirmada a transformação da bactéria.

4.8 Transfecção por *Agrobacterium* nas folhas Sca6

Para uma maior probabilidade de as folhas serem transformadas com sucesso, é essencial que estejam no estágio C, que é quando possuem uma coloração que varia entre bronze e verde-claro. Antes da infiltração nas folhas, será adicionado Silwet L-77 às culturas de *Agrobacterium* para atuar como surfactante (para uma cultura de 30 mL, são adicionados 6 µL de Silwet para ter uma

concentração final de 0,02%). Será despejado a suspensão induzida da *Agrobacterium* em placas de petri rotuladas com o nome do vetor na parte inferior da placa. Com as tampas removidas, as placas serão colocadas no dessecador. As folhas serão cortadas com bisturi para produzir duas partes, mas primeiro serão removidas as pontas e a base das folhas e depois serão divididas em duas partes de tamanho igual (é importante que o tamanho de cada parte seja grande suficiente para inoculação com fitopatógenos). As bordas cortadas serão seladas com parafina derretida para limitar a dessecação das veias expostas. As partes serão guardadas em saco plástico lacrado com gazes molhadas para manter a umidade. Será selecionada uma parte de folha para ser colocada em cada placa com *Agrobacterium*, com o lado abaxial para baixo. A outra parte da mesma folha deve receber o outro tratamento com o vetor controle. Fechar o dessecador com tampa.

Após as folhas serem infiltradas com *Agrobacterium*, elas serão mantidas em um ambiente controlado a 25°C com 50% de umidade relativa e um ciclo de 12h/12h claro-escuro. Os níveis de luz são mantidos em $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, usando lâmpadas fluorescentes de 4100K Kelvin.

Após esterilizar uma capela de fluxo laminar com luz UV por, no mínimo, 2 minutos e limpar a área com etanol 70%, as folhas serão inoculadas em placas maduras contendo o fitopatógeno *M. perniciosa*, mas primeiro, serão feitos furos nas bordas das culturas para inoculação das folhas. As folhas serão incubadas a 28°C, com ciclo claro/escuro (12h/12h) até observar desenvolvimento de lesões e se há diferenças no tamanho das lesões nas folhas controle e não-controle. Essa metodologia foi retirada do protocolo publicado por FISTER *et al.* (2016).

4.9 Testes funcionais

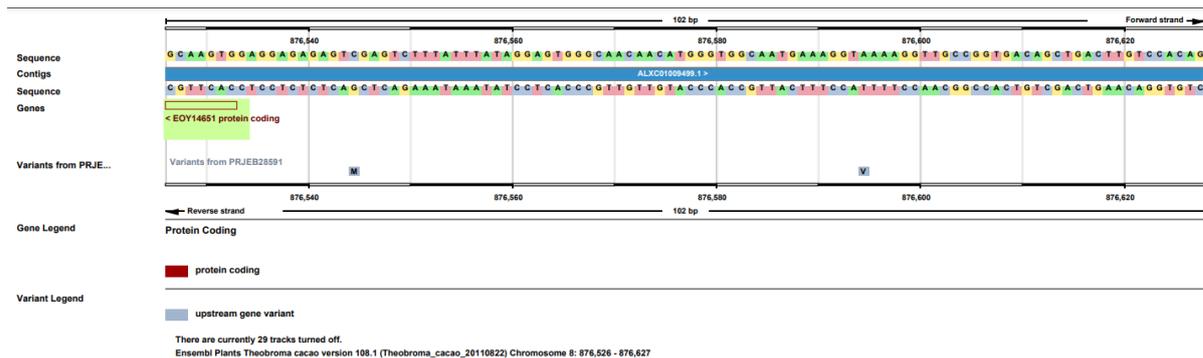
Serão realizados ensaios de extração de DNA e RNA das folhas transformadas e expostas ao fitopatógeno *M perniciosa*, para ensaios de sequenciamento gênico e experimentos de *Real Time Quantitative* PCR (qPCR) para quantificar e confirmar o aumento da expressão do gene AOS.

5 RESULTADOS E ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

5.1 Resultados iniciais para o melhoramento do cacau com CRISPR

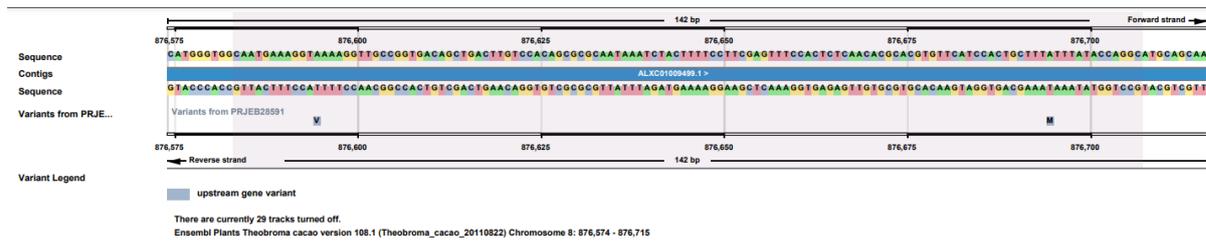
Através do site Ensembl Plants, buscamos o gene AOS na espécie *Theobroma cacao Matina 1-6*, no qual o ID de transcrição do gene se chama EOY14651 e no UniProt (<https://www.uniprot.org/>) é identificado como A0A061FCC5. Esse gene possui 2221 pb, 531 aminoácidos e apenas 1 éxon, entretanto, considerando que precisamos da região promotora do gene e por falta de dados sobre ela, buscamos manualmente uma sequência entre -425 a -50 nucleotídeos a montante do TSS. Desconsideramos a sequência da extremidade 5' de 50 nucleotídeos a montante do éxon e começamos a coletar uma sequência de 425 nucleotídeos (Figura 4). Devido ao zoom e de modo a facilitar a coleta de nucleotídeos após a sequência de 50 nucleotídeos, marcamos uma região de 125 nucleotídeos e continuamos a coleta a partir dela (Figura 5). Marcamos e coletamos mais uma região de 162 nucleotídeos (Figura 6). Por fim, após a sequência de 162 nucleotídeos, marcamos e coletamos uma última região de 138 nucleotídeos, totalizando 425 nucleotídeos (Figura 7).

Figura 4 - Sequência de nucleotídeos a montante do éxon



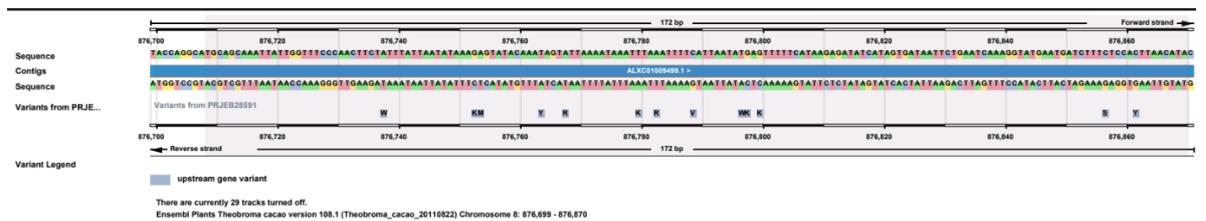
Fonte: ENSEMBL PLANTS, 2022.

Figura 5 - Região de 125 nucleotídeos marcada



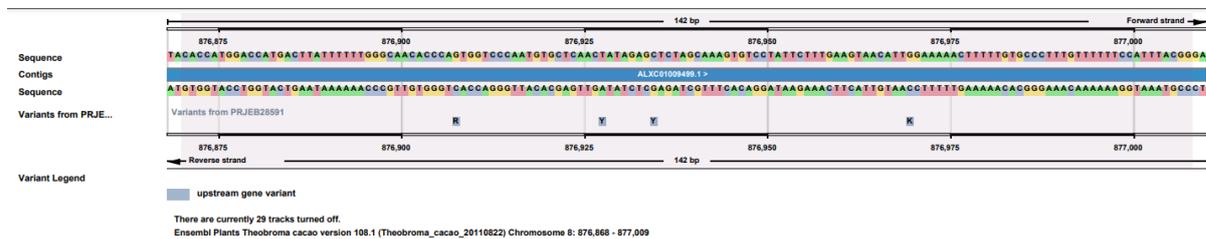
Fonte: ENSEMBL PLANTS, 2022.

Figura 6 - Região de 162 nucleotídeos marcada



Fonte: ENSEMBL PLANTS, 2022.

Figura 7 - Região de 138 nucleotídeos marcada



Fonte: ENSEMBL PLANTS, 2022.

A partir da sequência coletada (3'-GTTACTTTCCATTTTCCAACGGCCACTGTCGACTGAACAGGTGTCGCGCGTTATTTAGATGAAAAGGAAGCTCAAAGGTGAGAGTTGTGCGTGCACAAGTAGGTGACGAAATAAATATGGTCCGTACGTCGTTTAAATAACCAAAGGTTGAAGATAAATAATATATTTCTCATATGTTTATCATAATTTTATTTAAATTTAAAAGTAATTATACTCAAAGTATTCTCTATAGTATCACTATTAAGACTTAGTTTCCATACTTACTAGAAAGAGGTGAATTGTATGTGGTACCTGGTACTGAATAAAAAACCCGTTGTGGGTACCAGGGTTACACGAGTTGATATCTCGAGATCGTTTACAGGATAAGAACTTCATTGTAACCTTTTTGAAAAACACGGGAAACAAAAAGGTAATGCC-5') desenhamos dois sgRNAs no site CRISPOR afim de complementar a região promotora do gene com mais especificidade. Escolhemos o segundo gRNA e o quarto gRNA (Figura 8).

Figura 8 - Sequências de gRNAs e PAMs prováveis

Position/ Strand	Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes <input type="checkbox"/> Only G- <input type="checkbox"/> Only GG- <input type="checkbox"/> Only A-	MIT Specificity Score	CFD Spec. score	Predicted Efficiency <small>Show all scores</small> Doench '16 Mor-Mateos		Outcome <small>Out-of-Frame</small> Lindel		Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM	Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score <small>No exons. No match, no chrom filter</small>
16 / rev	GTTCACTCGACAGTGGCCGT TGG Enzymes: <i>BshFI, AcoI</i> Cloning / PCR primers	100	100	--	--	--	--	0-0-0-1-2 0-0-0-0-0 3 off-targets	4:scaffold_3_7.84 Mbp 4:scaffold_3_7.84 Mbp 3:scaffold_8_6.24 Mbp
23 / rev	GACACCTGTTCACTCGACAG TGG Enzymes: <i>BshFI, SalI, Hpy166II, HpyCH4III, HincII, AcoI, TspRI, BstXI, MspI, FspI</i> Cloning / PCR primers	100	100	--	--	--	--	0-0-0-0-2 0-0-0-0-0 2 off-targets	4:scaffold_6_22.58 Mbp 4:scaffold_2_39.88 Mbp
39 / fw	ACGGCCACTGTGACTGAC AGG Cloning / PCR primers	100	100	--	--	--	--	0-0-0-2-0 0-0-0-0-0 2 off-targets	3:scaffold_9_32.11 Mbp 3:scaffold_3_2.41 Mbp
314 / rev	GTAACCCTGGTGACCCACAA CGG Enzymes: <i>BstI</i> Cloning / PCR primers	100	100	63	66	76	84	0-0-0-0-2 0-0-0-0-0 2 off-targets	4:scaffold_1_7.33 Mbp 4:scaffold_10r_8.99 Mbp
327 / rev	GATATCAACTCGTGAACCC TGG Enzymes: <i>AsuHPI, Tsp45I, BseDI, MaeIII, LpnPI, BstNI, BstEII, StyD4I</i> Cloning / PCR primers	100	100	61	15	68	75	0-0-0-0-3 0-0-0-0-0 3 off-targets	4:scaffold_2_8.09 Mbp 4:scaffold_10r_21.60 Mbp 4:scaffold_6_22.38 Mbp
329 / fw	AAAACCCGTTGTGGTCAAC AGG Enzymes: <i>Tsp45I, BseDI, MaeIII, LpnPI, BstNI, BstEII, StyD4I</i> Cloning / PCR primers	100	100	49	40	67	63	0-0-0-1-1 0-0-0-1-0 2 off-targets	4:scaffold_9_29.05 Mbp 3:scaffold_6_15.78 Mbp
65 / fw	CSCCGCTATTAGATGAAA AGG Enzymes: <i>AkuRI, TspD7I</i> Cloning / PCR primers	99	99	35	37	64	72	0-0-0-0-3 0-0-0-0-0 2 off-targets	4:scaffold_2_10.61 Mbp 4:scaffold_6_21.05 Mbp 4:scaffold_6_23.39 Mbp

Legenda: A segunda sequência *reverse* GACACCTGTTCACTCGACAG (PAM: TGG) e a quarta sequência *reverse* GTAACCCTGGTGACCCACAA (PAM: CGG) foram escolhidas.

Fonte: ENSEMBL PLANTS, 2022.

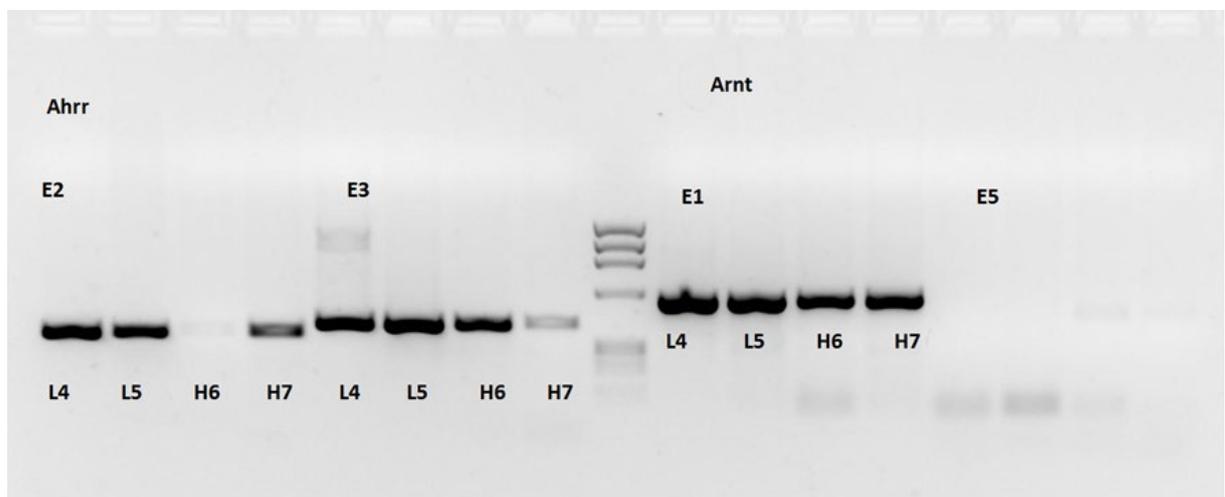
5.2 Atividades Desenvolvidas

Os resultados obtidos e descritos neste trabalho são de outros projetos executados pelos pesquisadores Dra. Andrea Borrego e Dr. José Ricardo Jensen realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Inovação (LDI) e em parceria com o *Centre of Excellence in New Target Discovery* (CENTD), ambos do Instituto Butantan. Realizei experimentos como PCR, eletroforese em gel de agarose, purificação de produto de PCR e preparo de amostras para o sequenciamento de Sanger, além de experimentos de expressão gênica. As atividades desenvolvidas bem como a metodologia utilizada serão abaixo descritas.

Um projeto realizado no LDI e coordenado pelo Dr. José Ricardo Jensen, foi o de expressão de genes da via de ativação do AhR (receptor de aril hidrocarbonetos) e suscetibilidade à artrite em camundongos. O objetivo visava investigar a hipótese de que a expressão dos genes *Arnt* (translocador nuclear do AhR) e *Ahrr* (repressor do AhR) da via de ativação do AhR e mediadores inflamatórios, em tecidos e células com potencial relevância na artrite induzida por pristane (PIA), é divergente em camundongos suscetíveis (LIII) e resistentes (HIII) à PIA. Uma série de *primers* foram desenhados para serem específicos a sequências menores dos genes *Arnt* e

Ahrr, com sobreposições entre elas e que quando combinadas reconstituem as sequências codificantes de cada gene. O resultado foi parcialmente positivo, mostrando que há uma ligação entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento da artrite reumatoide em camundongos suscetíveis e resistentes, entretanto, é necessário realizar mais testes para que se confirme esta hipótese. Neste trabalho fiz ensaios de PCR e géis de agarose para a confirmação dos resultados. Abaixo a fotografia de um dos géis de agarose que realizei (Figura 9).

Figura 9 - Amplificação dos genes *Ahrr* e *Arnt*



Legenda: Gel de Agarose 1,5%, corado com BET, visualizado após 1:30hs de corrida à 100V. As amostras L são dos camundongos LIII e H são dos camundongos HIII. Na parte esquerda da figura estão as bandas amplificadas com os *primers* E2 (540bp) e E3 (550bp) do gene *Ahrr* e na parte direita à amplificação do *primer* E1(600 bp) do gene *Arnt*, pode-se observar que nesta reação não houve amplificação do *primer* E5. O marcador de peso molecular (PM) utilizado foi o X174 DNA/BsuRI (HaeIII), ThermoScientific.

Fonte: Próprio autor, 2022.

O CENTD, cujo o objetivo é combinar a expertise dos pesquisadores do Instituto Butantan (bioquímica, farmacologia, bioinformática/OMICS, biologia molecular e celular, imunologia e ensaios *in vitro* e *in vivo*) à experiência da farmacêutica GSK, tem como missão pesquisar e validar novos alvos moleculares envolvidos em doenças inflamatórias e câncer, visando o desenvolvimento de fármacos, utilizando venenos, secreções de animais e moléculas derivadas como ferramentas de estudo. Atualmente, um dos focos principais do CENTD envolve a validação dos alvos por diversas técnicas, sendo uma das principais a tecnologia de CRISPR/Cas9. Devido a questões de confidencialidade dos projetos da GSK, os

nomes dos genes alvos definidos para estudo serão omitidos, sendo denominados neste trabalho como gene 1, gene 2 e gene 3.

No primeiro projeto, já em andamento, o objetivo foi o de nocautear o gene 1, assim, toda a parte experimental que envolvia a fosforilação dos óligos, inserção nos plasmídeos, clonagem, transdução, obtenção de clones únicos, expansão dos clones e sequenciamento já havia sido feita. O resultado obtido foi de 10 clones editados. Todos os clones apresentaram um perfil muito semelhante no sequenciamento gênico (Figura 10), sugerindo que a edição gênica tenha sido monoalélica, ou seja em apenas um dos cromossomos da célula. Realizei ensaios de PCR para confirmar a heteroduplex dos clones obtidos após o nocaute do gene 1 e eletroforese em gel de agarose 4% para a confirmação dos resultados.

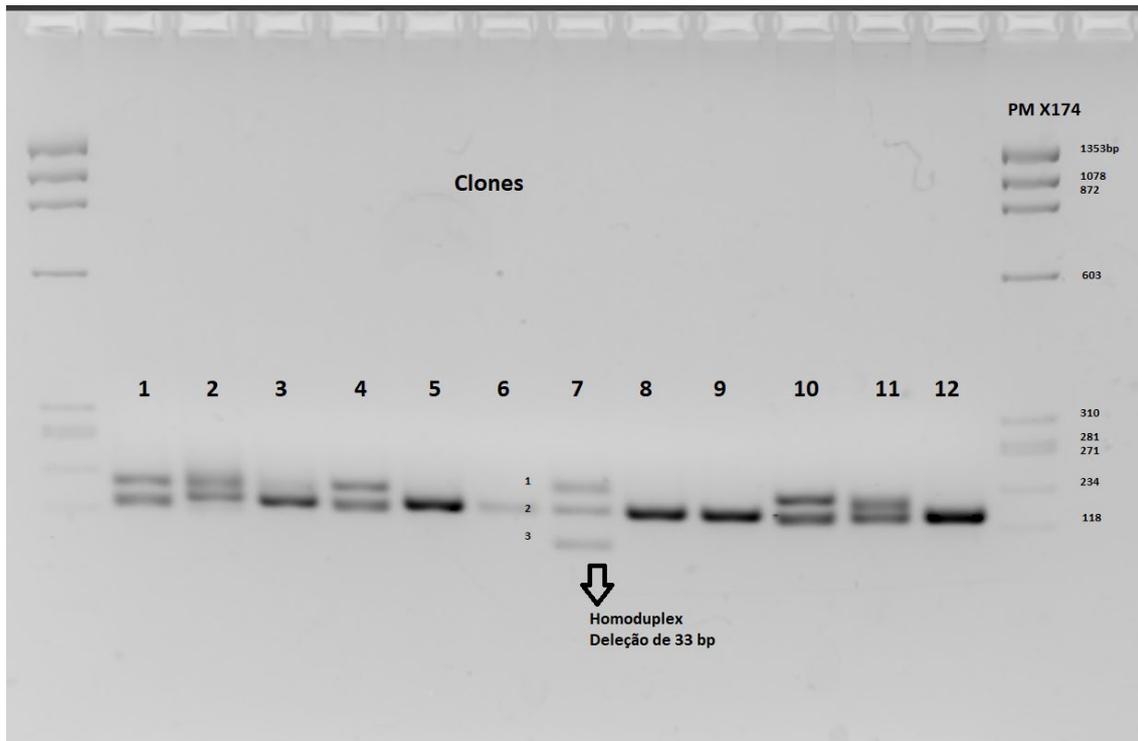
Figura 10 - Sequências de 2 clones da região editada com CRISPR/Cas9 no gene 1



Legenda: Eletroferograma do clone 9 - clone não editado (sequência wild type / selvagem); Clone 7: clone com deleção de 33pb; **Contig 1:** banda inferior (Clone 7) purificada de gel de agarose 4% para detecção de heteroduplexes (notar no retângulo a sequência com deleção de 33pb); Bandas 1-2: Bandas superiores (Clone 7) purificadas de gel de agarose 4% para detecção de heteroduplexes (Notar no círculo a presença de picos duplos sugerindo presença de sequências editadas e não editadas).

Fonte: Próprio autor, 2022.

Figura 11 - Gel para confirmação do heteroduplex nos clones do gene 1

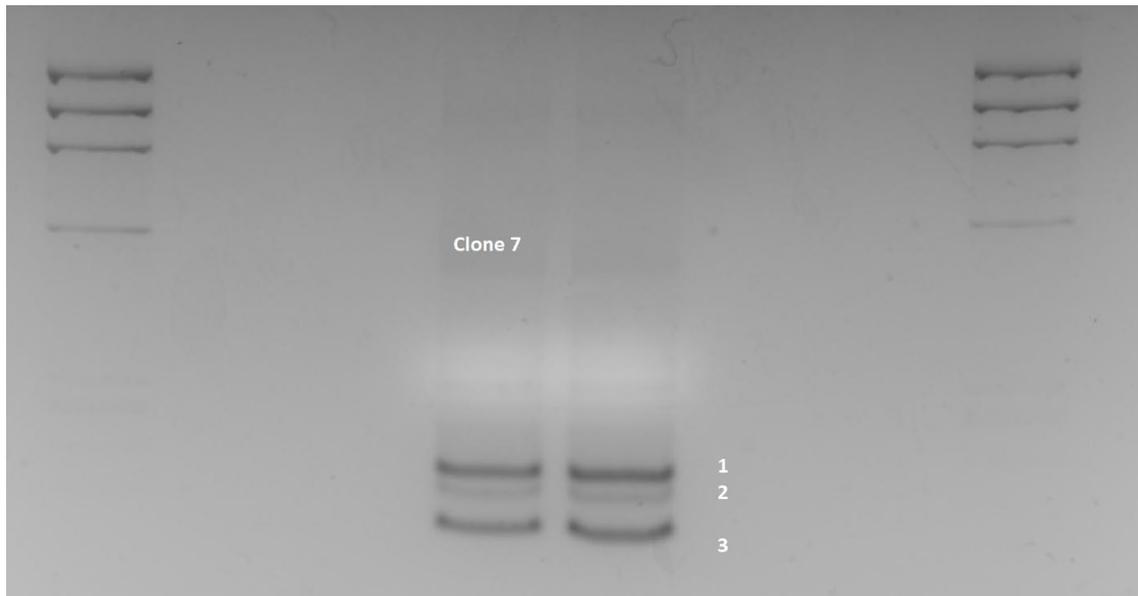


Legenda: Produto da PCR do heteroduplex, visualizado em gel de agarose 4%, corado com BET, após 4 horas de corrida à 120V. Fragmento amplificado de 204 bp. Os números representam os clones que sofreram alguma edição, exceto os números 9 e 11 que são respectivamente, clone não editado e célula controle. O marcador de peso molecular (PM) utilizado foi o X174 DNA/BsuRI (HaeIII), ThermoScientific.

Fonte: Próprio autor, 2022.

A partir deste resultado, escolhemos o clone 7 (cuja edição resultou em uma deleção de 33pb) para realizar um novo PCR heteroduplex. Após, foi feito novamente um gel de agarose 4% para purificar as bandas do produto de PCR e sequenciar em seguida (Figuras 12 e 13). Utiliza-se essa concentração de agarose de 4% para que o gene 1, que tem uma deleção de 33 pb em apenas um dos alelos percorra o gel, separando do alelo que não sofreu alteração e do alelo oriundo do heteroduplex. Após a PCR foi feita uma purificação das bandas do gel de agarose, seguindo o protocolo do kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega.

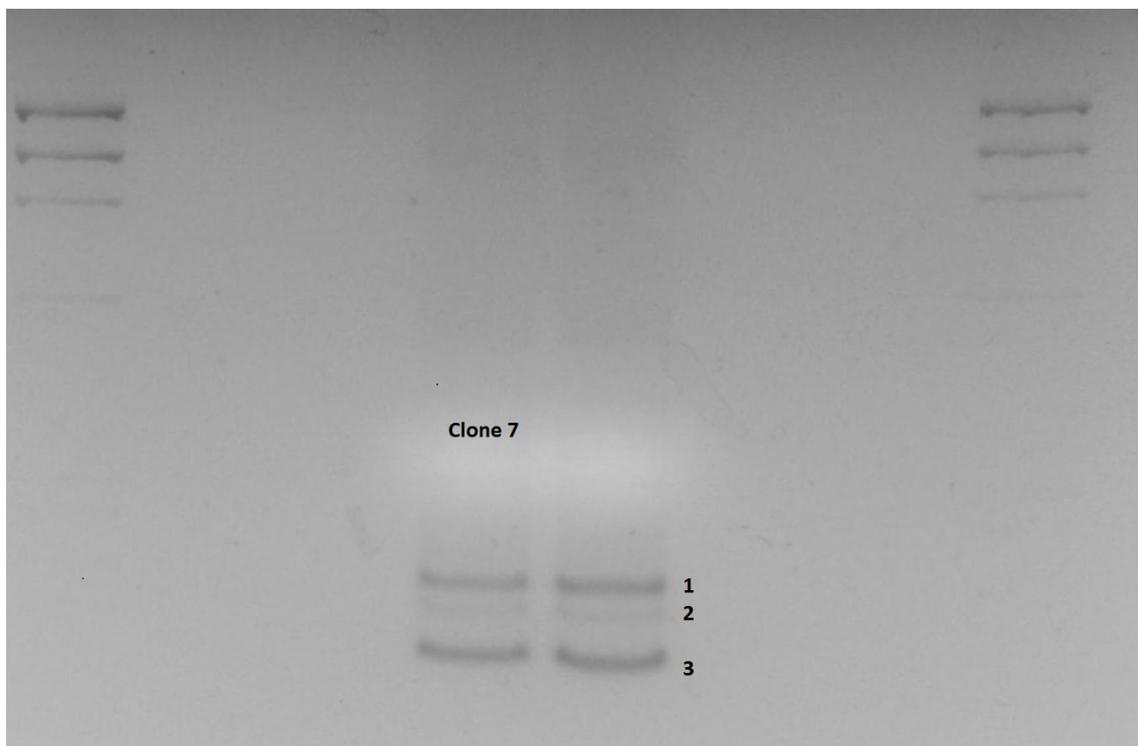
Figura 12 - Gel heteroduplex do clone 7 - 2 horas



Legenda: Produto da PCR do heteroduplex do clone 7, visualizado em gel de agarose 4%, corado com BET, após 2 horas de corrida à 80V. Fragmento amplificado de 204 bp. Observa-se a presença de 3 bandas. O marcador de peso molecular (PM) utilizado foi o X174 DNA/BsuRI (HaeIII), ThermoScientific.

Fonte: Próprio autor, 2022.

Figura 13 - Gel heteroduplex do clone 7 - 4 horas



Legenda: Produto da PCR do heteroduplex do clone 7, visualizado em gel de agarose 4%, corado com BET, após 4 horas de corrida à 80V. Fragmento amplificado de 204 bp. Observa-se mais claramente a presença de três bandas, sendo a número 3 o heteroduplex do clone 7. Estas bandas

foram retiradas do gel e purificadas conforme já descrito. O marcador de peso molecular (PM) utilizado foi o X174 DNA/BsuRI (HaeIII), ThermoScientific.

Fonte: Próprio autor, 2022.

Participei de outros projetos do CENTD, que também visavam o nocaute com CRISPR/Cas9, um do gene 2 por meio de transfecção com vetor bacteriano e outro do gene 3 por meio de transdução com vetor lentiviral em células neuronais sensitivas humanas. Para estes experimentos utilizamos os plasmídeos lentiCRISPR v2 (Addgene 52961), pSCas9(BB)-2A-GFP PX458 (Addgene 48138) e pSpCas9(BB)-2A-Puro PX459 (Addgene 62988), os quais foram identificados pelos números 6, 4 e 10, respectivamente. Assim, para a obtenção do DNA plasmidial, utilizamos os kits Mini e Midiprep, (ChargeSwitch-Pro Plasmid Midprep, Invitrogen e PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit, Thermo Fisher Scientific, respectivamente).

A bactéria utilizada foi a *E. coli* da linhagem *StbI3*, que pode ser adquirida comercialmente (ThermoFisher Scientific, EUA), porém, nesses experimentos, as bactérias foram preparadas (em nosso laboratório) para se tornarem eletrocompetentes. Cujo preparo está descrito abaixo.

A etapa de pré-inóculo é dividida em duas partes. A primeira parte foi realizada a semeadura da bactéria *E. coli*, em duas placas de petri, uma placa contendo meio LB ágar com 0,1% de ampicilina para controle negativo e outra placa contendo apenas meio LB ágar. As placas foram incubadas na estufa à 37°C overnight.

No dia seguinte, foi observado o crescimento de colônias bacterianas nas placas sem o antibiótico, o controle negativo (placa com antibiótico) não houve crescimento de bactérias, assim, a segunda parte do pré-inóculo foi realizada. Da placa com colônias, foi retirada uma colônia com uma ponteira estéril, transferindo-a para um tubo de 50 mL contendo 3 mL de meio LB líquido. Foi feito um controle negativo nas mesmas condições, porém, com 3 µL de ampicilina [100mg/mL] no meio. Ambos os tubos foram incubados no shaker à 37°C sob agitação de 220 rpm com a tampa semi-aberta overnight.

A etapa de inóculo foi iniciada após observar a ausência de turbidez no controle negativo. Utilizando o pré-inóculo sem ampicilina, o inóculo foi feito em 500 mL de LB líquido, dividido em dois erlenmeyers de 1 litro (250 mL em cada) estéreis, com tampa de algodão e gaze. Estes foram incubados no shaker à 37°C sob agitação de 220 rpm até atingir a densidade óptica (D.O.) de 600. Ao atingir a D.O.

confirmada por espectrofotometria, o conteúdo do erlenmeyer foi separado em tubos de 50 mL, devido à centrifuga disponível, e, em seguida, os tubos foram incubados em gelo por 30 minutos.

Nas etapas seguintes, de centrifugação e lavagem, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 4°C por 3220g. Na primeira lavagem, foi desprezado o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensionado em 100 mL de glicerol 10% (estéril) gelado. A ressuspensão foi feita com o auxílio da pipeta em *up down* sem encostar no pellet. Na segunda lavagem, os tubos foram centrifugados novamente nas mesmas condições, desprezando o sobrenadante e ressuspensionando o precipitado em 50 mL de glicerol 10% gelado. Na terceira lavagem, foi repetido o mesmo processo da segunda lavagem. Os tubos foram centrifugados novamente nas mesmas condições e ressuspensionados em 2-3 mL de glicerol 10% gelado. O conteúdo final foi aliquoteado em porções de 50 µL em tubos de 600 µL e imediatamente acondicionados em gelo seco. As alíquotas foram armazenadas em freezer -80°C.

O protocolo para a preparação do meio de cultura LB líquido ou ágar e a preparação de placas com e sem o antibiótico ampicilina estão descritos abaixo.

A composição de meio de cultura LB ágar para 1 litro é 10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 10g de cloreto de sódio, 20g de ágar e 1000 mL de H₂O. Para o meio líquido não é necessário adicionar ágar. A esterilização do meio de cultura é feita na autoclave à 120°C por 20 minutos.

Para a preparação das placas de petri com ampicilina foi feita uma diluição de 20 mL de LB ágar e 20 µL de ampicilina [100mg/mL]. Na placa sem ampicilina, é adicionado somente LB ágar. Para adicionar a ampicilina é importante que o meio LB ágar esteja em uma temperatura entre 50°C a 55°C. Antes das placas serem utilizadas, elas devem ser submetidas a uma prova de contaminação, ficando 48h dentro da estufa em vez de ficarem dentro do refrigerador (4°C). Provando que não há crescimento bacteriano (contaminação), as placas podem ser guardadas e utilizadas posteriormente.

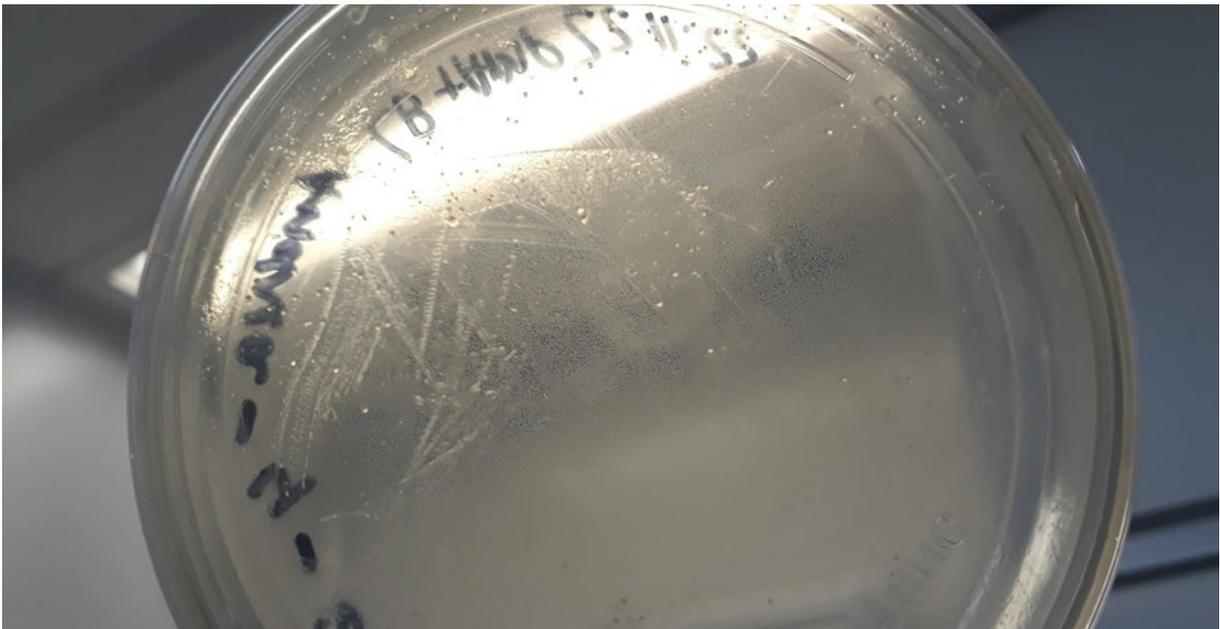
Posteriormente, já com o DNA dos plasmídeos 4, 6 e 10 extraídos e as bactérias eletrocompetentes prontas, iniciamos os experimentos que consistem na fosforilação, anelamento e inserção de sgRNAs nos plasmídeos e clonagem em bactéria eletrocompetente por eletroporação (estes procedimentos estão descritos na seção de material e métodos).

Após o processo de eletroporação as bactérias foram semeadas em placas de petri e deixadas overnight em estufa à temperatura de 37°C.

As figuras 14 e 15 mostram o crescimento de colônias transformadas com os vetores 4 e 10. Não obtivemos crescimento de colônias transformadas com o vetor 6.

Para o experimento do gene 2, utilizamos uma estratégia de co-transfecção, ou seja, 4 pares de sgRNA guides para 2 plasmídeos (pSCas9(BB)-2A-GFP PX458 - denominado vetor 4 e o pSpCas9(BB)-2A-Puro PX459 - denominado vetor 10). Assim, a combinação para os ensaios de clonagem foi: *Primers*: 1F e 1R e 2F e 2R clonados individualmente no plasmídeo 4 e as sequências 3F e 3R e 4F e 4R clonadas individualmente no plasmídeo 10. As figuras abaixo contemplam apenas 1 placa de cada um dos plasmídeos. Porém, todas as demais clonagens funcionaram.

Figura 14 - Crescimento de colônias bacterianas transformadas com o plasmídeo 4



Legenda: Placa de petri com 20 mL de LB ágar contendo 20 µL de ampicilina [100mg/mL], semeada com a bactéria *E. coli*, da linhagem *Stb/3*, após clonagem com o plasmídeo 4. A placa permaneceu overnight (16hs) a 37°C na estufa. Observa-se o crescimento de algumas colônias bacterianas, o que indica que a clonagem funcionou.

Fonte: Próprio autor, 2022.

Figura 15 - Crescimento de colônias bacterianas transformadas com o plasmídeo 10

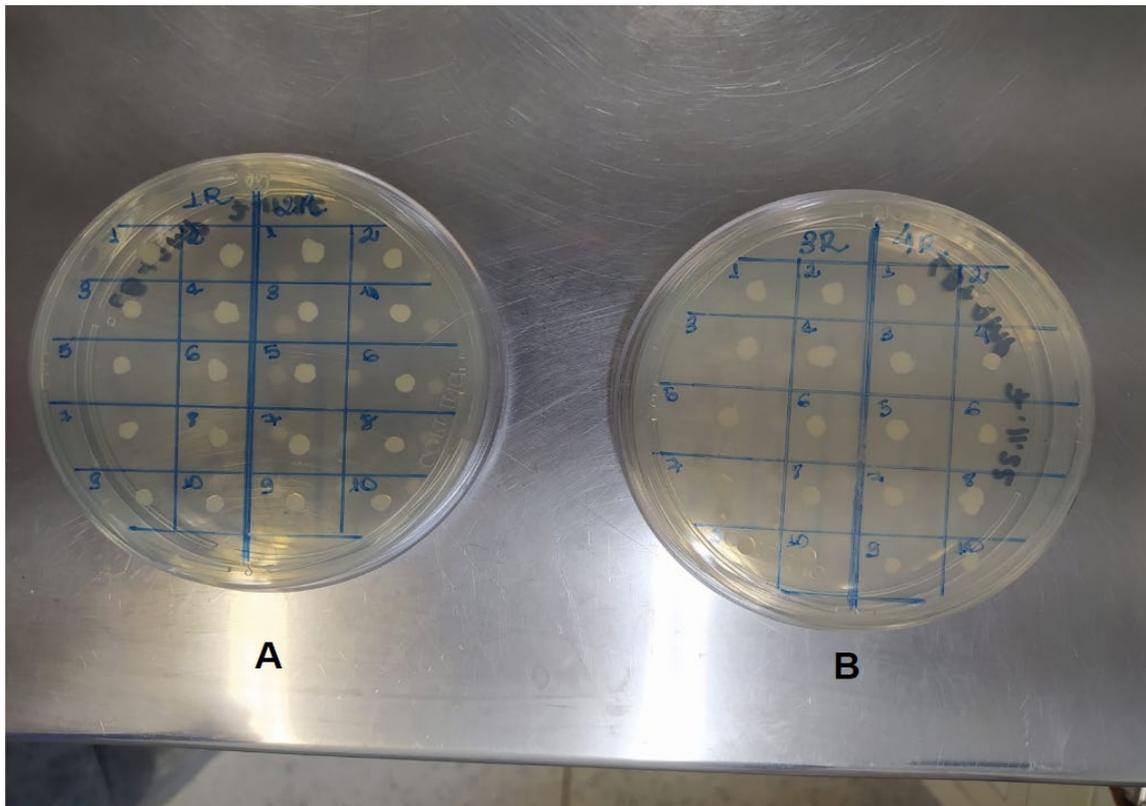


Legenda: Placa de petri com 20 mL de LB ágar contendo 20 μ L de ampicilina [100mg/mL], semeada com a bactéria *E. coli*, da linhagem *Stb/3*, após clonagem com o plasmídeo 10. A placa permaneceu overnight (16hs) a 37°C na estufa. Observa-se o crescimento de muitas colônias bacterianas, o que indica que a clonagem funcionou.

Fonte: Próprio autor, 2022.

Após esta etapa, retiramos 10 colônias de cada uma das placas e passamos as mesmas para novas placas de petri com LB ágar e ampicilina [100 mg/mL], nosso objetivo foi de isolar as colônias para a realização do PCR. O procedimento foi feito raspando gentilmente a ponta de uma ponteira (estéril) em uma colônia e transferindo-a para uma outra placa (devidamente marcada para melhor visualização) (Figura 16). Nesse mesmo procedimento realizamos as placas controle com os plasmídeos 4 e 10 sem sgRNA (Figura 17).

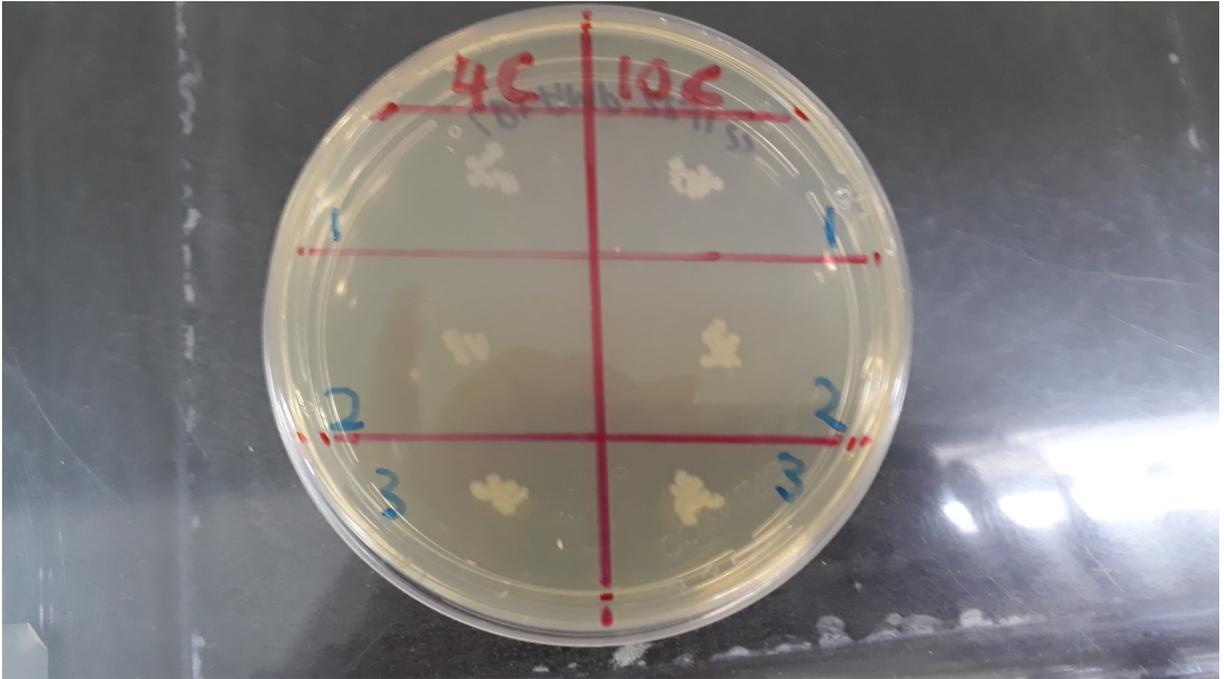
Figura 16 - Colônias isoladas dos plasmídeos 4 (A) e 10 (B)



Legenda: 11 Placas de petri com 20 mL de LB ágar contendo 20 μ L de ampicilina [100mg/mL], após ficarem overnight a 37°C na estufa. As colônias foram individualmente transferidas das placas obtidas anteriormente. A placa A identifica o plasmídeo 4 e a placa B o plasmídeo 10. Os números de 1 a 10 são referentes as combinações feitas.

Fonte: Próprio autor, 2022.

Figura 17 - Colônias isoladas dos plasmídeos controle 4 e 10

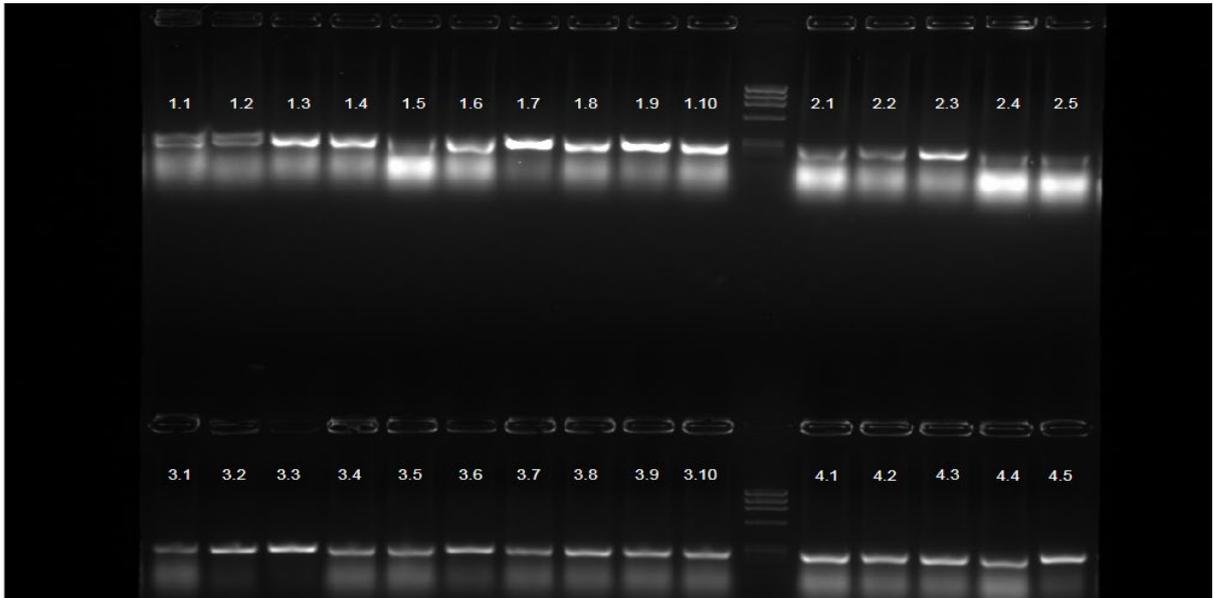


Legenda: Placa de petri com 20 mL de LB ágar contendo 20 μ L de ampicilina [100 μ g/mL] após ficar overnight à 37°C na estufa. Os números 4C e 10C representam os plasmídeos controle, ou seja, sem o sgRNA.

Fonte: Próprio autor, 2022.

Para confirmar a clonagem dos plasmídeos 4 e 10, foi realizado o PCR de colônia, como descrito nos materiais e métodos, utilizando sempre o *primer* F (*forward*) da U6 e o *primer* R (*reverse*) do gene de interesse. Os resultados obtidos nos géis de agarose são das combinações 1 e 2 (plasmídeo 4), 3 e 4 (plasmídeo 10) da Figura 16 (Figuras 18 e 19). Pode-se observar a presença de uma banda de aproximadamente 310 bp, o que confirma que o sgRNA está inserido no plasmídeo. Os próximos passos serão a purificação do produto da PCR de colônia para o sequenciamento e posteriormente a transfecção nas células.

Figura 18 - Gel de agarose do PCR de colônia do gene 2



Legenda: Produto do PCR de colônia, visualizado em gel de agarose 4%, corado com BET, após 1:30 horas de corrida à 120V. Nessa figura, todas as 10 colônias de cada combinação apresentaram bandas no tamanho de 310 pb, demonstrando resultados positivos.

Fonte: Próprio autor, 2022.

Figura 19 - Clones identificados no gel de agarose



Legenda: Produto do PCR de colônia, visualizado em gel de agarose 4%, corado com BET, após 1,30 horas de corrida à 120V. O poço identificado como C foi uma suspeita de colônia transformada com o plasmídeo 6 na placa, mas não indicou nenhuma banda. Os outros clones da figura demonstraram resultados positivos.

Fonte: Próprio autor, 2022.

6 DISCUSSÃO

Embora eu não tenha executado os experimentos para o melhoramento do cacau, executei experimentos em outros projetos que utilizam a técnica de edição gênica por CRISPR/Cas9, assim, realizei experimentos de desenho de guides, fosforilação de oligonucleotídeos, inserção dos oligonucleotídeos em plasmídeos, clonagem, PCR de colônia, eletroforese em gel de agarose, entre outros. O CRISPR/Cas9 é uma ferramenta de grande potencial, de fato, que pode ser utilizada tanto na medicina, quanto na agricultura, mas, aparentemente, ao realizar minhas pesquisas, percebi que há poucos estudos utilizando o CRISPR/Cas9 e, principalmente, os derivados do CRISPR, como CRISPRa e CRISPRi, em plantas, acredito que esses sistemas devam ser mais utilizados, inclusive para aquelas espécies que correm o risco de extinção, como o cacau. Além do mais, os novos sistemas têm a vantagem de não precisar causar dano ao DNA e de atingir o gene inteiro, ativando ou inativando a expressão dele. O CRISPRi, por exemplo, pode contribuir bastante em estudos de farmacoterapia, pois apenas silenciando o gene parcialmente pode imitar a ação de um medicamento promissor.

Há uma dificuldade de encontrar comercialmente os plasmídeos com o sistema desejado para plantas, portanto, temos que obter conhecimento mais aprofundado para construir o plasmídeo ideal no próprio laboratório. No protocolo do Fister et al. (2016), eles utilizaram um plasmídeo com EGFP, uma proteína de fluorescência verde aprimorada, que quando expressa pode ser observada em um microscópio de fluorescência, sendo viável para controlar as transformações em *Agrobacterium* e em folhas, então é uma alternativa construir um plasmídeo com esse marcador também.

Outro obstáculo encontrado é a falta de dados para utilizar o sistema CRISPRa em *Theobroma cacao*. Sites que fornecem o desenho de gRNA para utilizar o sistema CRISPRa, como o CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>), não tem a espécie, então é importante que sites como esse sejam atualizados. O CRISPOR foi uma boa alternativa, mas foi necessário coletar manualmente uma sequência de nucleotídeos do site Ensembl Plants para desenhar o gRNA para a região promotora do gene.

É importante que tenhamos mais pesquisas nesse campo, devido ao processo longo e trabalhoso para liberação de cultivares superiores e pelas problemáticas ambientais cada vez mais urgentes.

7 CONCLUSÃO

A ferramenta de engenharia genética CRISPR/Cas9 tornou possível alterar a informação genética de forma precisa e com maior rapidez, reduzindo o tempo de trabalho em poucas semanas. Com ela, são promovidos o reparo, o silenciamento e a repressão de genes. Agora com os sistemas CRISPRa e CRISPRi é possível acessar regiões não-codificantes e modular a expressão de um gene inteiro. Essas ferramentas são bastante acessíveis e tem um enorme potencial de reverter problemas, principalmente doenças e, além do organismo humano, pode acelerar o melhoramento genético de plantas e de animais.

Não há certeza de que o melhoramento da *T. cacao* com o aumento da expressão do gene AOS funcionaria, pois não tive a oportunidade de executar os experimentos, o que apresentei neste trabalho foi uma hipótese e que pode ser respondida futuramente.

REFERÊNCIAS¹

- ADDGENE. **CRISPR History and Development for Genome Engineering**. c2023. Disponível em: <<https://www.addgene.org/crispr/history/#>>.
- ALMEIDA, D. S. M. ESTUDOS FUNCIONAIS DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO *Theobroma cacao* - *Moniliophthora perniciosa*. **Universidade Estadual de Santa Cruz**, Ilhéus – BA, Jul, 2016. Disponível em: <http://nbcgib.uesc.br/genetica/admin/images/files/dayanne_monteiro_.pdf>.
- BITESIZEBIO. **Why You Should Consider Adding CRISPRa and CRISPRi to Your Toolbox**. 27 mai. 2020. Disponível em: <<https://bitesizebio.com/47575/cispra-and-crispri/#:~:text=CRISPRi%20and%20CRISPRa%20can%20be,regulatory%20networks%20underlying%20discrete%20phenotypes.>>>.
- CARVALHAIS, L. C. *et al.* Activation of the Jasmonic Acid Plant Defence Pathway Alters the Composition of Rhizosphere Bacterial Communities. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56457, 12 fev. 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0056457>>.
- CHANDRASEGARAN, S.; CARROLL, D. Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 5, p. 963–989, 27 fev. 2016.
- CHIAL, H. Restriction Enzymes. **Scitable by Nature Education**, 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/spotlight/restriction-enzymes-18458113/>>.
- CLOUSE, G. CRISPR Activators: A Comparison Between dCas9-VP64, SAM, SunTag, VPR, and More. **Addgene Blog**, 6 out. 2020. Disponível em: <<https://blog.addgene.org/crispr-activators-dcas9-vp64-sam-suntag-vpr>>.
- CROPLIFE. Cacau é melhorado geneticamente pela biotecnologia. **CropLife Brasil**. 11 mai. 2020. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/noticias/cacau-biotecnologia/>>.
- DI FELICE, F.; MICHELI, G.; CAMILLONI, G. Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview. **Journal of Biosciences**, v. 44, n. 2, 8 abr. 2019.
- DÍAZ-VALDERRAMA, J. R.; LEIVA-ESPINOZA, S. T.; AIME, M. C. The History of Cacao and Its Diseases in the Americas. **Phytopathology**®, v. 110, n. 10, p. 1604–1619, out. 2020. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW>>.
- DING, X. *et al.* Recent Progress and Future Prospect of CRISPR/Cas-Derived Transcription Activation (CRISPRa) System in Plants. **Cells**, v. 11, n. 19, p. 3045, 28 set. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/11/19/3045>>.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

ENSEMBLPLANTS. *Theobroma cacao* Matina 1-6 Assembly and Gene Annotation. Disponível em: <https://plants.ensembl.org/Theobroma_cacao/Info/Annotation/>.

ETAWARE, P. M. The effects of the phytochemistry of cocoa on the food chemistry of chocolate(s) and how disease resistance in cocoa can be improved using CRISPR/Cas9 technology. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 3, p. 100043, dez. 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8991945/>>.

FISTER, A. S. *et al.* Protocol: transient expression system for functional genomics in the tropical tree *Theobroma cacao* L. **Plant Methods**, v. 12, n. 1, 11 mar. 2016. Disponível em: <<https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13007-016-0119-5>>.

FURTADO, L. L.; REGO-MACHADO, C. M.; MARIN-RAMIREZ, G.; FREITAS, N. C.; MOLINARI, H. B. C., SANTIAGO, T. R. CRISPR/Cas: do sistema imune de procariotos ao controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas – RAPP**. Vol. 27, 2021. Disponível em: <https://sbf.itopatologia.org.br/admin/files/papers/file_DqFqOhSgDKv9.pdf>.

GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 397–405, jul. 2013.

GAKPO, J. O. Gene editing could save Ghana's cocoa from extinction, scientists say. **Alliance for science**. Ithaca - NY, 13 jun. 2019. Disponível em: <<https://allianceforscience.cornell.edu/blog/2019/06/gene-editing-save-ghanas-cocoa-extinction-scientists-say/>>.

GENOME. **Genetic Timeline**. 3 mar. 2015. Disponível em: <<https://www.genome.gov/Pages/Education/GeneticTimeline.pdf>>.

GUPTA, R. M.; MUSUNURU, K. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 10, p. 4154–4161, 1 out. 2014.

JINEK, M. *et al.* A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816-821, 28 jun. 2012. Disponível: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1225829>>.

KARLSON, C. K. S. *et al.* CRISPR/dCas9-Based Systems: Mechanisms and Applications in Plant Sciences. **Plants**, v. 10, n. 10, p. 2055, 29 set. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2223-7747/10/10/2055>>.

KHAN, S. H. Genome editing technologies: Concept, pros and cons of various genome editing techniques and bioethical concerns for clinical application. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 16, 3 abr. 2019.

LEDFOORD, H.; CALLAWAY, E. Pioneers of revolutionary CRISPR gene editing win chemistry Nobel. **Nature**, v. 586, 7 out. 2020.

LYONS, R.; MANNERS, J. M.; KAZAN, K. Jasmonate biosynthesis and signaling in monocots: a comparative overview. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 6, p. 815–827, 2 mar. 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00299-013-1400-y>>.

MAH, A. Genome Editing Techniques: The Tools That Enable Scientists to Alter the Genetic Code. **Synthego**, 2019. Disponível em: <<https://www.synthego.com/blog/genome-editing-techniques>>.

MEINHARDT, L. W. *et al.* Moniliophthora perniciosa, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 5, p. 577–588, set. 2008. Disponível em: <<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1364-3703.2008.00496.x>>.

MOTA, D. S. *et al.* CRISPR/Cas Class 2 systems and their applications in biotechnological processes. **Genetics and Molecular Research – GMR**, 19 (1): gmr18478, 31 mar. 2020. Disponível em: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/articles/year2020/vol19-1/pdf/gmr18478_-_crisprcas-class-2-systems-and-their-applications-biotechnological-processes.pdf>.

MOLINARI, H. B. C., *et al.* Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura. Brasília – DF: Embrapa, 2020.

MORGANTE, C. V. *et al.* Modulação da expressão gênica em plantas via tecnologia CRISPR/dCas9. **Embrapa**, 2020. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1126520/modulacao-da-expressao-genica-em-plantas-via-tecnologia-crisprdcas9>>.

NOBELPRIZE. **Press release: The Nobel Prize in Chemistry 2020**, 2020. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>>.

NOBELPRIZE. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978**, 2018. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1978/press-release/>>.

OXFAM. **Desperdício de alimentos: entenda suas consequências**. OXFAM Brasil. São Paulo - SP, 11 mai. 2021. Disponível em: <<https://www.oxfam.org.br/blog/desperdicio-de-alimentos-entenda-suas-consequencias/>>.

PEREIRA, T. C. Introdução à técnica de CRISPR. Ribeirão Preto - SP: Editora Cubo, 2016.

PREWITT, S. F. *et al.* Inter-species functional compatibility of the Theobroma cacao and Arabidopsis FT orthologs: 90 million years of functional conservation of meristem identity genes. **BMC Plant Biology**, v. 21, p. 218, 14 maio 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666566221000344?via%3Dihub>>

RAN, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281–2308, 24 out. 2013.

REDMAN, M. *et al.* What is CRISPR/Cas9? **Archives of disease in childhood - Education & practice edition**, v. 101, n. 4, p. 213–215, 8 abr. 2016.

SCHNEIDER, T. *et al.* Biologia molecular aplicada à ciência das plantas daninhas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n. 1, p. 12–24, 10 mar. 2018.

SHI, Z. *et al.* TcNPR3 from *Theobroma cacao* functions as a repressor of the pathogen defense response. **BMC Plant Biology**, v. 13, p. 204, 6 dez. 2013. Disponível em: <<https://bmcpplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-13-204>>.

SYNTHEGO. **Classy CRISPR: Differences between Class 1 and Class 2 Systems**, 21 ago. 2019. Disponível em: <<https://www.synthego.com/blog/crispr-systems>>.

SYNTHEGO. **CRISPRa and CRISPRi**. c2023. Disponível em: <<https://www.synthego.com/guide/crispr-methods/crispri-cispra>>.

TENG, M. *et al.* Latest Advances of Virology Research Using CRISPR/Cas9-Based Gene-Editing Technology and Its Application to Vaccine Development. **Viruses**, v. 13, n. 5, p. 779, 28 abr. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/13/5/779/htm>>.

UNITED NATIONS. **Food Loss and Waste Reduction**, 29 set. 2021. Disponível em: <<https://www.un.org/en/observances/end-food-waste-day>>.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Science and History of GMOs and Other Food Modification Processes**, 22 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/agricultural-biotechnology/science-and-history-gmos-and-other-food-modification-processes>>.

VEDOVELI, N. C. P. S.; CASTRO, V. P. Manual de construção de vetores de expressão. Ribeirão Preto - SP: FUNDHERP, 2016.

WICKRAMASURIYA, A. M.; DUNWELL, J. M. Cacao biotechnology: current status and future prospects. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 1, p. 4–17, 19 nov. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pbi.12848>>.

XIONG, J-S.; DING, J.; LI, Y. **Genome-editing Technologies and their potential application in horticultural crop breeding**. Horticulture Research, Volume 2, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/hr/article/doi/10.1038/hortres.2015.19/6453524?login=true>>.

YEADON, J. **Pros and cons of ZNFs, TALENs, and CRISPR/Cas**. Disponível em: <<https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2014/march/pros-and-cons-of-znfs-talens-and-crispr-cas>>.

ZENG, J. *et al.* Both Allene Oxide Synthases Genes Are Involved in the Biosynthesis of Herbivore-Induced Jasmonic Acid and Herbivore Resistance in Rice. **Plants**, v. 10, n. 3, p. 442, 26 fev. 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7996763/>>.