

**Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan**  
**Programa de Pós-graduação *Lato Sensu***  
**Especialização em Saúde – Vacinas e Biofármacos**

**Ana Júlia Noronha Rebouças**

**Edição do gene TACR1 em células HEK293T utilizando a técnica  
CRISPR/Cas9**

**São Paulo**  
**2024**

**Ana Júlia Noronha Rebouças**

**Edição do gene TACR1 em células HEK293T utilizando a técnica CRISPR/Cas9**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Saúde 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**

**2024**

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

Rebouças, Ana Júlia Noronha

Edição do gene TACR1 em células HEK293T utilizando a técnica CRISPR/Cas9 /  
Ana Júlia Noronha Rebouças ; orientador(a) Andrea Borrego - São Paulo, 2024.  
51 p. : il.

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

Versão corrigida final

1. Edição gênica 2. CRISPR. 3. TACR1. 4. Osteoartrite I. Borrego, Andrea. II.  
Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde -  
Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

Geração por Sistema Automatizado.  
Bibliotecária Bruna Marques CRB8-9303 - Responsável Técnica

## AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Ana Júlia Noronha Rebouças, 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, 24 de janeiro de 2024

Ana Rebouças

.....  
aluna: Ana Júlia Noronha Rebouças

Andrea Borrego

De acordo:.....  
Orientadora: Dra Andrea Borrego

Comissão Interna de Biossegurança do Instituto Butantan

Carta CIBio/DI 01/2024.

São Paulo, 03 de janeiro de 2024.

Ilma. Dra.  
Ana Marisa Chudzinski-Tavassi  
Laboratório de Desenvolvimento e Inovação

Prezada Dra. Ana Marisa,

Esclarecemos, para os devidos fins, que a Comissão Interna de Biossegurança do Instituto Butantan- CIBio/DI-IB, dentro do Certificado de Qualidade em Biossegurança CQB nº: 516/2020 autorizou previamente, documentado em Ata (CIBio-DI/IB: 05/12/2022), a transferência do desenvolvimento do projeto: "Mecanismos moleculares da dor na osteoartrite: Identificação de novos alvos moleculares para o desenvolvimento de novas drogas", classificado como sendo de Nível de Biossegurança 1 (NB1) (Inicialmente aprovado através da Carta CIBio 30/2020, Parecer CIBio/IB 06/2020), para ser realizado na área NB-2 do Laboratório de Biotecnologia Viral, Extrato de Parecer Técnico 5132/2016 de 12/12/2011 e na área do Laboratório de Desenvolvimento e Inovação, Extrato de Parecer Técnico 7.051/2020 – DOU 166 de 28/08/2020, conforme vossa solicitação.

Estamos à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente,



Dra. Fernanda Faria  
Membro da Comissão Interna de Biossegurança- CIBio-DI/IB  
Instituto Butantan

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todas as bênçãos e oportunidades.

Aos meus pais e família por todo o apoio, amor e formação.

À minha orientadora Dra. Andrea Borrego, pela orientação, incentivo, cordialidade e extremo cuidado e dedicação em ensinar, e ao Dr. José Ricardo Jensen, por todos os ensinamentos e auxílio. Agradeço também ao Dr. Ricardo Cesar Cintra pelo auxílio com experimentos e por toda a gentileza no processo.

Aos meus colegas de laboratório, Beatriz Silveira, Bruna Minomizaki e Nicholas Schorles, por todo durante a companhia diária realizando nossas atividades.

A todos os meus amigos, do curso e fora dele, em Brasília, em São Paulo e em todos os outros lugares, por todo o suporte e companhia ao longo da realização deste trabalho.

Este trabalho teve apoio financeiro da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo pelo Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP.

“Sonhe, que suas provações terminem em plena floração  
Sonhe, o começo parecerá humilde, então o futuro será próspero”.

Agust D



## RESUMO

REBOUÇAS, Ana Júlia Noronha. **Edição do gene TACR1 em células HEK293T utilizando a técnica CRISPR/Cas9**. 2024. 51 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a Saúde - Vacinas e Biofármacos) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

O gene TACR1 codifica o receptor da substância P, que tem papel neuromodulador e está associado com processos inflamatórios. Dentro do contexto de doenças degenerativas como a osteoartrite, o estudo do papel desse gene na fisiopatologia e nocicepção nesta doença pode ser importante para validá-lo como alvo molecular a ser utilizado em novas propostas de alternativas terapêuticas. A técnica de CRISPR/Cas9 tem sido amplamente utilizada para transformar tipos celulares, diminuindo, aumentando ou bloqueando a atividade de algum gene, ou integrando sequências exógenas ao DNA da célula, e pode ser usada para elucidar o papel do gene TACR1 na osteoartrite por meio da sua inativação. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a edição do gene TACR1 em células HEK293T por meio da técnica de edição gênica CRISPR/Cas9. A clonagem dos sgRNAs em bactérias *E.coli* (linhagem Stbl3) teve sucesso bem como a transfecção da linhagem celular com os plasmídeos transformados.

**Palavras-chave:** TACR1. CRISPR. Osteoartrite. Edição gênica. Validação de alvo molecular.

## ABSTRACT

REBOUÇAS, Ana Júlia Noronha. **Editing the TACR1 gene in HEK293T cells using the CRISPR/Cas9 technique**. 2024. 51p. Monograph (Specialist in Biotechnology for Health – Vaccines and Biopharmaceuticals) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

*TACR1* encodes the receptor of substance P, which has a neuromodulator role and is associated with inflammatory processes. In the context of neurodegenerative diseases such as osteoarthritis, studying the role of this gene in pathophysiology and nociception may be important to validate it as a molecular target for new therapeutic alternatives. The CRISPR/Cas9 technique has been widely used to edit diverse cell types, resulting in decreased, increased or blocked gene activity, or by integration of exogenous sequences into the cell DNA, and can be used to elucidate the role of *TACR1* gene in osteoarthritis by its inactivation. That way, the objective of this work was to perform *TACR1* gene edition in HEK293t cells by CRISPR/Cas9 technique. The cloning of sgRNAs in *E.coli* bacteria (Stbl3 lineage) was successful and also the transfection of the cell line with the transformed plasmids.

**Keywords:** TACR1. CRISPR. Osteoarthritis. Gene edition. Validation of molecular targets.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo adaptado da técnica CRISPR .....	18
Figura 2 - Representação da estrutura dos plasmídeos PX458 e PX459 .....	26
Figura 3 – Éxons do gene TACR1 obtidos no site Ensembl.....	35
Figura 4 - Interface do site CRISPOR para geração de sgRNAs .....	36
Figura 5 - Interface do site CRISPOR com as sequências de sgRNAs geradas.....	36
Figura 6 - Interface do site CRISPOR com as sequências geradas dos sgRNAs e também para confirmação da edição por PCR.....	37
Figura 7 - Colônias formadas após plaqueamento.....	39
Figura 8 - Eletroforese em gel.....	41
Figura 9 - Sequenciamento do DNA das bactérias Stbl3 clonadas .....	41
Figura 10 - Expressão de fluorescência em células HEK-293T após transfecção ....	43
Figura 11 - Resultados de citometria das células HEK-293T após transfecção .....	43
Figura 12 - Expressão de fluorescência em células HEK-293T transfectadas com plasmídeo vazio .....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Mix para reação de fosforilação .....	27
<b>Tabela 2</b> - Mix para reação de ligação dos sgRNAs nos plasmídeos .....	27
<b>Tabela 3</b> - Mix para PCR de colônia .....	30

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 O sistema CRISPR/Cas9 .....	15
1.2 Osteoartrite .....	19
1.3 Mecanismos nociceptivos e inflamatórios relacionados à osteoartrite .....	20
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>25</b>
1.2 Desenho de sgRNAs e <i>primers</i> .....	25
1.3 Plasmídeos .....	25
1.4 Fosforilação dos sgRNAs e ligação no plasmídeo .....	26
1.5 Produção de bactérias eletrocompetentes .....	27
1.6 Clonagem de bactérias Stbl3 .....	28
1.7 Isolamento das bactérias.....	29
1.8 Confirmação da clonagem por PCR de colônia.....	29
1.9 Gel de agarose.....	30
1.10 Extração do DNA plasmidial (Miniprep) .....	30
1.11 Sequenciamento.....	31
1.12 Cultivo celular de HEK-293T.....	31
1.13 Teste de resistência à puromicina .....	31
1.14 Transfecção .....	32
1.15 Isolamento de clones .....	32
1.16 Controle da fluorescência .....	33
1.17 Extração e quantificação de DNA dos clones.....	33
1.18 Reação de PCR para o sequenciamento .....	33
1.19 Sequenciamento do DNA dos clones .....	34

<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>1.20 Desenho do sgRNA tendo como alvo a sequência inicial do gene TACR134</b>	
<b>1.21 Fosforilação e clonagem do sgRNA .....</b>	<b>37</b>
<b>1.22 Confirmação da clonagem.....</b>	<b>40</b>
<b>1.23 Transfecção das células HEK293T .....</b>	<b>41</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>47</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O sistema CRISPR/Cas9

A capacidade de modificar sistemas biológicos a partir de seus genomas oferece um enorme potencial para diversas áreas, como medicina, agricultura, indústria alimentícia, e cada vez mais técnicas vem sendo desenvolvidas. Desde a década passada, algumas tecnologias de edição gênica já emergiam, como nucleases *zinc-finger* (ZFNs), nucleases com efetores do tipo ativador transcricional (TALENs, do inglês *transcription activator-like effector nucleases*) e o sistema de nucleases CRISPR-Cas guiadas por RNA (RAN *et al.*, 2013). Os dois primeiros se baseiam na fusão dos domínios catalíticos de uma endonuclease modificada (com sítios de ligação sequência-específicos) a domínios modulares de uma proteína de ligação ao DNA não específica, (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013) enquanto a tecnologia de CRISPR utiliza uma nuclease guiada por RNA como estratégia para a edição gênica, sendo um sistema considerado mais fácil de montar, além de altamente específico e abrangente. (RAN *et al.*, 2013)

CRISPR, acrônimo de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas), representa um conjunto de sequências originalmente encontradas em bactérias, e que atua de maneira semelhante a um sistema de defesa adaptativo contra ácidos nucleicos exógenos. Esse sistema foi descrito pela primeira vez em 1987 por Ishino e colaboradores, estudando o gene *iap* em *E.coli*, mas não se descobriu sua função biológica à época (ISHINO *et al.*, 1987). Em 1993, o locus foi identificado em Archaea e em mais bactérias, indicando a sua importância pelo nível de conservação ((MOJICA; JUEZ; RODRIGUEZ-VALERA, 1993)). Em 2005, se descobriu que as sequências presentes nos espaçadores eram homólogas a sequências de bacteriófagos, pró-fagos e plasmídeos, indicando uma relação do locus com imunidade bacteriana, porque em experimentos realizados, organismos com essas sequências não eram infectados por outros organismos (MOJICA *et al.*, 2005) (POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005). Mais tarde se descreveu a existência de sequências adjacentes ao locus CRISPR, *CRISPR-associated genes* - Cas, pois

as regiões transcritas a partir do locus CRISPR funcionavam em associação com nucleases do tipo Cas. (ALMEIDA *et al.*, 2022)

Sequencialmente, foi descoberto que o sistema CRISPR funciona basicamente com 3 etapas, de aquisição, expressão e interferência. O processo se inicia quando a bactéria é infectada e cliva fragmentos de material genético dos organismos invasores utilizando nucleases do tipo Cas, e em seguida integra ao locus CRISPR, como novos espaçadores, fragmentos homólogos às sequências de vírus ou bactérias invasoras. Em seguida, o locus CRISPR é transcrito, e gera um precursor de RNA de CRISPR (pré-crRNA), composto de várias sequências e espaçadores em um único RNA longo, que é então processado em crRNA. Na etapa de interferência, caso haja um novo contato, os crRNAs maduros juntamente com a enzima Cas e outro tipo de estrutura, os *transactivating CRISPR RNAs* (tracrRNAs), reconhecem as sequências invasoras através de uma sequência PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) e homologia com os fragmentos inseridos no locus CRISPR, e então clivam o DNA exógeno. (DELTCHEVA *et al.*, 2011)

Há 3 tipos de sistemas CRISPR encontrados em bactérias, agrupados com base em filogenia, conservação dos genes e organização do operon. O tipo I tem a proteína Cas 3 como assinatura, degradando moléculas de DNA exógenas com o auxílio do complexo Cascade, através do reconhecimento por PAM. O sistema tipo II se utiliza da enzima Cas9 como única proteína multifuncional, guiada pelo RNA guia (sgRNA), heteroduplex formado pelo crRNA e tracrRNA, sendo este responsável por direcionar a Cas9 para clivar sequências de DNA correspondentes à sequência guia do RNA, também por meio de reconhecimento por PAM. O sistema tipo III tem como assinatura a Cas10 e não usa PAM, mas complexos auxiliares ao Cascade no seu lugar. (JORE *et al.*, 2011; MAKAROVA; KOONIN, 2015)

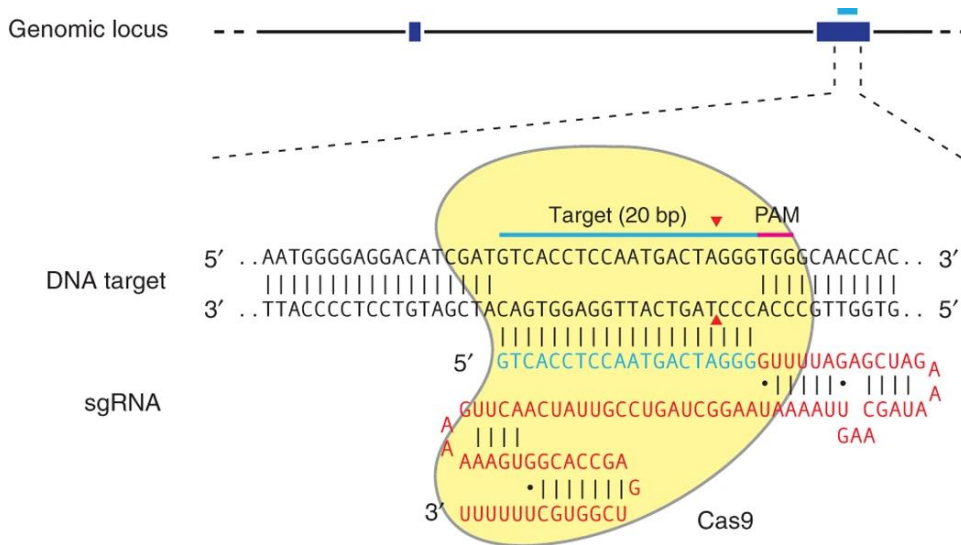
O sistema tipo II é o mais simples, e por esse motivo foi adaptado como ferramenta para edição de genomas complexos. No sistema natural, fragmentos do DNA invasor são integrados ao DNA genômico da bactéria como regiões protoespaçadoras, entre as regiões repetidas da região CRISPR. Esses protoespaçadores são transcritos em um único pré-crRNA e processados em CRISPR RNAs (crRNAs), e depois se associam a *transactivating CRISPR RNAs* (tracrRNAs) e à enzima Cas9, formando



um complexo que tem como alvo a sequência de DNA invasor, complementar à sequência de 20 nucleotídeos da extremidade 5' do crRNA e upstream a um motivo catalítico. Dessa forma, a Cas9 induz quebra de fita sítio específica no DNA invasor. (ALMEIDA *et al.*, 2022) (RAN *et al.*, 2013)

No sistema adaptado, uma molécula de RNA guia é sintetizada com auxílio de ferramentas de bioinformática, de maneira a substituir o complexo crRNA:tracrRNA. O sgRNA possui uma sequência de 20 nucleotídeos que guia a Cas9 para a sequência complementar no DNA alvo, contando também com o auxílio da ligação a uma região PAM na fita de DNA alvo não complementar, como exemplificado na Figura 1. Assim como no sistema natural, a Cas 9 interage com o sgRNA, clivando o DNA alvo, o que gera extremidades abruptas que precisam ser reparadas. Pode ocorrer reparo dirigido por homologia (*homology directed repair*, HDR) ou reparo por junção de extremidades não homólogas (*non-homologous end joining*, NHEJ). Nesse último caso, pela falta de homologia, podem ser provocadas mutações do tipo indel, que ocasionam inserção ou deleção de alguns nucleotídeos, o que altera a fase de leitura da sequência, levando a códons de parada prematuros e moléculas não funcionais. De maneira interessante, o reparo do tipo HDR (que costuma estar ativo apenas em células em divisão) pode ser induzido caso haja homologia entre as extremidades ou caso uma sequência de DNA exógeno seja inserida no sistema junto com o sgRNA e a Cas. Dessa maneira, podem ocorrer edições precisas, com substituição alélica ou inserção de sequências curtas (knock-in), possibilitando não só que se bloqueie a função de um gene como viabilizado pelo reparo NHEJ, mas também que se ative ou corrija seu funcionamento. Ambas as vias de reparo podem gerar alterações permanentes no genoma, e por esse motivo, o sistema tem sido amplamente usado como ferramenta de edição gênica. (ALMEIDA *et al.*, 2022)

**Figura 1 - Mecanismo adaptado da técnica CRISPR**



Fonte: adaptado de RAN *et al.*, 2013.

Comparada a outras técnicas de edição gênica, a técnica CRISPR oferece vantagens como maior eficiência, maiores possibilidades de personalizar o sistema, e a capacidade de gerar edição gênica multiplex. Quanto à personalização, os DNA guias podem ser simplesmente construídos a partir de oligonucleotídeos que codifiquem a sequência de 20 nucleotídeos homóloga ao DNA alvo, ao contrário da estratégia por TALENs, por exemplo, que exige o design de dois genes TALEN para um nova sequência de DNA, visto que a nuclease do sistema só funciona em forma de dímero, sendo necessário montar e expressar duas proteínas que se liguem em porções específicas do DNA para então induzir quebra de fita com a atividade da nuclease (HEIGWER *et al.*, 2013). Além disso, a SpCas9, enzima que costuma ser mais utilizada, costuma gerar uma quebra de dupla fita que gera duas extremidades cegas entre a 17<sup>o</sup> e 18<sup>o</sup> base da sequência alvo, mas a enzima pode ser transformada em uma *nickase* (enzima que gera uma quebra de fita simples), o que potencializa a chance de reparo via HDR, e também diminui a chance de correrem mutações *off-target*. Em um sistema como o TALEN, a quebra de dupla fita ocorre de maneira obrigatória e não é específica. (RAN *et al.*, 2013)

Por meio da técnica CRISPR, também é possível regular a capacidade de expressão gênica, aumentando-a ou diminuindo-a, com as tecnologias CRISPRi (*CRISPR interference*) e CRISPRa (*CRISPR activation*), sendo ambas desenvolvidas a partir do

uso de uma *dead-nuclease* (dCas9), enzima Cas9 modificada, que é capaz de se ligar normalmente à fita de DNA, mas não ocasiona quebra de dupla fita. Dessa forma, é possível ligar domínios de repressão ou ativação à dCas9, juntamente com o RNA guia característico do sistema, levando à ativação ou repressão gênica. (YEO *et al.*, 2018)

Dessa forma, a técnica de CRISPR emergiu como uma grande facilitadora da edição gênica por ser um processo relativamente simples. A técnica inclusive foi ganhadora do prêmio Nobel de 2020, por Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier, e tem sido usada para diversos fins, desde o estudo do papel de certos genes, quanto à correção de erros genéticos, e também a validação de genes como alvos moleculares.

## 1.2 Osteoartrite

A osteoartrite (OA) é uma doença crônica multifatorial caracterizada por alterações anatômicas e fisiológicas nas articulações, o que inclui degradação progressiva da cartilagem (constituída majoritariamente de colágeno) e remodelamento ósseo, com manifestações clínicas associadas como dor, inchaço, rigidez, perda de função e limitações nas funções das articulações, o que leva a uma grande diminuição na qualidade de vida. (ALLEN; THOMA; GOLIGHTLY, 2022; HONVO *et al.*, 2020)

Quanto a fatores de risco, é descrito que estes são aumentados com a idade, há prevalência maior em mulheres, além de haver algumas diferenças étnicas documentadas, bem como risco maior observado em indivíduos com status socioeconômico menor e habitantes de zonas rurais. Também há associação entre obesidade, síndrome metabólica e fatores inflamatórios; baixos níveis de vitamina C, D e K, situação de trauma nas articulações e risco ocupacional associado a trabalhos com alta carga física. (ABRAMOFF; CALDERA, 2020; ALLEN; THOMA; GOLIGHTLY, 2022)

Dentre os vários tipos de OA, a doença tem uma prevalência de 300 milhões de casos no mundo e lidera dentre as causas de incapacitação. Juntando-se perdas por invalidez aos custos médicos, a OA gera um custo estimado em 303 bilhões de dólares por ano. Também há uma grande preocupação com o rápido aumento na prevalência

global da osteoartrite devido ao envelhecimento da população e da obesidade. (ABRAMOFF; CALDERA, 2020)

Quanto à fisiopatologia da doença, fatores inflamatórios e metabólicos têm um papel central. A cartilagem sofre os impactos mais notáveis, mas todo o conjunto da articulação é afetado, incluindo o líquido sinovial, os ligamentos e o osso subcondral. A patogênese da OA está relacionada à inflamação sistêmica, com comorbidades como obesidade, síndrome metabólica e aterosclerose levando ao desenvolvimento da OA, por meio de metabólitos como leptina e outras adipocinas e citocinas, bem como com sinovite ativa, na qual a cartilagem degradada induz reação contra as células sinoviais, levando à produção de metaloproteinases, angiogênese sinovial e produção de citocinas inflamatórias, levando por fim à destruição da cartilagem. O sistema imune inato e macrófagos sinoviais ativados também podem estar ligados à progressão da OA. (ABRAMOFF; CALDERA, 2020)

Sendo claro o papel da inflamação no surgimento e progressão da osteoartrite, têm sido feitos esforços para descobrir maneiras de prevenir, tratar e combater a dor associada à OA.

Atualmente não há tratamento farmacológico com drogas que atuem diretamente sobre a OA, com a abordagem terapêutica envolvendo o uso de analgésicos como alternativa farmacológica, e tratamentos não farmacológicos com o intuito de reduzir sintomas e reparar ou diminuir o dano à cartilagem, como sulfato de glucosamina e de condroitina, e também alguns derivados de colágeno administrados na forma hidrolisada. (HONVO *et al.*, 2020)

### **1.3 Mecanismos nociceptivos e inflamatórios relacionados à osteoartrite**

Quanto aos mecanismos nociceptivos relacionados à osteoartrite, os produtos finais de glicação avançada (PFGAs) têm um papel importante na formação de mediadores inflamatórios que por sua vez levam à dor. Esses compostos, formados pela adição de açúcares a proteínas e lipídeos num processo chamado glicação, costumam estar em níveis aumentados em doenças inflamatórias como osteoartrite, doenças neurodegenerativas e obesidade, diabetes e aterosclerose. O núcleo de neurônios

que transmite sinais dos nervos periféricos para o sistema nervoso central está localizado na raiz dos gânglios dorsais (DRGs), e essas células realizam as primeiras respostas a estímulos que geram dor, além de sensações térmicas, mecânicas e de tensão muscular. Além disso, células da DRG fazem contato com a matriz extracelular, sendo essa interação importante para a homeostase, e a modificação desse estado favorece eventos neuroinflamatórios e nociceptivos. (MALFAIT; MILLER, 2016; MILLER; MILLER; MALFAIT, 2014)

DRGs expressam receptores para PFGAs, e por meio da interação DRG-receptor, são ativadas diversas vias de inflamação e oxidativas. De maneira particular na osteoartrite, os PFGAs originados do processo de glicação do colágeno formam ligações cruzadas que aumentam a rigidez da matriz extracelular articular, o que é associado com a dor crônica característica da doença. (OTT *et al.*, 2014; SCHMIDT *et al.*, 2007)

Em modelos *in vitro*, já foi demonstrado que uma matriz extracelular com colágeno tipo I submetido a processo de glicação foi capaz de ativar p38, ERK e MAPK rapidamente, e estimular a secreção de nitrito e TNF- $\alpha$  por DRGs. Dessa forma, a glicação do colágeno tem um papel importante na formação de mediadores inflamatórios, e de maneira característica quanto ao TNF- $\alpha$ , seja ele produzido por DRGs ou por células satélites de Schwann e glias que estimulam DRGs, o receptor de TNF- $\alpha$  é co-expresso com calcitoninas, substância P e receptor vaniloide, o que sugere uma grande participação do TNF- $\alpha$  nas vias de dor associadas à osteoartrite (BUFALO *et al.*, 2019). Mais estudos também indicam que uma matriz extracelular com colágeno glicado aumenta a expressão do gene SCN9A (que codifica canal de sódio envolvido na transdução do processo nociceptivo) e do gene TACR1, que codifica o receptor da substância P, importante neuromodulador associado a processos inflamatórios e nociceptivos. (BUFALO *et al.*, 2019, 2022)

A substância P faz parte da família das taquicininas, uma das maiores famílias de peptídeos no reino animal, tendo alto nível de conservação, sendo sintetizada em gânglios da raiz dorsal e liberada através de terminais centrais e periféricos por meio de estímulos nocivos. (ZIEGLGÄNSBERGER, 2019)

Em humanos, o gene TAC1 produz a neurocinina A e a substância P, e o gene TAC3 produz a neurocinina B. Como receptores, há o TACR1 (ou NK1R), produzido pelo gene TACR1, como receptor de maior afinidade pela substância P, e também NKR2 e NKR3, receptores de maior afinidade para as neurocininas A e B, respectivamente, sendo os 3 tipos acoplados a proteínas G. (ZIEGLGÄNSBERGER, 2019). As neurocininas são consideradas essenciais para gerar estímulos de dor intensa e moderada, e a substância P em especial tem importância pelo seu papel modulador, por ser capaz de alterar a excitabilidade de neurônios responsivos à dor. (CAO *et al.*, 1998)

Por meio da ligação da substância P com seu receptor TACR1, ocorrem fenômenos de sensibilização nociceptiva na medula espinhal, e nos terminais cutâneos periféricos há indução de inflamação, com ativação e recrutamento de células imunes e liberação de mediadores inflamatórios, que por sua vez também pode promover sensibilização nociceptiva, gerando dor. (NAVRATILOVA; PORRECA, 2019). SP também é expressa por vários tipos de células não neuronais, como células imunes, e exerce papel na migração dessas células e na expressão de quimiocinas, moléculas de adesão e fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B, que contribui para a hiperalgesia pela liberação de fatores como prostaglandinas, citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico. (ZIEGLGÄNSBERGER, 2019)

Tratando-se especificamente do gene TACR1, este tem sido associado a dor na osteoartrite (WARNER *et al.*, 2017), e a substância P tem sido implicada na aceleração da degradação da matriz extracelular e impactos na homeostase da cartilagem articular, sendo a atenuação da interação SP-TACR1 possivelmente benéfica para a diminuição da progressão do dano articular na OA. (IM *et al.*, 2008)

Dessa maneira, já é bem estabelecido que a patogênese da osteoartrite envolve a glicação do colágeno na matriz extracelular das articulações, porém, nesse contexto, ainda é importante compreender melhor quais genes podem ter importância na mediação dos processos inflamatórios e nociceptivos citados. A partir dessa investigação, que tem como candidatos certos mediadores e seus receptores, como o TACR1, é possível propor o desenvolvimento de novos compostos analgésicos, que tenham como alvo algum receptor ou molécula envolvida na fisiopatologia da doença.

Assim, a técnica de CRISPR/Cas9 é uma alternativa bastante adequada para validação de alguns desses genes como alvos moleculares, e especificamente nesse projeto, a validação do gene *TACR1*, codificador do receptor da substância P.

Considerando-se a necessidade de desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais eficientes para o tratamento da osteoartrite e a alta prevalência da doença na população mundial, bem como os diversos custos que essa condição gera, é mais do que necessário que sejam desenvolvidos fármacos contra a doença, e dessa forma se faz necessária a prospecção de alvos em que esses fármacos possam agir. Assim, considerando as evidências já existentes na importância da substância P como mediador inflamatório associado aos processos de glicação do colágeno, este trabalho se propõe a realizar a edição gênica do gene *TACR1* em células embrionárias de rim humano (HEK293T), para embasar futuros experimentos envolvendo a resposta inflamatória associada a esse receptor em células neuronais, dentro do contexto de glicação do colágeno da matriz extracelular associada, objetivando de maneira final o desenvolvimento de fármacos que possam agir sobre mecanismos celulares relacionados à substância P.

Quanto às células HEK293T, esta é uma linhagem amplamente usada em sistemas de expressão estáveis, além de ser bastante caracterizada e ter cultivo rápido e de fácil manutenção, alta receptividade e eficiência para transfecção (THOMAS; SMART, 2005), e em especial para a realização da técnica de CRISPR, o protocolo inicialmente aplicado e um dos mais bem estabelecidos foi realizado em células HEK293T (RAN *et al.*, 2013), o que permite que o apliquemos nesse projeto de maneira similar.

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo realizar a edição do gene *TACR1* em células HEK239T, por meio da técnica de CRISPR-Cas9, para posteriormente realizar essa mesma edição em células neuronais, em padrões bem estabelecidos, a fim de poder validar o gene *TACR1* como modulador da dor e processos inflamatórios característicos da osteoartrite, viabilizando o desenvolvimento de componentes de analgesia eficazes e direcionados.



### 3 METODOLOGIA

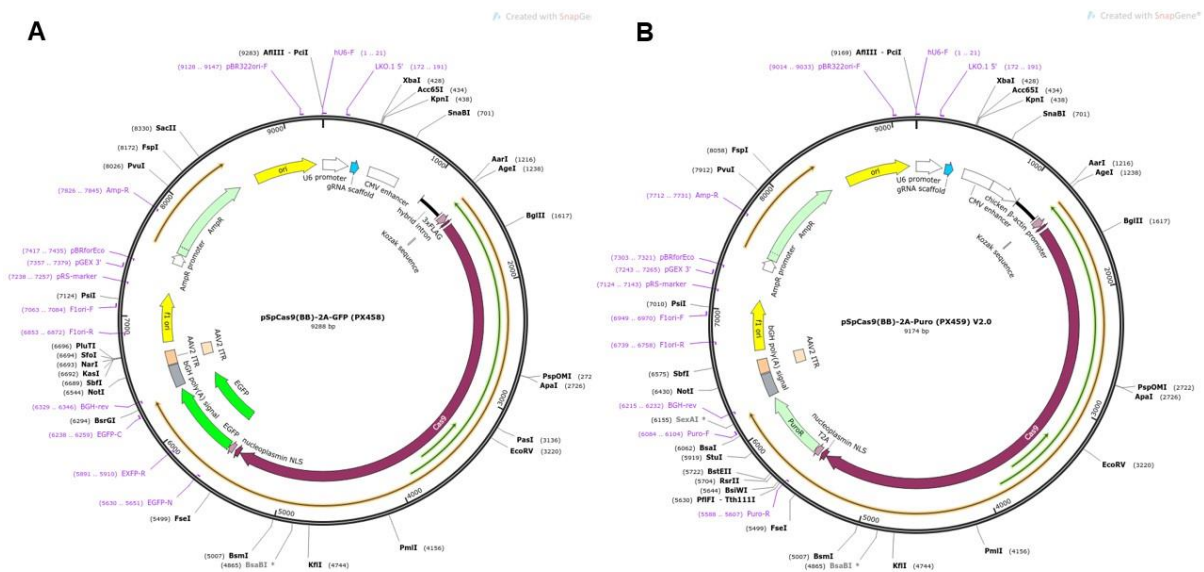
#### 1.2 Desenho de sgRNAs e *primers*

As sequências dos sgRNAs que foram usados para gerar o *knock-out* foram geradas a partir de desenho *in silico* através do site CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), a partir da sequência do éxon inicial do gene a ser editado, TACR1, obtida no site Ensembl. Os sgRNAs foram desenhados para o genoma de referência *Homo sapiens* - Human - UCSC Dec. 2013 (GRCh38/hg38) + SNPs: dbSNP148, Kaviar, e o PAM 20bp-NGG - SpCas9-HF1, eSpCas9 1.1. Da lista de sgRNAs gerados, a escolha foi feita com base em parâmetros fornecidos pelo CRISPOR, como probabilidade de gerar uma deleção, nº de mutações *off-target* e de *mismatches*. Os *primers* utilizados em etapas posteriores como sequenciamento também foram gerados por essa mesma ferramenta.

#### 1.3 Plasmídeos

Foram usados os plasmídeos pSpCas9(BB)-2A-GFP PX458 (Addgene #48138) e pSpCas9(BB)-2A-Puro PX459 (Addgene #62988), cuja estrutura está detalhada na Figura 2. Ambos contêm a sequência da enzima Cas9, a região promotora U6, e diferem quanto à marca de seleção, sendo GFP (*Green Fluorescent Protein*) em PX458, e um gene de resistência à puromicina em PX459.

**Figura 2 - Representação da estrutura dos plasmídeos PX458 e PX459**



Fonte: site da empresa Addgene (<https://www.addgene.org/>)

Figura 2. Representação da estrutura dos plasmídeos PX458 (A) e PX459 (B), detalhando a região promotora U6, a sequência da enzima Cas9, as regiões das marcas de seleção GFP e gene de resistência à puromicina, gene de resistência à ampicilina, dentre outras regiões importantes e locais suscetíveis à ação de diferentes enzimas de restrição.

#### 1.4 Fosforilação dos sgRNAs e ligação no plasmídeo

Os sgRNAs devem ser fosforilados para que os grupos fosfato adicionados possam se ligar aos grupamentos hidroxila livres do vetor (plasmídeo) no qual serão inseridos. Para isso, uma amostra foi preparada de acordo com a Tabela 1, sem agitação mecânica. A amostra foi submetida a uma corrida no termociclador Applied Biosystems™ Veriti™, com programa de 30 minutos a 37°C + 5 minutos a 5°C, com rampdown de 25°C com taxa de 5°C por minuto. Após o ciclo no termociclador, o sgRNA já fosforilado foi diluído 1:200 vezes em água bidestilada.

Para inserção dos sgRNAs em cada um dos plasmídeos descritos, foi preparada uma amostra de acordo com a Tabela 2. A amostra foi submetida novamente a uma corrida no mesmo termociclador, com programa com estágio 1 com 5 minutos a 37°C + 5 minutos à 21°C (24x), estágio 2 com 10 minutos a 37°C (1x), e resfriamento à 4°C por aproximadamente 4h.

**Tabela 1 - Mix para reação de fosforilação**

Reagente	Quantidade ( $\mu$ l)
SgRNA <i>forward</i> [100 $\mu$ M]	1 $\mu$ l
sgRNA <i>reverse</i> [100 $\mu$ M]	1 $\mu$ l
Tampão de ligação T4 com ATP (10X) - NEB B0202S	1 $\mu$ l
Enzima T4 PNK – NEB M0201S	1 $\mu$ l
Água	6 $\mu$ l

Fonte: próprio autor

**Tabela 2 - Mix para reação de ligação dos sgRNAs nos plasmídeos**

Reagente	Quantidade ( $\mu$ l)
Plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-GFP PX458 [50 ng/ $\mu$ l]	2 $\mu$ l
Plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-Puro PX459 [50 ng/ $\mu$ l]	2 $\mu$ l
sgRNA fosforilado e diluído (1:200)	2 $\mu$ l
DTT [10mM] Fermentas/Thermo Scientific R0862	1 $\mu$ l
ATP [10mM] – NEB P0756S	1 $\mu$ l
Enzima BbsI/BpiI-Thermo Scientific ER1012	0,5 $\mu$ l
T7 ligase – NEB M0318S	0,5 $\mu$ l
Água	11 $\mu$ l

Fonte: próprio autor

### 1.5 Produção de bactérias eletrocompetentes

Primeiramente foi feita a semeadura da bactéria Stbl3 em placa de Petri, resultando em duas placas: uma com apenas meio LB ágar e outra com meio LB ágar + ampicilina

0,1% para controle negativo. Ambas as placas foram incubadas overnight a 37°C na estufa.

Mediante ausência de crescimento das placas de controle negativo, conforme esperado, uma colônia da outra placa foi escolhida para o próximo pré-inóculo, sendo retirada com uma ponteira estéril, raspando suavemente a colônia e transferindo-a para um tubo Falcon 50 mL contendo 3mL de meio LB líquido. Foi realizado um controle negativo nas mesmas condições, porém com 3uL de ampicilina [100µg/mL] no meio. Ambos os tubos foram incubados overnight no *shaker* Innova 42 (New Brunswick Scientific, Alemanha) a 37°C e 220 rpm, com a tampa semi-aberta. Em seguida, o pré-inóculo foi inoculado em 500 mL de LB líquido, dividido em dois erlenmeyers de 1 litro estéreis, com 250 mL em cada, com tampa de algodão e gaze. Este inóculo foi incubado novamente no *shaker* a 37°C e 220 rpm até atingir a densidade óptica de 600, medida no aparelho Eppendorf BioPhotometer® D30. Após atingir essa D.O., o conteúdo do erlenmeyer foi separado em duas garrafas de 250 mL e incubado em gelo por meia hora, e depois dentrifugado por 5 minutos, a 4°C (previamente resfriado) e 3500G. Por último foram feitas lavagens, inicialmente descartando o sobrenadante e ressuspendendo o precipitado em 100 mL de glicerol gelado 10%, sem encostar no pellet. Então a amostra foi centrifugada sob as mesmas condições, e na segunda lavagem descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspendido em 50 mL de glicerol 10% gelado. Esse mesmo passo foi repetido, e foi feita uma última centrifugação sob as mesmas condições, com o precipitado sendo ressuspendido em 2-3 mL de glicerol 10% gelado. Por fim, foram feitas alíquotas de 50 µL em tubos Eppendorf de 600 uL, com acondicionamento imediato em gelo seco, e posteriormente em -80°C.

### **1.6 Clonagem de bactérias Stbl3**

Bactérias *E.coli* Stbl3 foram transformadas por meio de eletroporação para inserção dos plasmídeos contendo os sgRNAs para deleção do gene TACR1 nas células alvo. As bactérias Stbl3 são recomendadas para uso com insertos instáveis, como o DNA lentiviral. A eletroporação foi feita adicionando 5µl do plasmídeo fosforilado a 50µl de *E. coli* Stbl3, transferindo esse volume para uma cubeta de eletroporação de 2mm, seca e resfriada, e dando um pulso de 2,5 kV no aparelho Gene Pulser Xcell Electroporation Systems (Bio-Rad). As cubetas utilizadas para esta técnica foram

mantidas no gelo e secas com papel toalha em seus entornos para garantir a sobrevivência celular e evitar também a ativação da bactéria. Em seguida, foi adicionado 1ml de meio SOC para recuperação das bactérias eletroporadas, com incubação em *shaker* Innova 42 (New Brunswick Scientific, Alemanha) a 220 rpm, a 37°C por 1h. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm, 800µl do sobrenadante foram descartados, e os 200µl restantes foram usados para homogeneizar o *pellet* que foi semeado em placas de Petri com meio ágar LB contendo ampicilina e com o auxílio de beads de polipropileno o conteúdo foi espalhado uniformemente sobre as placas. As mesmas foram incubadas em estufa à 37°C *overnight*. Esse procedimento foi feito para cada um dos plasmídeos utilizados. Para controle foi realizado o mesmo processo, porém com plasmídeos vazios (sem o sgRNA), com adição de 2µl de plasmídeo não fosforilado [50 ng/µl] em 50µl de *E.coli* Stbl3.

### 1.7 Isolamento das bactérias

As bactérias foram observadas após a incubação *overnight* em estufa a 37°C quanto ao seu crescimento, e placas com crescimento de colônias bem definidas (excluindo-se placas com formação de tapete ou colônias satélites), tiveram 5 colônias isoladas e semeadas em novas placas de ágar LB com ampicilina [100µg/mL], com incubação *overnight* à 37°C.

### 1.8 Confirmação da clonagem por PCR de colônia

As colônias de bactérias que tiveram crescimento foram submetidas a uma reação de PCR de colônia para confirmação da presença do sgRNA inserido (a partir do rastreamento de banda correspondente ao oligonucleotídeo amplificado a partir do anelamento com a região promotora U6), ou sua ausência, no caso dos grupos controle clonados com plasmídeos vazios. A reação de PCR foi realizada conforme mix da Tabela 3 e com a ciclagem com incubação por 95°C por 10 minutos (para a ruptura da célula bacteriana e desnaturação), seguida de 35 ciclos de 95°C (desnaturação), 49°C (anelamento do primer F), 60°C (anelamento do primer R) e 72°C (alongamento), todos por 30 segundos, finalizando com um ciclo de 72°C (alongamento) por 8 minutos e 4°C para estoque.

Nesta reação utiliza-se o guide reverso de cada óligo (sgRNA) como *primer* reverso. Nesta reação utiliza-se o guide reverso de cada óligo (sgRNA) como *primer* reverso. A sequência do primer *forward* de U6 é GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC, conforme descrito e utilizado em (RAN *et al.*, 2013). O promotor U6 é um promotor de RNA polimerase e tem sido amplamente utilizado para direcionar a expressão do sgRNA em vetores ao se usar a técnica de CRISPR/Cas9, e como sítio de início da transcrição altamente conservado, ajuda a aumentar a homogeneidade do sgRNA gerado e reduz efeitos *off-target*. (LONG *et al.*, 2018)

**Tabela 3 - Mix para PCR de colônia**

Reagente	Quantidade (µl)
Primer <i>forward</i> (oligonucleotídeo para região promotora U6) [20µM]	0,375µl
Primer <i>reverse</i> (sgRNA reverse) [20µM]	0,375µl
Tampão de PCR (10X)	2,5µl
DNTPs [2,0mM]	3,125µl
MgCl <sub>2</sub> [25mM]	2,5µl
Taq polimerase (5U)	0,4µl
Água	13,725µl
DNA	2µl

Fonte: próprio autor

### 1.9 Gel de agarose

O produto de PCR amplificado foi aplicado em gel de agarose para sinalizar a correta inserção dos plasmídeos nas bactérias. O gel de agarose foi preparado a 1,5%, em 120mL de tampão TAE e corado com brometo de etídio. Após preparação do gel, as amostras foram aplicadas e submetidas à corrida por 25 minutos a 120V. O gel foi analisado no transiluminador ChemiDoc XRS+ Gel Imaging System (Biorad).

### 1.10 Extração do DNA plasmidial (Miniprep)

As colônias de bactérias transformadas foram expandidas em 5ml de meio LB líquido com adição de 5µl de ampicilina [100µg/mL]. Em seguida, foi feita a extração do DNA plasmidial para etapas posteriores de transfecção, de acordo com as instruções do Kit ChargeSwitch-Pro Plasmid Miniprep Kit – ThermoFisher, e após todas as etapas o DNA foi quantificado e armazenado a -20°C.

### **1.11 Sequenciamento**

Os produtos do PCR de colônia foram purificados com o sistema ExoProstar (Cytiva, EUA), por meio da adição de 1µL de exonuclease e 1µL de fosfatase alcalina do kit, junto a 5µL de cada amostra. As amostras foram submetidas a dois ciclos de aquecimento, de 37°C e 80°C, por 15 minutos. Após esse período, foram adicionados 15µL de água em cada amostra. A partir da amostra purificada, quantificamos o material e preparamos com um volume de DNA correspondente a 200ng + um volume de água que totalizasse 7µL para cada amostra, e 3µL de primer para a região promotora U6 (5µM), com 10µL finais de amostra, que foram enviadas para sequenciamento (pelo método de Sanger) no Sequenciador Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (Sistema Multiusuário).

### **1.12 Cultivo celular de HEK-293T**

Células HEK-293T foram cultivadas com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de glutamina, sendo mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C, por 24h, até que se atingisse a confluência de 75-80%, quantidade necessária de células para a transfecção.

### **1.13 Teste de resistência à puromicina**

Para determinar a dose citotóxica do antibiótico de seleção puromicina (Puromycin Dihydrochloride Gibco™) sobre células HEK-293T, em caso de seleção por uso de antibiótico, foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células por poço em uma placa de cultura de 24

poços, e tratadas com puromicina em concentrações de 0,5 a 3,5 µg/ml. As células foram observadas durante 2 dias quanto à sua viabilidade (morfologia, adesão, presença ou ausência de vacúolos) e a dose de 2 µg/ml foi determinada como citotóxica, sendo escolhida para selecionar as células não transfectadas.

### 1.14 Transfecção

As células HEK-293T foram plaqueadas em placas de 6 poços ( $2 \times 10^5$  células por poço) e transfectadas com 2µg do DNA do plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-GFP-PX458 (Addgene #48138) clonado com o sgRNA-TACR1, e o mesmo plasmídeo sem o gene (vetor vazio). Foi utilizando o agente de transfecção FuGENE® HD (Promega E2311) em proporção de 1:3 em relação à quantidade de DNA. Esses reagentes foram misturados e deixados em incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, para viabilizar a formação de um complexo FuGENE:DNA. Após esse período, se adicionou à solução pré-incubada 400 µl de meio Opti-MEM™ Reduced Serum Medium (Gibco), e esse conteúdo foi aplicado por gotejamento sobre as células. Inicialmente foi aplicado um conteúdo menor de meio para maximizar o contato dos ácidos nucleicos com a membrana celular, facilitando a transfecção. Após 4h, adicionamos mais 1600 µl de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e com adição da solução Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (100X) (10.000 U/mL penicilina, 10.000 µg/mL streptomina e 25 µg/mL anfotericina B).

### 1.15 Isolamento de clones

Para a geração de clones editados, 72hs após a transfecção utilizamos a técnica de *Single Cell-Sorting* em citômetro de fluxo (FACS) para a separação das células positivas para a fluorescência GFP. Para preparação das amostras as células HEK-293T foram retiradas da placa com tripsina, inativadas com SFB, e centrifugadas à 1500 rpm por 5 minutos e foram ressuspensas em 600µl de uma solução com 20% de PBS 1X, 30% SFB e 50% de penicilina-streptomina (Penicilin-Streptomycin 10.000 U/mL, Gibco™) e filtradas em *cell-strainer* de 0,70 µm. Após, foram acondicionadas em um tubo de 15mL e mantidas no gelo até a aquisição feita no aparelho BD FACSAria III. Fizemos o plaqueamento de 2 placas de 96 poços, com 1 célula por poço. Células GFP-negativas foram usadas como controle. Todos os poços das



placas de 96 poços foram preenchidos com 100µl de meio DMEM com 10% de SFB e solução Antibiótico-Antimicótico 100x (Gibco™) antes do *sorting*, e cerca de 4 horas após o *sorting* foram adicionados mais 100µl do mesmo meio de cultura. As placas foram mantidas em estufa 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### **1.16 Controle da fluorescência**

Para confirmar e avaliar a eficiência da transfecção, observamos a cultura em microscópio invertido de fluorescência 1 semana após a realização da transfecção. Para esta etapa utilizamos as células que foram transfectadas com o vetor vazio, o plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-GFP-PX458.

### **1.17 Extração e quantificação de DNA dos clones**

Cerca de 10 dias após a realização do *Single Cell*, já foi possível observar o crescimento de alguns clones. A partir de 5x10<sup>6</sup> células, foi feita a extração de DNA de acordo com as instruções do E.Z.N.A.® DNA/RNA Isolation Kit, e posterior quantificação (NanoDrop Microvolume Spectrophotometer).

### **1.18 Reação de PCR para o sequenciamento**

A reação de PCR foi realizada com ciclagem de 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C (anelamento dos primers) por 35 segundos, 72°C (alongamento) por 30 segundos, finalizando com um ciclo de 72°C (alongamento) por 5 minutos e 10°C para estoque. Os primers utilizados foram os descritos abaixo, ambos com a temperatura de 59°C para anelamento sugerida pelo fabricante:

Forward: AGAAAGAGCAAGAAGGGGCC

Reverse: TCAACCACAGAGACCATGCC

Após reação de PCR, foi feita a purificação do produto da PCR (conforme já descrito no item 3.10).

### 1.19 Sequenciamento do DNA dos clones

As amostras foram preparadas para sequenciamento a partir do cálculo de um volume de DNA correspondente a 200ng, partindo-se dos valores de concentração de cada amostra, adicionando-se a um eppendorf de 1,5mL o volume de DNA calculado e um volume de água que totalizasse 7 $\mu$ L para cada amostra. Também foi adicionado 3 $\mu$ L de primer *forward* ou *reverse* (amostra de cada clone preparada para os 2 primers separadamente). As amostras foram levadas para análise no sequenciador *Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer* do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (Sistema Multiusuário).

## 4 RESULTADOS

### 1.20 Desenho do sgRNA tendo como alvo a sequência inicial do gene TACR1

A sequência do sgRNA que foi usado para gerar o *knock-out* do gene TACR1 foi gerada a partir de desenho in silico através do site CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), a partir da sequência do éxon inicial do gene a ser editado, TACR1, obtida no site Ensembl (Figura 3)

Figura 3 – Éxons do gene TACR1 obtidos no site Ensembl

The screenshot displays the Ensembl genome browser interface for the TACR1 gene. The main content area shows transcript details for ENST00000305249.10 and ENST00000409848.3. Below this, a table lists the exons of the gene.

Transcript ID	Name	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt Match	RefSeq Match	Flags
ENST00000305249.10	TACR1-201	4779	407aa	Protein coding	CCDS1958	P25103-1	NM_001058.4	MANE Select   Ensembl Canonical   GENCODE basic   APPRIS P1   TSL:1
ENST00000409848.3	TACR1-202	1270	311aa	Protein coding	CCDS46345	P25103-3	-	GENCODE basic   TSL:1
ENST00000497764.1	TACR1-203	327	No protein	Protein coding CDS not defined	-	-	-	TSL:3

No.	Exon / Intron	Start	End	Start Phase	End Phase	Length	Sequence
1	ENSE00001167527	75,199,520	75,199,546	-	2	975	<pre> .....agtgcgtctctgcaggggtataaaaagctcgtgcgcagctaaactcgc gagctgagcaaccogaaacogagaggtgcccggaaactgcagcggcggcagcggcagca aaagagagagaaaaatctccagctgatatcagagctccagaatccctggcattagctcag aacctttacagctgacgtgcaatgggcccactctgccttaagctcctcagcagagc aggcctttccttttccctccgagagagagaaatgagattccagagcagcagagctgc ataaatgggggatctcttgccttagaactgtagccctggaattctttcctctttt tcagtttacggcaagagatgctgtctccagactctgaactcaaacctctctgagac ttgaaatggagaaattcagagcaccgcggcagcggcagcagctgctcagagagcgttt atattcggggccttgcattctgaaagagatggcggcggaaagccttccagccc tccctgctggccttagaagaccctgagcccagcggcagcagcagagactctgcgscag agggggttggtagagatagtagggctttacggccttagcttgaatgataactcct ccggctgactcagactctcccacaactctccactaacactcggaaacccaatcagtt cctcagacagccctgaaatgcttttggcactcctcagcctgattgctgctgctgctg ctctgctggcagcctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg astgagaaactattttctggtaactggccttccggagccctcctatggctgattcga tacagtggtaacttccactatgctgctcagcagaaatgctgctgctgctgctgctgctg craattccagactctttccatggcctctctctccagatgctcctcctcagcagc ttggcctttgatag </pre>

Fonte: próprio autor

Figura 3. Éxons do gene TACR1 no portal Ensembl. A sequência dos dois transcritos codificadores de proteína depositados (TACR1-201 e TACR1-202) foram analisadas e observando-se que são sequências idênticas para o éxon 2, essa região foi escolhida para o desenho do sgRNA.

Após a obtenção da sequência do éxon no Ensembl, a mesma foi depositada no site CRISPOR, sendo selecionado o genoma Homo sapiens - Human - UCSC Dec. 2013 (GRCh38/hg38) + SNPs: dbSNP148, Kaviar, e o PAM 20bp-NGG - SpCas9-HF1, eSpCas9 1.1.



plasmídeo mais à frente e para a inserção do sgRNA., Os primers utilizados em etapas posteriores como para a reação de PCR para confirmação da edição também são gerados nessa mesma etapa.

## Figura 6 - Interface do site CRISPOR com as sequências geradas dos sgRNAs e também para confirmação da edição por PCR

U6 expression from an Addgene plasmid

The guide sequence GAGTCGTGTCATGATCGAA does not contain the motif TTTT, which terminates RNA polymerase, so it can be transcribed in mammalian cells.

Select your Addgene plasmid: [pX330-U6-Chimeric\\_BB-CBh-hSpCas9 \(Zhang lab\) + derivatives](#)

To clone the guide into [pX330-U6-Chimeric\\_BB-CBh-hSpCas9 \(Zhang lab\) + derivatives](#), use these primers:

Name	Primer Sequence
TACR1_guideRNA161fwU6sensepX330	CACCGAGTCGTGTCATGATCGAA
TACR1_guideRNA161fwU6antisensepX330	AAACTTCGATCATGCACACGACTC

The plasmid has to be digested with: *Bbs1*

[Click here](#) to download the cloning protocol for [pX330-U6-Chimeric\\_BB-CBh-hSpCas9 \(Zhang lab\) + derivatives](#)

### PCR to amplify the on-target site

Use these primers to amplify a genomic fragment around the on-target site:

TACR1_OntargetGuideRna161fwLeft	AGAAAGAGCAAGAAGGGGCC	Tm 59.961
TACR1_OntargetGuideRna161fwRight	TCAACCACAGAGACCATGCC	Tm 59.963

Genome fragment with validation primers (underlined) and guide sequence (yellow)

Maximum amplicon length:  Primer Tm:

Your guide sequence is on the reverse strand relative to the genome sequence, so it is reverse complemented in the sequence below.

**Genomic sequence chr2:75120605-75120628 including primers, genomic forward strand:**  
AGAAAGAGCAAGAAGGGGCCAGGAAGGCAGCCTGCACCATCGTTTCTTTGGCATGGGAGTCATCTCTACTCACACTTTC  
 TCATAAATCTTGTTCGGATGCTCTGGCATTTCGATCATGCACACGACTCTGCTGGCATGGTCTCTGTGGTTGA

AGAAAGAGCAAGAAGGGGCCAGGAAGGCAGCCTGCACCATCGTTTCTTTGGCATGGGAGTCATCTCTACTCACACTTTC

Fonte: próprio autor

Figura 6. Interface do site CRISPOR com as sequências de sgRNAs geradas a partir da escolha do plasmídeo px330 e derivados (como o PX458 e PX459) como receptor do sgRNA - por conter região para inserção do sgRNA + Cas9 + marcas de seleção - sugerindo a utilização da enzima BbsI, e também os *primers* para a reação de PCR para a confirmação da edição fornecidos para este sgRNA.

Dessa forma, as sequências obtidas dos sgRNAs e os primers para a reação de PCR para confirmara a edição foram:

sgRNA-TACR1 (fita senso): CACCGAGTCGTGTCATGATCGAA

sgRNA-TACR1 (fita antisenso): AAACCTTCGATCATGCACACGACTC

Primer para sgRNA-TACR1 (forward): AGAAAGAGCAAGAAGGGGCC (Tm 59.961)

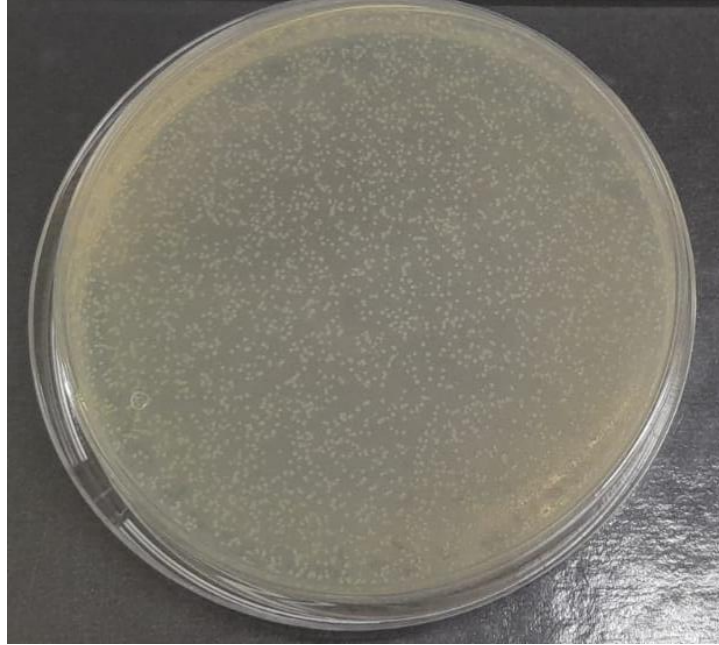
Primer para sgRNA-TACR1 (reverse): TCAACCACAGAGACCATGCC (Tm 59.963)

### 1.21 Fosforilação e clonagem do sgRNA

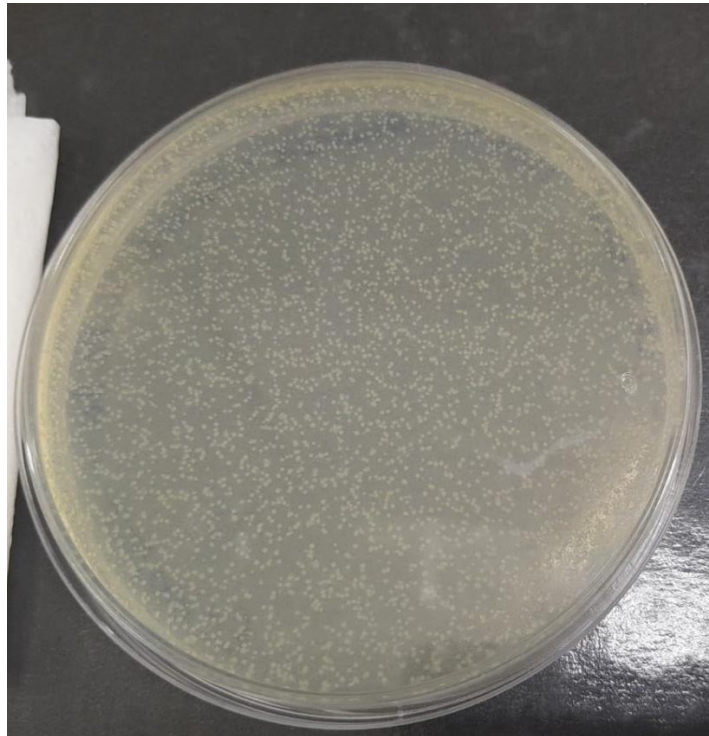
Para inserção do sgRNA tendo como alvo a sequência inicial do gene TACR1, realizamos a fosforilação e anelamento do sgRNA nos plasmídeos e a produção das bactérias eletrocompetentes, conforme descrito na metodologia, e, prosseguimos para a etapa de clonagem. As bactérias submetidas à eletroporação foram semeadas em placas de Petri e deixadas overnight em estufa à 37°C. As Figuras 7A e 7B mostram o crescimento das bactérias clonadas com os plasmídeos pSpCas9(BB)-2A-GFP e pSpCas9(BB)-2A-Puro. Em seguida, isolamos 5 colônias de cada uma das placas e passamos as mesmas para uma nova placa de Petri com LB ágar e ampicilina [100µg/mL], utilizando uma ponteira estéril e raspando delicadamente a colônia escolhida, transferindo esse raspado para uma nova placa com a ponteira, também delicadamente, de maneira a não furar o ágar. Esse processo é importante para selecionar bactérias de uma mesma colônia, garantindo sua homogeneidade quanto ao material genético, pois este será sequenciado para confirmar a inserção dos plasmídeos. A Figura 7C mostra o crescimento das colônias isoladas das placas iniciais.

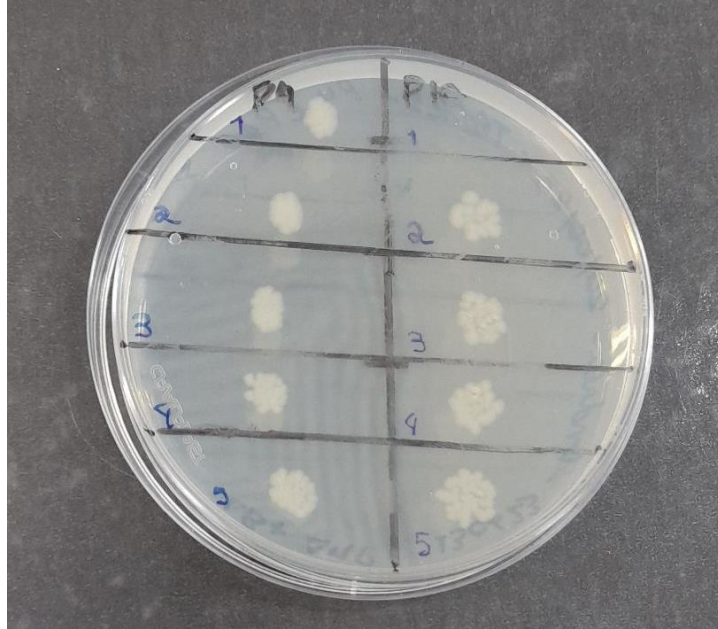
**Figura 7 - Colônias formadas após plaqueamento**

**A**



**B**



**C**

Fonte: próprio autor.

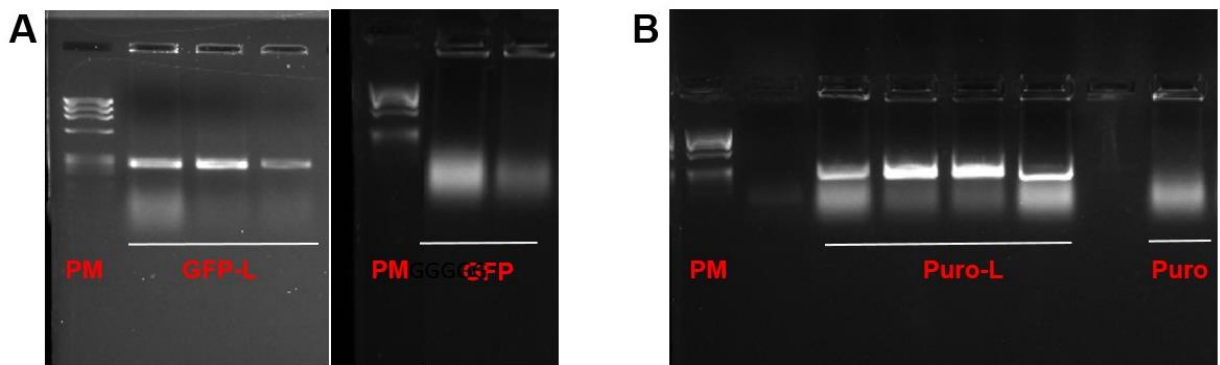
Figura 7. Colônias de *E. coli* Stbl3 formadas após plaqueamento com beads de polipropileno. Plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-GFP (A) e pSpCas9(BB)-2A-Puro (B) e colônias isoladas (C). As colônias foram semeadas em meio LB-ágar com ampicilina [100µg/mL] e mantidas em estufa a 37°C overnight.

### 1.22 Confirmação da clonagem

Para a confirmação da clonagem dos plasmídeos, foi realizado inicialmente o PCR de colônia (conforme descrito em materiais e métodos), no qual cada colônia selecionada do isolamento (Figura 7C) teve o DNA submetido a uma reação de PCR, e este material amplificado foi submetido à eletroforese em gel (Figura 8), que mostrou de forma preliminar a presença de uma banda amplificada de aproximadamente 310bp, o que confirma que o sgRNA está inserido no plasmídeo e a ausência dessa banda nos plasmídeos controle vazios. A análise do sequenciamento confirmou a clonagem do plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-GFP com o sgRNA-TACR1 nas bactérias Stbl3 (Figura 9).



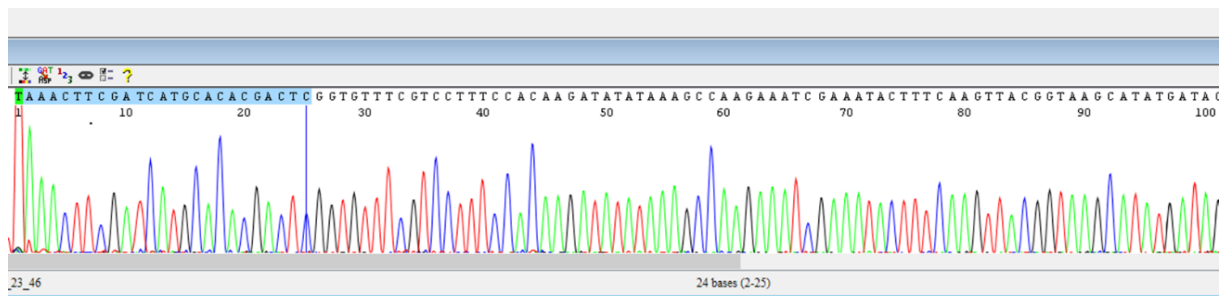
**Figura 8 - Eletroforese em gel**



Fonte: próprio autor.

Figura 8. Produtos da reação do PCR de colônia visualizados após aplicação em gel de agarose. Em A são mostrados os plasmídeos pSpCas9(BB)-2A-GFP, sendo GFP-L os que receberam o sgRNA-TACR1, e GFP o plasmídeo vazio. Em B são mostrados os plasmídeos pSpCas9(BB)-2A-Puro, sendo Puro-L os que receberam o sgRNA-TACR1, e Puro o plasmídeo vazio. Gel de agarose preparado a 1,5% em 120 mL de TAE 0,25x, corado com brometo de etídio, com corrida das amostras por 25 minutos a 120V.

**Figura 9 - Sequenciamento do DNA das bactérias Stb13 clonadas**



Fonte: próprio autor.

Figura 9. Eletroferograma do sequenciamento do DNA de uma colônia isolada de *E. coli*, Stb3 clonada com plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-GFP + sgRNA-TACR1. A sequência de 23 bases marcadas em azul-claro no canto superior esquerdo da imagem confirma a inserção do sgRNA-TACR1 no plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-GFP. Análise realizada no software CodonCode Aligner v.8.0.2 (CodonCode Corporation, EUA).

### 1.23 Transfecção das células HEK293T

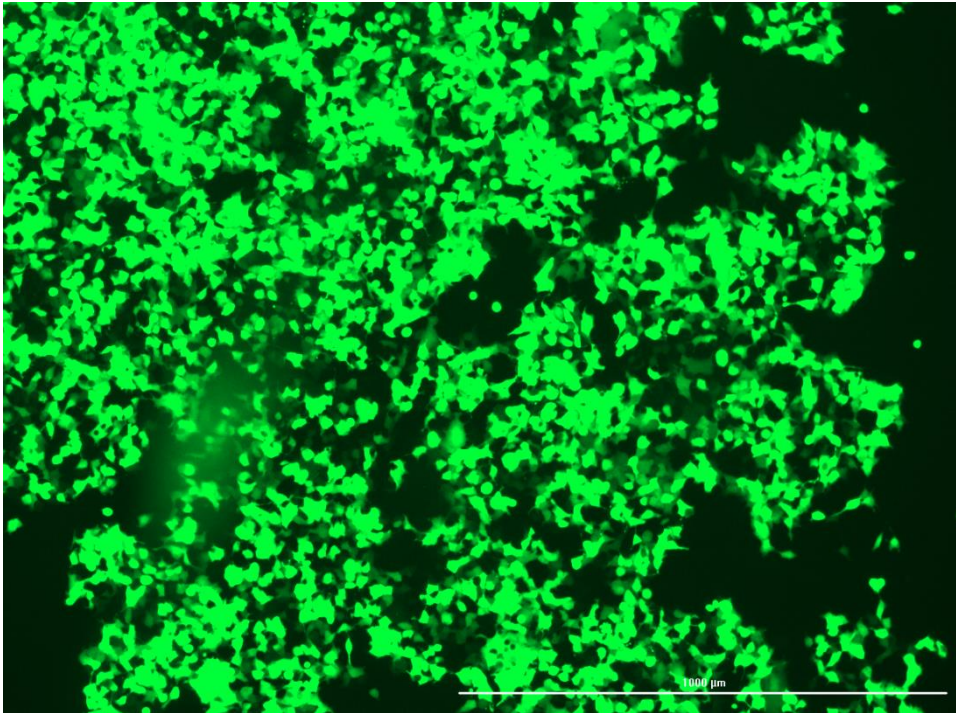
Após a confirmação da inserção do sgRNA-TACR1 no pSpCas9(BB)-2A-GFP por sequenciamento, realizamos o cultivo das células HEK293T e após completa adaptação das células pós descongelamento, realizamos a transfecção do plasmídeo nas células, conforme descrito na metodologia. Nos preparamos para fazer a seleção das células transfectadas tanto por fluorescência, com o plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-GFP, quanto por puomicina, com o plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-Puro, e, chegada a

etapa pós-transfecção, realizamos a seleção via fluorescência, uma vez que o citômetro estava disponível para a utilização. Conforme já descrito utilizamos o aparelho BD FACSAria III do Laboratório de Imunoquímica (Sistema Multiusuário). Observamos as células em microscópio de fluorescência antes da realização da seleção para a confirmação da transfecção, e observamos que praticamente a totalidade das células eram positivas para GFP demonstrando uma alta taxa de eficiência (Figura 10).

Realizamos a seleção das células que receberam o plasmídeo a partir da presença ou não de GFP, por canal FITC, sendo feito o *Single cell-sorting* em placas de 96 poços. Usamos células negativas para GFP como controle e para as devidas estratégias de *gating* e configuração das análises do citômetro, conforme mostrado nas Figuras 11A e 11B. A análise confirmou a eficiência da transfecção, com 35.4% das células analisadas positivas para GFP na população inteira analisada, e 80.4% positivas para GFP dentro da população alvo do *gating* (Figuras 11D e 11E). Das células positivas, escolhemos aquelas com a fluorescência mais intensa (sinalizadas como P2 na Figura 11F) para realização do *sorting* para geração de clones.

Para confirmar e avaliar a eficiência da transfecção, mantivemos em cultura um poço da placa com células HEK293T transfectadas com o plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-GFP-PX458 vazio, e observando a cultura em microscópio invertido de fluorescência 1 semana após a realização da transfecção, pudemos ver que ainda que um pouco menos, as células ainda emitiam fluorescência (Figura 12).

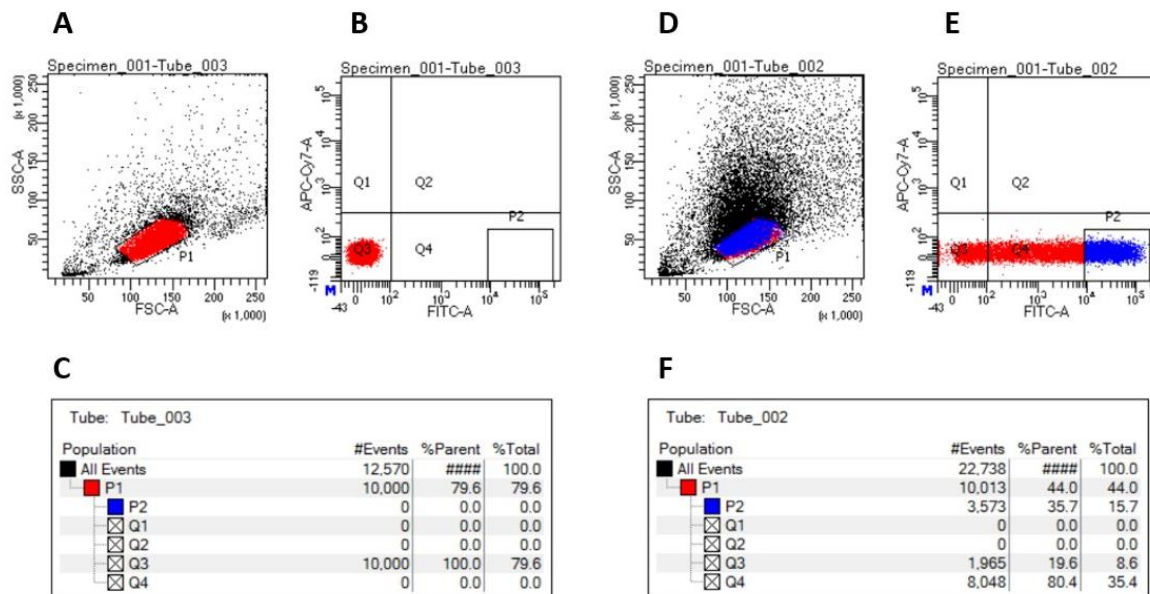
**Figura 10 - Expressão de fluorescência em células HEK-293T após transfecção**



Fonte: próprio autor.

Figura 10. Células GFP-positivas marcadas em verde, analisadas por microscopia de fluorescência. Células analisadas após 48h de transfecção, com foto em escala de 1000 μm em aparelho Cytation 5 no modo de análise de intensidade de fluorescência.

**Figura 11 - Resultados de citometria das células HEK-293T após transfecção**

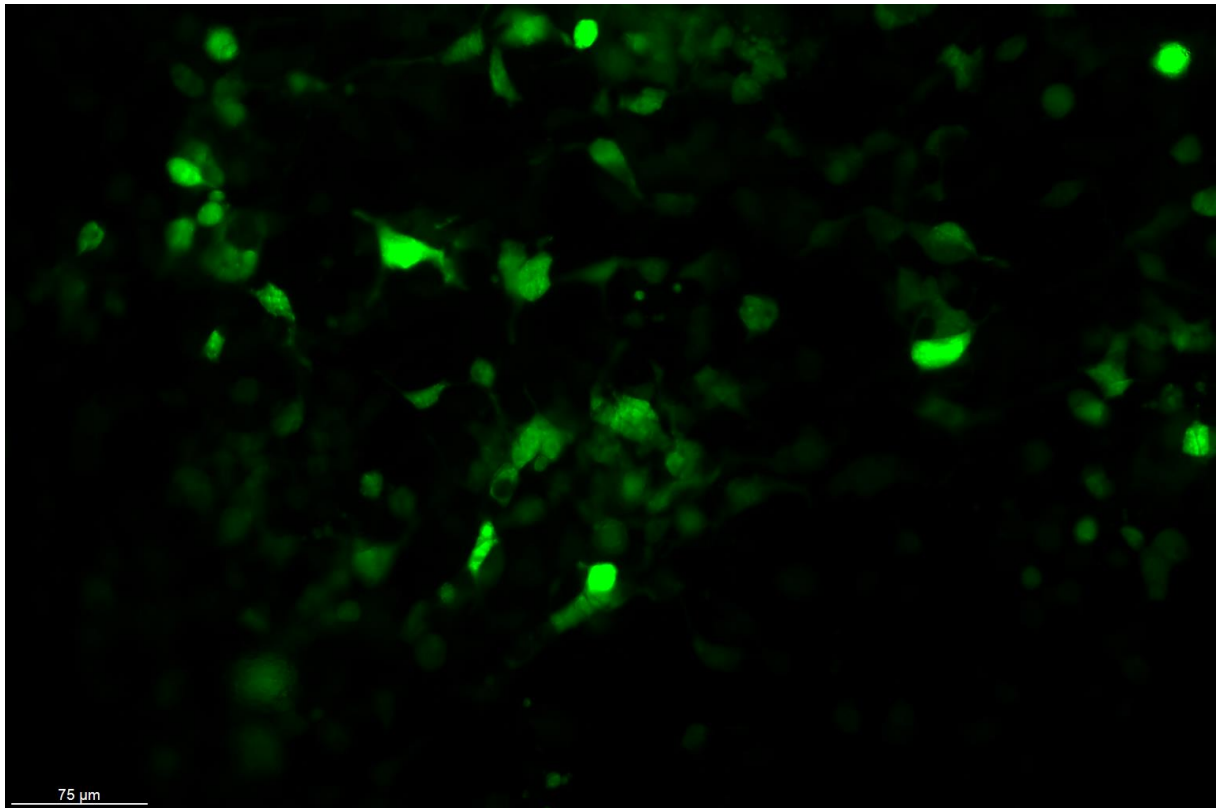


Fonte: próprio autor.

Figura 11. Gráficos de citometria para o Single cell-sorting. A, B e C são referentes à população de células controle, negativa para GFP, e D, E e F referente às células GFP positivas. As figuras A e D mostram a estratégia de gating e em D, E e F podemos ver a separação de uma população com

fluorescência mais intensa (P2) dentro da população GFP positiva (P1), mostrando 80,4% das células de P2 positivas para GFP, tendo essas células uma maior intensidade de fluorescência.

**Figura 12 - Expressão de fluorescência em células HEK-293T transfectadas com plasmídeo vazio**



Fonte: próprio autor.

Figura 12. Células HEK-293 transfetadas com plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-GFP-PX458 vazio, para controle da eficiência da transfecção. Células GFP-positivas marcadas em verde, analisadas por microscopia de fluorescência uma semana após a transfecção, com foto em escala de 75 μm, aumento de 20x.

## 5 DISCUSSÃO

O trabalho aqui apresentado buscou realizar a edição gênica do gene TACR1 em células HEK293T por meio da técnica de CRISPR, de maneira a permitir sua futura validação como alvo molecular para o tratamento da osteoartrite.

Dentre as etapas padrão para edição gênica por meio da técnica de CRISPR/Cas9, conseguimos realizar com sucesso o *design* do sgRNA-TACR1, a inserção do sgRNA em plasmídeos pSpCas9(BB)-2A-GFP e pSpCas9(BB)-2A-Puro, a clonagem dos plasmídeos em bactérias Stbl3, a extração de DNA plasmidial contendo o sgRNA, a enzima Cas9 e os marcadores de seleção GFP e gene de resistência à puromicina, e também a transfecção de células HEK293T com esse DNA, com o posterior isolamento dessas células pela técnica de *single cell-sorting*, nos permitindo a geração de 38 clones únicos que tiveram seu DNA extraído e sequenciado, até o momento da entrega deste trabalho, não recebemos os resultados com o sequenciamento dos clones, assim, hipotetizamos as abordagens possíveis para os próximos passos do trabalho, considerando-se que os dados de sequenciamento indiquem ou não a edição dos clones.

Caso os resultados do sequenciamento revelem que houve a edição do gene conforme esperado, nossos resultados estarão em conformidade com as metodologias em que nos baseamos e demais dados da literatura. Sendo assim, o éxon escolhido para o desenho do sgRNA terá se mostrado uma boa opção para realizar a edição do gene TACR1 nas células HEK, e será possível usar o mesmo DNA plasmidial já preparado para realizar a transfecção em células SH-SY5Y, uma linhagem de neuroblastoma, conforme protocolo em Bufalo *et al.* (2022), para estimular essas células com uma matriz extracelular com colágeno glicado, permitindo avaliar a modulação desse microambiente quanto à formação de mediadores inflamatórios e demais moléculas secretadas que possam ter importância, concluindo então se a deleção do gene TACR1 pode ser implicada nesse processo.

A transfecção com FuGENE poderia ser repetida, mas outros agentes de transfecção podem ser testados, de acordo com o tipo celular, como a lipofectamina, amplamente utilizada.

Caso os dados de sequenciamento revelem, no entanto, que a edição do gene não ocorreu conforme esperado, apesar das demais etapas estarem em conformidade com os resultados esperados e com as metodologias em que nos baseamos e demais dados da literatura, podemos pensar em alguns ajustes para induzir uma edição eficiente.

Quanto à transfecção, tivemos uma eficiência de 80.4% logo após às 48h, observada por meio de citometria. Conforme indicado pelo controle de fluorescência realizado uma semana depois da transfecção, ainda havia fluorescência, mesmo que diminuída. Isso pode sugerir que a expressão dos plasmídeos nas células possa ter sido perdida gradualmente, especialmente considerando-se que o tempo de expansão clonal foi de 23 dias, então até a chegada da etapa de extração do DNA, pouco DNA plasmidial poderia estar presente nas células que se expandiram, não ocorrendo edição significativa nessa população. Assim, poderíamos refazer a transfecção em condições que permitissem acompanhar a cultura por mais tempo, permitindo observar se a fluorescência seria mantida em níveis adequados, que indicassem que a edição das células poderia ter êxito. Ainda dentro da técnica de transfecção, poderíamos realizar uma co-transfecção, usando ambos os plasmídeos pSpCas9(BB)-2A-GFP e pSpCas9(BB)-2A-Puro, cada um com um sgRNA diferente como inserto, tendo como alvo diferentes éxons do gene TACR1, permitindo que se aumentem as chances de transfecção.

Outra alternativa seria a utilização do método de transdução com lentivírus para transformação das células HEK293T, por ser uma técnica que promove expressão estável da sequência de interesse (GÖDECKE; HAUSER; WIRTH, 2018) sendo necessária a construção de plasmídeos diferentes para realizar a técnica.

Uma última alternativa que se considerar é o desenho de um novo sgRNA, tendo como alvo outra região do gene TACR1, caso a repetição da transfecção ou a transdução não apresentem resultados satisfatórios, com o novo sgRNA podendo ser aplicado na transformação das células HEK293T pelas duas técnicas de transformação.

## 6 CONCLUSÕES

Como exposto neste trabalho, a osteoartrite é uma doença com alta prevalência, que apresenta impactos importantes na vida dos indivíduos acometidos por ela e também gera altos custos médicos relacionados à invalidez. Somando-se ao aumento da obesidade e envelhecimento da população, fatores de risco para a doença, e à falta de tratamentos eficientes, há muito interesse em buscar alternativas farmacológicas robustas contra a osteoartrite.

Por meio deste trabalho, propusemos uma abordagem inicial para a busca desses alvos farmacológicos, utilizando a técnica de CRISPR/Cas9 para editar o gene TACR1 (associado aos processos fisiopatológicos da doença) da nossa célula de interesse, buscando validá-lo como alvo para o tratamento da osteoartrite.

Ainda não obtivemos os dados finais que confirmem a edição das células aqui usadas, mas caso não tenhamos obtido êxito na edição, temos hipóteses e novas abordagens a serem seguidas, e caso as células tenham sido editadas, prosseguiremos como planejado, com os experimentos necessários para a caracterização do gene TACR1 como alvo molecular adequado para o tratamento da osteoartrite.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ABRAMOFF, B.; CALDERA, F. E. Osteoarthritis. **Medical Clinics of North America**, v. 104, n. 2, p. 293–311, mar. 2020.

Addgene. Disponível em: <https://www.addgene.org/>. Acesso em: 01/01/2024.

ALLEN, K. D.; THOMA, L. M.; GOLIGHTLY, Y. M. Epidemiology of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 30, n. 2, p. 184–195, fev. 2022.

ALMEIDA, M. S. M. *et al.* **Edição gênica por CRISPR: CAS9 da teoria à prática**. São Paulo: [s.n.].

BUFALO, M. C. *et al.* Advanced glycation endproducts produced by in vitro glycation of type I collagen modulate the functional and secretory behavior of dorsal root ganglion cells cultivated in two-dimensional system. **Experimental Cell Research**, v. 382, n. 2, p. 111475, set. 2019.

BUFALO, M. C. *et al.* Human Sensory Neuron-like Cells and Glycated Collagen Matrix as a Model for the Screening of Analgesic Compounds. **Cells**, v. 11, n. 2, p. 247, 12 jan. 2022.

CAO, Y. Q. *et al.* Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. **Nature**, v. 392, n. 6674, p. 390–394, mar. 1998.

CRISPOR. Disponível em: <http://crispor.tefor.net/>. Acesso em: 01/01/2024.

DELTCHEVA, E. *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, v. 471, n. 7340, p. 602–607, 30 mar. 2011.

---

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



Ensembl. Disponível em: <https://www.ensembl.org/index.html>. Acesso em: 01/01/2024.

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.

GÖDECKE, N.; HAUSER, H.; WIRTH, D. Stable Expression by Lentiviral Transduction of Cells. Em: [s.l: s.n.]. p. 43–55.

HEIGWER, F. *et al.* E-TALEN: a web tool to design TALENs for genome engineering. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 20, p. e190–e190, 1 nov. 2013.

HONVO, G. *et al.* Role of Collagen Derivatives in Osteoarthritis and Cartilage Repair: A Systematic Scoping Review With Evidence Mapping. **Rheumatology and Therapy**, v. 7, n. 4, p. 703–740, 17 dez. 2020.

IM, H. *et al.* Basic fibroblast growth factor accelerates matrix degradation via a neuro-endocrine pathway in human adult articular chondrocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 215, n. 2, p. 452–463, 24 maio 2008.

ISHINO, Y. *et al.* Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429–5433, dez. 1987.

JORE, M. M. *et al.* Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 18, n. 5, p. 529–536, 3 maio 2011.

LONG, L. *et al.* Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing in cotton by improved sgRNA expression. **Plant Methods**, v. 14, n. 1, p. 85, 3 dez. 2018.

MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1311, p. 47–75, 2015.

MALFAIT, A.-M.; MILLER, R. J. Emerging Targets for the Management of Osteoarthritis Pain. **Current Osteoporosis Reports**, v. 14, n. 6, p. 260–268, 12 dez. 2016.

MILLER, R. E.; MILLER, R. J.; MALFAIT, A.-M. Osteoarthritis joint pain: The cytokine connection. **Cytokine**, v. 70, n. 2, p. 185–193, dez. 2014.

MOJICA, F. J. M. *et al.* Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60, n. 2, p. 174–182, fev. 2005.

MOJICA, F. J. M.; JUEZ, G.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Transcription at different salinities of *Haloferox mediterranei* sequences adjacent to partially modified *Pst* I sites. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 613–621, 27 ago. 1993.

NAVRATILOVA, E.; PORRECA, F. Substance P and Inflammatory Pain: Getting It Wrong and Right Simultaneously. **Neuron**, v. 101, n. 3, p. 353–355, fev. 2019.

OTT, C. *et al.* Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, v. 2, p. 411–429, 2014.

POURCEL, C.; SALVIGNOL, G.; VERGNAUD, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 653–663, 1 mar. 2005.

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

SCHMIDT, A. *et al.* Receptor for AGE (RAGE): Weaving Tangled Webs Within the Inflammatory Response. **Current Molecular Medicine**, v. 7, n. 8, p. 743–751, 1 dez. 2007.

THOMAS, P.; SMART, T. G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 51, n. 3, p. 187–200, maio 2005.

WARNER, S. C. *et al.* Pain in knee osteoarthritis is associated with variation in the neurokinin 1/substance P receptor (*TACR 1*) gene. **European Journal of Pain**, v. 21, n. 7, p. 1277–1284, 11 ago. 2017.

WU, Y. *et al.* Enhanced CRISPR/Cas9-mediated biallelic genome targeting with dual surrogate reporter-integrated donors. **FEBS Letters**, v. 591, n. 6, p. 903–913, 8 mar. 2017.

YEO, N. C. *et al.* An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation. **Nature Methods**, v. 15, n. 8, p. 611–616, 16 ago. 2018.

ZIEGLGÄNSBERGER, W. Substance P and pain chronicity. **Cell and Tissue Research**, v. 375, n. 1, p. 227–241, 3 jan. 2019.