

Edição genômica e seu potencial para a aquicultura brasileira



OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

2 FOME ZERO
E AGRICULTURA
SUSTENTÁVEL



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

DOCUMENTOS 148

Edição genômica e seu potencial para a aquicultura brasileira

Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan

***Embrapa Amazônia Ocidental
Manaus, AM
2020***

Embrapa Amazônia Ocidental
Rodovia AM-010, Km 29,
Estrada Manaus/Itacoatiara
69010-970, Manaus, Amazonas
Fone: (92) 3303-7800
Fax: (92) 3303-7820
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Inocencio Junior de Oliveira

Secretária-executiva
Gleise Maria Teles de Oliveira

Membros
*José Olenilson Costa Pinheiro, Maria Augusta
Abtibol Brito de Sousa e Maria Perpétua Beleza
Pereira*

Supervisão editorial e revisão de texto
Maria Perpétua Beleza Pereira

Normalização bibliográfica
Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Gleise Maria Teles de Oliveira

Foto da capa
Colour box

1ª edição
Publicação digital (2020)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Amazônia Ocidental

O'Sullivan, Fernanda Loureiro de Almeida.

Edição genômica e seu potencial para a aquicultura brasileira / Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan. – Manaus : Embrapa Amazônia Ocidental, 2020.

22 p. : il. color. - (Documentos / Embrapa Amazônia Ocidental, ISSN 1517-3135; 148).

1. Aquicultura. 2. Edição gênica. I. Título. II. Série.

CDD 639.3

Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa (CRB-11/420)

© Embrapa, 2020

Autores

Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan

Médica veterinária, doutora em Biologia Celular, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM

Apresentação

De tempos em tempos, a humanidade desfruta de benefícios fabulosos provenientes de avanços promovidos pela Ciência. O momento atual é um desses em que, a partir de ferramentas decorrentes de novas técnicas de sequenciamento genético, podemos usufruir dos benefícios oriundos da compreensão de mecanismos moleculares. Nesta obra, isso se evidencia de modo espetacular em uma das áreas na qual a produção de alimentos mais cresce e chega à nossa realidade brasileira: a aquicultura.

A edição genômica e seu potencial para a aquicultura brasileira são apresentados aqui de uma forma simples quanto à compreensão, mas robusta em detalhes, o que facilita o entendimento por parte da comunidade científica e de produtores.

Esta publicação, além de detalhar o uso da nova tecnologia, ressalta aspectos relacionados a reprodução e sanidade e o sucesso apontado em muitas espécies de peixes pelo mundo. Revela ainda como essas pesquisas constituem um enorme potencial para estudos e tratamentos em humanos, com redução de tempo e menor emprego de recursos.

A produção aquícola no Brasil ainda é recente, por isso a sua relevância como oportunidade de produção pecuária precisa ser ressaltada, haja vista o rápido crescimento da produção das espécies de tilápia e tambaqui, importantes impulsionadoras da atividade no País. É preciso cercar-se das melhores oportunidades para o uso dessas novas e revolucionárias técnicas enfatizadas na deleção gênica, que, diferentemente da transgenia, não introduzem genes de espécies diferentes.

Com satisfação, nós que fazemos a Embrapa Amazônia Ocidental disponibilizamos mais esta obra para a sociedade na expectativa de que esses novos meios de edição genômica caminhem irmanados com o desenvolvimento da aquicultura brasileira, trazendo benefícios ao ambiente, ao produtor e aos que terão o prazer e a oportunidade de consumir, contribuindo assim para o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável).

Everton Rabelo Cordeiro

Chefe-Geral

Sumário

Introdução.....	9
Edição genômica: abordagem CRISPR/Cas9.....	9
Edição genômica em peixes.....	11
Desafios da edição genômica	15
Perspectivas no Brasil.....	16
Conclusão.....	17
Referências.....	18

Introdução

A aquicultura, setor de produção de alimentos que mais cresce no mundo, tem se expandido globalmente. Com isso, as pesquisas precisam responder rapidamente e acompanhar essa evolução, para garantir a sustentabilidade da atividade e produção de espécies de alta performance zootécnica, como elevado ganho de peso/crescimento, resistência às principais enfermidades e a variações ambientais, composição e qualidade de carcaça, dentre outras características produtivas de impacto econômico.

Nos últimos anos, as técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) permitiram a redução de custo e tempo para o sequenciamento genômico e possibilitaram avanços significativos no uso de ferramentas genômicas para a compreensão de mecanismos moleculares, estudo da função de genes e obtenção de novos fenótipos (em especial os processos biológicos de interesse à agricultura). Dentre essas ferramentas, destacam-se as novas técnicas de edição genômica, como a CRISPR/Cas9, que têm revolucionado a engenharia genética. De estudos funcionais à pesquisa aplicada, a edição de genes tem um potencial imenso na aquicultura, pois permite a deleção ou até introdução de genes que codificam proteínas com funções que prejudicam ou favorecem a produtividade, respectivamente. A alta fecundidade e fertilização externa da maioria das espécies de organismos aquáticos possibilitam a adoção dessa técnica em uma escala inatingível nas espécies zootécnicas terrestres. Este documento aborda de forma simples os avanços recentes da edição genômica em peixes e sua aplicabilidade para o avanço tecnológico da aquicultura brasileira.

Edição genômica: abordagem CRISPR/Cas9

Edição genômica refere-se às modificações realizadas em um ou mais gene(s) no genoma de um indivíduo, seja por deleção parcial ou completa, inviabilizando sua atividade, ou inserção de sequências (novas). Diferentes métodos para induzir *knockouts* foram gerados nos últimos 30 anos, com os primeiros trabalhos realizados em camundongos de laboratório.

O constante aperfeiçoamento das metodologias resultou recentemente na técnica conhecida por CRISPR/Cas9 (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- Cas Associated System*), que tem revolucionado a maneira de se modificar ou editar o DNA. A técnica consiste basicamente na utilização de dois elementos: i) uma enzima (Cas9) que fragmenta fita dupla de DNA; e ii) uma sequência-guia de RNA, que direciona o corte do DNA genômico em regiões-alvo específicas, geralmente dentro de um gene, inviabilizando permanentemente sua expressão (Horvath; Barrangou, 2010; Wiedenheft et al., 2012). A nuclease, juntamente com a sequência-guia, realiza a quebra de ambas as fitas de DNA na região específica (alvo) com alta precisão (Kleinstiver et al., 2016). A partir daí, os mecanismos reparadores da célula, na tentativa de reparar o DNA fragmentado, fazem a (re)união das fitas, mas geralmente com uma sequência errônea de nucleotídeos, ou seja, diferente da sequência original (Figura 1A). É exatamente essa reparação errônea que gera a mutação no gene, conhecida por *knockout*, inviabilizando sua expressão normal e conseqüentemente a função original. De forma similar, para a inserção de uma sequência, mais um elemento é injetado junto à Cas9 e à sequência-guia: o fragmento a ser inserido, flanqueado por sequências adjacentes a ambos os lados do corte original. Assim, após a realização do corte na fita dupla, a sequência se insere no local e a reparação de DNA segue seu curso, incorporando a nova sequência no local, *knockin* (Figura 1B).

A CRISPR/Cas9 permitiu cortes mais precisos/específicos no DNA genômico, aumentando assim a eficiência e precisão da modificação, seja *knockout* (inclusive de múltiplos alvos simultaneamente), seja *knockin* (de fragmentos extras ou genes inteiros no genoma) (Sander; Joung, 2014). Em 2020, as duas pesquisadoras que desenvolveram a técnica CRISPR/Cas9 (Dra. Emmanuelle Charpentier e Dra. Jennifer A. Doudna) ganharam o Prêmio Nobel de Química, o que comprova o grau de inovação, relevância e abrangência dessa ferramenta.

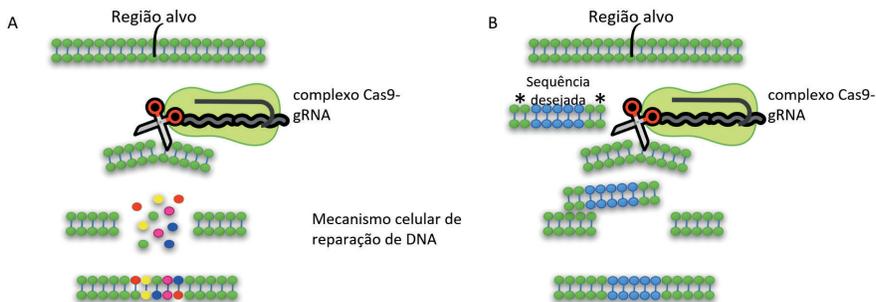


Figura 1. Edição genômica por ação de enzimas que quebram fitas duplas de DNA em locais específicos, como a CRISPR/Cas9. (A) *Knockout*: a enzima nuclease Cas9 e a sequência-guia de RNA (complexo Cas9-gRNA) efetua o corte preciso na fita dupla de DNA. O mecanismo de reparação de DNA é ativado, consertando o fragmento de forma diferente do original (errônea), gerando o *knockout*. (B) *Knockin*: o fragmento a ser inserido, flanqueado por sequências originais da região alvo do gene (*), é injetado junto ao complexo Cas9-gRNA. Após a reparação, a sequência desejada é inserida de forma precisa e permanente dentro do gene.

Edição genômica em peixes

Originalmente, a edição genômica era um recurso utilizado para a investigação da função dos genes nas diferentes espécies. Porém, com o avanço das técnicas de sequenciamento e o desenvolvimento de enzimas nucleases altamente eficientes e precisas, bem como a redução dos custos envolvidos, a edição de genes vem se tornando uma ferramenta valiosa no desenvolvimento de genótipos de plantas, animais e microrganismos com características de interesse, como maior produtividade, resistência ou tolerância a estresses bióticos e abióticos, e alimentos de alta qualidade nutricional.

Especificamente na aquicultura, a edição gênica encontra importantes fatores facilitadores, como a fertilização externa e alta fecundidade. Para a eficácia da edição em um indivíduo e sua transmissão à prole é importante que os reagentes sejam inseridos (por microinjeção) no ovo fertilizado ainda em fase unicelular. Daí a relativa facilidade do uso da técnica em espécies de fertilização externa. Já a alta fecundidade viabiliza a aplicação da técnica em centenas de indivíduos ao mesmo tempo. Um operador consegue, por exemplo, injetar manualmente cerca de 500 ovos de peixes/hora.

Centenas de trabalhos realizados não deixam dúvidas quanto à importância da edição gênica para as ciências básica e aplicada, principalmente no que diz respeito à identificação de genes, fatores e vias de interesse na ecologia, preservação e produção de organismos aquáticos (revisado em Wargelius, 2019). Nos últimos anos, a edição de genes tem sido empregada em várias espécies, desde peixes considerados modelos biológicos, como o zebrafish (*Danio rerio*) (Hruscha et al., 2013; Hwang et al., 2013; Jao et al., 2013; Lau et al., 2016) e medaka (*Oryzias latipes*) (Ansai et al., 2012; Fang et al., 2018; Watakabe et al., 2018) até espécies importantes para a aquicultura em diferentes países, como tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Li et al., 2014, 2015; Xie et al., 2016), linguado (*Paralichthys olivaceus*) (Kim et al., 2019), bagres (Dong et al., 2011; Qin et al., 2016; Khalil et al., 2017), carpas (Zhong et al., 2016), salmonídeos (truta e salmão; Boonanuntanasarn et al., 2004; Edvardsen et al., 2014; Wargelius et al., 2016; Cleveland et al., 2018), dourada (*Sparus aurata*) (Kishimoto et al., 2018) e ostra-do-pacífico (*Crassostrea gigas*) (Yu et al., 2019). Os objetivos finalísticos são transversais às diferentes espécies e se concentram em esterilidade, qualidade de gametas, sanidade, crescimento, bem-estar animal e qualidade de filé (revisado em Gratacap et al., 2019).

A reprodução é de longe a área que mais tem utilizado a edição genômica em peixes, seja para caracterizar vias responsáveis pelo desenvolvimento das gônadas e atividade reprodutiva, seja simplesmente para produzir lotes de monossexo. Pelo uso de *knockouts*, ficou mais fácil identificar os genes responsáveis pelo sexo nos peixes, uma vez que a determinação sexual é completamente espécie-específica nessa classe. O uso dessas informações abriu grande oportunidade de avanços tecnológicos em diferentes espécies para o desenvolvimento de testes de sexagem precoce, fundamental nos programas de melhoramento genético, e para a produção de lotes monossexuados, prática que aumenta a produtividade em certas espécies de importância econômica. Nesse último caso, a manipulação genômica descarta o uso de hormônios esteroides na inversão sexual, que são amplamente utilizados, por exemplo, na tilapicultura brasileira. Ainda, a criação de indivíduos estéreis traz: i) segurança ambiental (equilíbrio genético das populações selvagens, quando a aquicultura é praticada em águas abertas); ii) ganhos de rendimento (animais estéreis não sofrem as consequências da maturação sexual, como redução do crescimento e da qualidade da carne); e iii) ganhos no bem-estar animal, sem incidência de brigas e prejuízos da imunidade, que são

inerentes à puberdade e atividade sexual (revisado em Taranger et al., 2010). Especificamente para a aquicultura, a edição de genes para estudos de reprodução de peixes tem sido aplicada em tilápia (espécie cuja produção de lotes exclusivos de machos é mais rentável; Zhang et al., 2014; Feng et al., 2015; Li et al., 2015; Jiang et al., 2016, 2017; Xie et al., 2016), linguados (Kim et al., 2019), bagres (Li et al., 2016; Qin et al., 2016), salmonídeos (Wargelius et al., 2016; Kleppe et al., 2017) e esturjão (*Acipenser ruthenus*) (Baloch et al., 2019), seja para produção de peixes estéreis, seja para inversão sexual. Diferentes projetos (e seus resultados) apontam a edição gênica como a estratégia mais promissora para a produção de peixes estéreis em larga escala.

Em segundo lugar no uso da edição genética voltada a aquicultura está a sanidade animal (revisado em Fraslín et al., 2020). Genes que conferem resistência a doenças infecciosas e parasitos têm sido alvos de experimentos *knockin*, e fatores que aumentam a imunidade são alvos de edição visando à super-expressão (Chakrapani et al., 2016; Ma et al., 2018). A edição gênica tem sido também adotada em linhagens celulares de peixes para a produção mais eficiente de vírus usados no desenvolvimento de vacinas, como, por exemplo, *knockout* de componentes da via do interferon (Elaswad et al., 2018). É consenso entre os pesquisadores que a sanidade de peixes, muito em breve, se tornará a principal usuária da técnica.

Além da reprodução e saúde, a técnica tem sido adotada em estudos de pigmentação, crescimento, sobrevivência e até envelhecimento de organismos aquáticos. Genes responsáveis por deformidades, desenvolvimento da coluna vertebral e formação de ossos e vasos têm sido descobertos com auxílio de CRISPR/Cas9 em peixes modelo e/ou de interesse comercial. O exemplo mais recente é o *knockout* do gene miostatina (conhecido por Belgian blue, devido a sua ausência na raça bovina considerada de musculatura dupla) no zebrafish (Gao et al., 2016), medaka (Chisada et al., 2011), carpa comum (*Cyprinus carpio*) (Zhong et al., 2016), na dourada vermelha (*Pagrus major*) (Kishimoto et al., 2018; Ohama et al., 2020), nos bagres do canal (*Ictalurus punctatus*) (Khalil et al., 2017; Zhang et al., 2020a) e amarelo (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Zhang et al., 2020b), no linguado (*Paralichthys olivaceus*) (Kim et al., 2019), que resultou em peixes com maior massa muscular (Figura 2). No salmão (*Salmo salar*), um gene responsável pelo metabolismo de ômega-3 foi recentemente editado, experimentalmente, para aumentar a quantidade desse importante lipídio no filé do peixe (Datsomor et al., 2019). O futuro

dessas pesquisas é alcançar linhagens de alto desempenho, crescimento e desenvolvimento, numa intersecção entre bem-estar animal e produtividade.

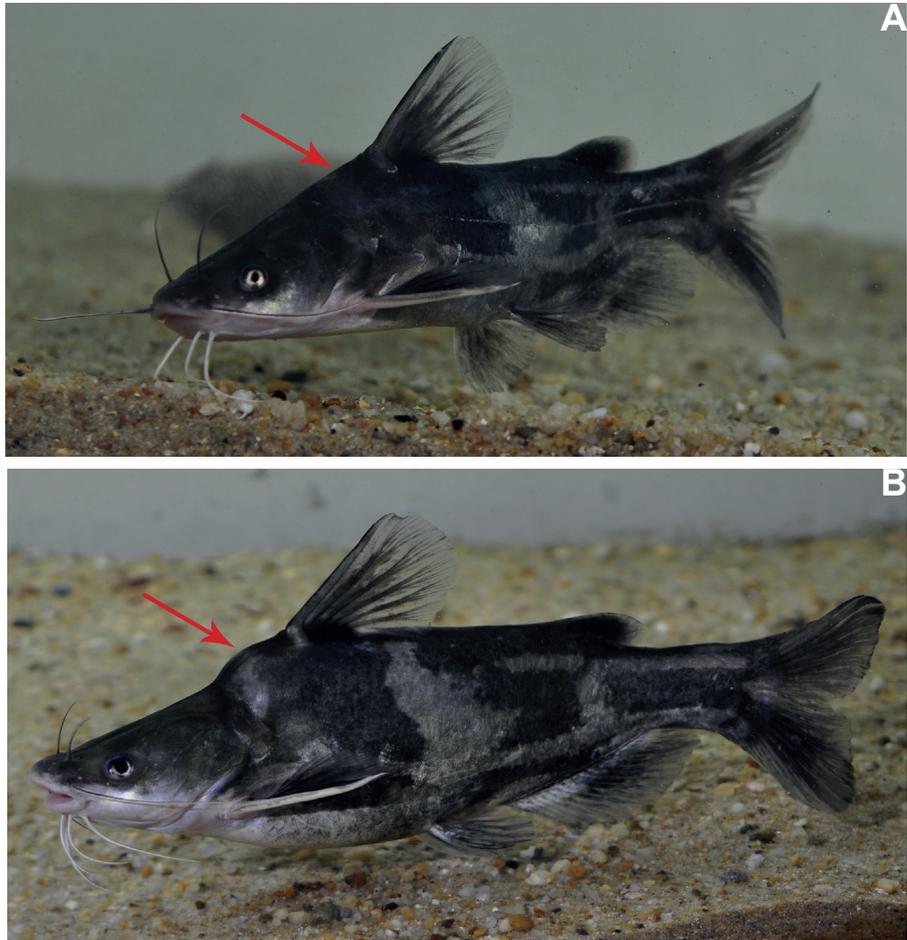


Figura 2. O bagre-amarelo (*Pelteobagrus fulvidraco*) selvagem (A) comparado com o geneticamente modificado para o gene miostatina (B) de mesma idade (210 dias pós-fertilização) exemplifica bem o fenótipo de musculatura dupla no peixe editado.

Fonte: Zhang et al., 2020b

Não menos importantes, os peixes considerados modelos-biológicos, como o zebrafish e o medaka, vêm ganhando espaço nas pesquisas biomédicas. A grande similaridade com o genoma humano, a ubiquidade de genes responsáveis pelo desenvolvimento de doenças hereditárias (aproximadamente 84%), a facilidade de manutenção/manejo e ciclo de vida curto fizeram do zebrafish a estrela do momento para estudos sobre doenças genéticas e formulação de novas drogas (revisado em Naert; Vleminckx, 2018). A edição genômica tem sido aplicada em peixes modelo, por exemplo, em pesquisas para trombocitopenia, osteoporose, epilepsia infantil e câncer. Esses estudos demonstram o imenso potencial da edição genômica em peixes para estudos de doenças e tratamentos em humanos.

Desafios da edição genômica

Apesar de todos os avanços científicos e tecnológicos que a edição genômica possibilita, ainda existem alguns obstáculos que precisam ser ultrapassados, principalmente para as espécies de interesse econômico. A presença de mosaicismos, ou seja, diferenças pequenas nos cortes do DNA em diferentes células, e cortes fora do alvo (off-target) ainda ocorrem. Ambas as ocorrências podem acarretar consequências indesejáveis no metabolismo e/ou fisiologia dos indivíduos. Para essas situações, a identificação das mutações corretas (desejadas) na geração F0 para uso na produção das sucessivas gerações bem como o aprimoramento da atividade enzimática (para atuar exclusivamente na fase unicelular do ovo) são alternativas viáveis e alvos de diferentes estudos.

O preço também é outro importante fator a ser considerado. Embora a edição genômica em si seja um procedimento relativamente barato e sem necessidade de equipamentos muito caros, todo o procedimento técnico-científico requer muito tempo (que ainda depende diretamente das gerações de cada espécie, entre outros), equipe altamente especializada e instalações apropriadas, como laboratório regulamentado para trabalhos com organismos geneticamente modificados (OGMs). Um meio cada vez mais praticado para ultrapassar essa barreira é o financiamento das pesquisas por parte do setor privado, que, afinal, é o maior interessado no sucesso dessas abordagens.

Perspectivas no Brasil

A produção de organismos aquáticos é a atividade pecuária mais recente no Brasil. Por essa razão, ainda existem diferentes possibilidades e oportunidades para se alavancar ainda mais a atividade, disseminar e intensificar os sistemas de produção. Apesar de ser considerada infante, a aquicultura brasileira tem apresentado constante crescimento nos últimos anos (4% a 5% por ano). Com o rápido desenvolvimento da edição genômica e sua alta eficiência em peixes, a técnica muito em breve começará a ser praticada no Brasil em peixes, tanto na pesquisa básica quanto na aplicada. Além do zebrafish e medaka, que são estudados em diferentes laboratórios no Brasil, peixes de importância econômica cuja reprodução artificial esteja dominada, como a tilápia e o tambaqui, são espécies promissoras. O Brasil já se tornou o quarto maior produtor de tilápia no mundo (Peixe Br, 2020), que, por sua vez, é a quarta espécie mais produzida pela aquicultura mundial. Na China, pesquisadores trabalham com edição gênica em tilápia há quase 10 anos, sempre almejando melhorias no desempenho zootécnico para seu cultivo. Com a recente montagem do genoma do tambaqui, os focos serão os trabalhos de genômica funcional para identificar a função de genes de interesse para incrementos em sua performance zootécnica.

Enfim é grande o potencial para uso da técnica no Brasil, em todas as áreas do conhecimento e para qualquer fase do ciclo de produção. Vale ressaltar que, ao aumentar constantemente o escalonamento e a eficiência da aquicultura brasileira, é preciso estar atentos aos riscos pertinentes a essa intensificação. A falta de vacinas e de estudos epidemiológicos adequados pode resultar em *outbreaks* de doenças, acarretando grandes perdas para o setor. Da mesma forma, a produção aquícola em águas abertas (tanques-rede) também representa um risco crescente aos estoques selvagens das espécies.

Em paralelo à pesquisa, os órgãos oficiais reguladores precisam avançar, para otimização de tempo e regularização das atividades científicas, principalmente no que diz respeito ao uso de animais geneticamente editados para consumo humano. Vale destacar que a deleção de genes não configura transgenia (técnica regulamentada e amplamente praticada na agricultura brasileira), uma vez que não introduz genes de uma espécie (ou sintéticos) no DNA de outra. Esse aspecto é interessante e deve ser destacado para a

desmistificação de crenças populares sobre possíveis efeitos deletérios na saúde do consumidor ou na qualidade do filé de organismos geneticamente modificados.

Existe uma tendência global em relação a maior aceitação da edição genômica como forma de aumentar a eficiência dos sistemas de produção e do bem-estar animal. No Canadá, o salmão AquaBounty (transgênico para hormônio de crescimento) foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e por autoridades canadenses pertinentes, e na Argentina uma linhagem editada geneticamente de tilápia (FLT 01) foi aprovada. Assim é esperado que a legislação e a aceitação pública de organismos geneticamente modificados (não transgênicos) não encontrem resistências no Brasil. Mas, para isso, grupos de trabalho com diferentes representatividades (pesquisadores, indústria, órgãos regulamentadores e consumidores) devem unir esforços para a realização de avaliações científicas precisas e sem conflitos de interesse. Desta forma, evita-se que no futuro a edição genômica sem transgenia encontre barreiras legais ou até ausência completa de regulamento que impeça a sua utilização na aquicultura brasileira. Isso implica, inclusive, facilidade de se obter apoio financeiro do setor privado a futuras pesquisas na área.

Conclusão

Para o avanço da produção agropecuária global, a inovação tecnológica é ferramenta fundamental. A edição genômica é um recurso extremamente poderoso para estudos em biologia básica e aplicada, em plantas e animais. Especificamente em organismos aquáticos, fertilização externa de milhares de ovos e facilidade de manipulação são vantagens para o uso de CRISPR/Cas9. Deletar, inserir ou alterar genes de importância zootécnica permite a produção de linhagens resistentes a doenças, parasitos, condições ambientais críticas, hipóxia, peixes estéreis ou unissexuados. Permite ainda a produção em larga escala de peixes com superioridade em conversão alimentar e crescimento. Entretanto, os avanços com organismos geneticamente editados, sem o uso da transgenia, carecem de legislação especificamente voltada a essa nova realidade. De maneira similar à edição gênica, a aquicultura brasileira encontra-se em franco desenvolvimento, e a oportunidade de se utilizar da primeira para o desenvolvimento da segunda poderá representar o "pulo do gato" para os peixes do Brasil.

Referências

- ANSAI, S.; OCHIAI, H.; KANIE, Y.; KAMEI, Y.; GOU, Y.; KITANO, T.; YAMOTO, T.; KINOSHITA, M. Targeted disruption of exogenous EGFP gene in medaka using zinc-finger nucleases. **Development Growth & Differentiation**, v. 54, n. 5, p. 546-556, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA - PEIXE BR. **Anuário Brasileiro da Piscicultura**. São Paulo, 2020. Disponível em: www.peixebr.com.br. Acesso em: 21 nov. 2020.
- BALOCH, A. R.; FRANĚK, R.; TICHOPÁD, T.; FUČÍKOVÁ, M.; RODINA, M.; PŠENIČKA, M. Dnd1 knockout in sturgeons by CRISPR/Cas9 generates germ cell free Host for surrogate production. **Animals** (Basel), v. 9, n. 4, p. 174, Apr. 2019.
- BOONANUNTANASARN, S.; YOSHIKAZI, G.; IWAI, K.; TAKEUCHI, T. Molecular cloning, gene expression in albino mutants and gene knockdown studies of tyrosinase mRNA in rainbow trout. **Pigment Cell Research**, v. 17, n. 4, p. 413-421, 2004.
- CHISADA, S. I.; OKAMOTO, H.; TANIGUCHI, Y.; KIMORI, Y.; TOYODA, A.; SAKAKI, Y.; TAKEDA, S.; YOSHIURA, Y. Myostatin-deficient medaka exhibit a double-muscling phenotype with hyperplasia and hypertrophy, which occur sequentially during post-hatch development. **Developmental Biology**, v. 359, n. 1, p. 82-94, Nov. 2011.
- CHAKRAPANI, V.; PATRA, S. K.; PANDA, R. P.; RASAL, K. D.; JAYASANKAR, P.; BARMAN, H. K. Establishing targeted carp TLR22 gene disruption via homologous recombination using CRISPR/ Cas9. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 61, p. 242-247, Aug. 2016.
- CLEVELAND, B. M.; YAMAGUCHI, G.; RADLER, L. M.; SHIMIZU, M. Editing the duplicated insulin-like growth factor binding protein-2b gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Scientific Reports**, v. 8, Art. 16054, p. 1-13, 2018.
- DATSOMOR, A. K.; ZIC, N.; LI, K.; OLSEN, R. E.; JIN, Y.; VIK, J. O.; EDVARDBSEN, R. B.; GRAMMES, F.; WARGELIUS, A.; WINGE, P. CRISPR/Cas9-mediated ablation of *elovl2* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) inhibits elongation of polyunsaturated fatty acids and induces *Srebp-1* and target genes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.
- DONG, Z.; GE, J.; LI, K.; XU, Z.; LIANG, D.; LI, J.; JIA, W.; LI, Y.; DONG, X.; CAO, S.; WANG, X.; PAN, J.; ZHAO, Q. Heritable targeted inactivation of myostatin gene in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) using engineered zinc finger nucleases. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, e28897, 2011.
- EDVARDBSEN, R. B.; LEININGER, S.; KLEPPE, L.; SKAFTNESMO, K. O.; WARGELIUS, A. Targeted mutagenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) using the CRISPR/Cas9 system induces complete knockout individuals in the F0 generation. **PLoS One**, v. 9, n. 9, e108622, 2014.
- ELASWAD, A.; KHALIL, K.; YE, Z.; LIU, Z.; LIU, S.; PEATMAN, E.; ODIN, R.; DRESCHER, D.; GOSH, K.; QIN, G.; BUGG, W.; BACKENSTOSE, N.; DUHNAM, R. Effects of CRISPR/Cas9

dosage on TICAM1 and RBL gene mutation rate, embryonic development, hatchability and fry survival in channel catfish. **Scientific Reports**, v. 8, Art. 16499, 2018.

FANG, J.; CHEN, T.; PAN, Q.; WANG, Q. Generation of albino medaka (*Oryzias latipes*) by CRISPR/Cas9. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 330, n. 4, p. 242-246, 2018. Erratum in: *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular Developmental Evolution*, v. 330, n. 6-7, p. 390, 2018.

FENG, R.; FANG, L.; CHENG, Y.; HE, X.; JIANG, W.; DONG, R.; SHI, H.; JIANG, D.; SUN, L.; WANG, D. Retinoic acid homeostasis through *aldh1a2* and *cyp26a1* mediates meiotic entry in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Scientific Reports**, v. 5, Art. 10131, 2015.

FRASLIN, C.; QUILLET, E.; ROCHAT, T.; DECHAMP, N.; BERNARDET, J. F.; COLLET, B.; LALLIAS, D.; BOUDINOT, P. Combining multiple approaches and models to dissect the genetic architecture of resistance to infections in fish. **Frontiers in Genetic**, 10 July 2020.

GAO, Y.; DAI, Z.; SHI, C.; ZHAI, G.; JIN, X.; HE, J.; LOU, Q.; YIN, Z. Depletion of myostatin b promotes somatic growth and lipid metabolism in zebrafish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, Art. 88, July 2016.

GRATACAP, R. L.; WARGELIUS, A.; EDVARDSEN, R. B.; HOUSTON, R. D. Potential of genome editing to improve aquaculture breeding and production. **Trends in Genetics**, v. 35, n. 9, p. 672-684, Sept. 2019.

HORVATH, P.; BARRANGOU, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. **Science**, v. 8, n. 327, Art. 5962, p. 167-70, Jan. 2010.

HRUSCHA, A.; KRAWITZ, P.; RECHENBERG, A.; HEINRICH, V.; HECHT, J.; HAASS, C.; SCHMID, B. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. **Development**, v. 140, n. 24, p. 4982-4987, Dec. 2013.

HWANG, W. Y.; FU, Y.; REYON, D.; MAEDER, M. L.; TSAI, S. Q.; SANDER, J. D.; PETERSON, R. T.; YE, H. J.; JOUNG, J. K. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, v. 31, p. 227-229, 2013.

JAO, L. E.; WENTE, S. R.; CHEN, W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 34, p. 13904-13909, 2013.

JIANG, D. N.; YANG, H. H.; LI, M. H.; SHI, H. J.; ZHANG, X. B.; WANG, D. S. *gsdf* is a downstream gene of *dmrt1* that functions in the male sex determination pathway of the Nile tilapia. **Molecular Reproduction and Development**, v. 83, n. 6, p. 497-508, 2016.

JIANG, D.; CHEN, J.; FAN, Z.; TAN, D.; ZHAO, J.; SHI, H.; LIU, Z.; TAO, W.; LI, M.; WANG, D. CRISPR/Cas9-induced disruption of *wt1a* and *wt1b* reveals their different roles in kidney and gonad development in Nile tilapia. **Developmental Biology**, v. 428, n. 1, p. 63-73, 2017.

KHALIL, K.; ELAYAT, M.; KHALIFA, E.; DAGHASH, S.; ELASWAD, A.; MILLER, M.; ABDELRAHMAN, H.; YE, Z.; ODIN, R.; DRESCHER, D.; VO, K.; GOSH, K.; BUGG, W.;

- ROBINSON, D.; DUNHAM, R. Generation of Myostatin gene-edited Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. **Scientific Reports**, v. 7, Art. 7301, 2017.
- KIM, J.; CHO, J. Y.; KIM, H. C.; NOH, J. K.; KIM, Y. O.; HWANG, H. K.; KIM, W. J.; YEO, S. Y.; AN, C. M.; PARK, J. Y.; KONG, H. J. CRISPR/Cas9-mediated myostatin disruption enhances muscle mass in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v. 512, Art. 734336, 15 Oct. 2019.
- KISHIMOTO, K.; WASHIO, Y.; YOSHIURA, Y.; TOYODA, A.; UENO, T.; FUKUYAMA, H.; KATO, K.; KINOSHITA, M. Production of a breed of red sea bream *Pagrus major* with an increase of skeletal muscle mass and reduced body length by genome editing with CRISPR/Cas9. **Aquaculture**, v. 495, p. 415-427, 2018.
- KLEINSTIVER, B. P.; PATTANAYAK, V.; PREW, M. S.; TSAI, S. Q.; NGUYEN, N. T.; ZHENG, Z.; JOUNG, J. K. High-fidelity CRISPR– Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. **Nature**, v. 529, p. 490-495, 2016.
- KLEPPE, L.; ANDERSSON, E.; SKAFTNESMO, K. O.; EDVARDBSEN, R. B.; FJELLDAL, P. G.; NORBERG, B.; BOGERD, J.; SCHULZ, R. W.; WARGELIUS, A. Sex steroid production associated with puberty is absent in germ cell-free salmon. **Scientific Reports**, v. 7, Art. 12584, 2017.
- LAU, E. S. W.; ZHANG, Z.; QIN, M.; GE, W. Knockout of Zebrafish ovarian aromatase gene (*cyp19a1a*) by TALEN and CRISPR/Cas9 leads to all-male offspring due to failed ovarian differentiation. **Scientific Reports**, v. 6, Art. 37357, 2016.
- LI, M. H.; YANG, H.; ZHAO, J.; FANG, L.; SHI, H.; LI, M.; SUN, Y.; ZHANG, X.; JIANG, D. N.; ZHOU, L.; WANG, D. Efficient and heritable gene targeting in tilapia by CRISPR/Cas9. **Genetics**, v. 197, n. 2, p. 591-599, June 2014.
- LI, M.; SUN, Y.; ZHAO, J.; SHI, H.; ZENG, S.; YE, K.; JIANG, D.; ZHOU, L.; SUN, L.; TAO, W.; NAGAHAMA, Y.; KOCHER, T. D.; WANG, D. A tandem duplicate of anti-Müllerian hormone with a missense SNP on the Y chromosome is essential for male sex determination in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 11, e1005678, 2015.
- LI, M. H.; FENG, R.; MA, H.; DONG, R.; LIU, Z.; JIANG, W.; TAO, W.; WANG, D. Retinoic acid triggers meiosis initiation via *stra8*-dependent pathway in Southern catfish, *Silurus meridionalis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 232, p. 191-198, 2016.
- MA, J.; FAN, Y.; ZHOU, Y.; LIU, W.; JIANG, N.; ZHANG, J.; ZENG, L. Efficient resistance to grass carp reovirus infection in JAM-A knockout cells using CRISPR/Cas9. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 76, p. 206-215, 2018.
- NAERT, T.; VLEMINCKX, K. CRISPR/Cas9 disease models in zebrafish and *Xenopus*: the genetic renaissance of fish and frogs. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 28, p. 41-52, Aug. 2018.

OHAMA, M.; WASHIO, Y.; KISHIMOTO, K.; KINOSHITA, M.; KATO, K. Growth performance of myostatin knockout red sea bream *Pagrus major* juveniles produced by genome editing with CRISPR/Cas9. **Aquaculture**, v. 529, Art. 735672, 2020.

QIN, Z.; LI, Y.; SU, B.; CHENG, Q.; YE, Z.; PERERA, D. A.; FOBES, M.; SHANG, M.; DUNHAM, R. A. Editing of the luteinizing hormone gene to sterilize Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, using a modified zinc finger nuclease technology with electroporation. **Marine Biotechnology**, v. 18, p. 255-263, 2016.

SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 347-355, 2014.

TARANGER, G. L.; CARRILLO, M.; SCHULZ, R. W.; FONTAINE, P.; ZANUY, S.; FELIP, A.; WELTZIEN, F. A.; DUFOUR, S.; KARLSEN, O.; NORBERG, B.; ANDERSSON, E.; HANSEN, T. Control of puberty in farmed fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 483-515, Feb. 2010.

WARGELIUS, A.; LEININGER, S.; SKAFTNESMO, K. O.; KLEPPE, L.; ANDERSSON, E.; TARANGER, G. L.; SCHULZ, R.; EDVARDSEN, R. B. Dnd knockout ablates germ cells and demonstrates germ cell independent sex differentiation in Atlantic salmon. **Scientific Reports**, v. 6, Art. 21284, 2016.

WARGELIUS, A. Application of genome editing in aquatic farm animals: Atlantic salmon. **Transgenic Research**, v. 28, p. 101-105, 2019.

WATAKABE, I.; HASHIMOTO, H.; KIMURA, Y.; YOKOI, S.; NARUSE, K.; HIGASHIJIMA, S. I. Highly efficient generation of knock-in transgenic medaka by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. **Zoological Letters**, v. 4, Art. 3, 2018.

WIEDENHEFT, B.; STERNBERG, S. H.; DOUDNA, J. A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. **Nature**, v. 482, n. 7385, p. 331-338, 2012.

XIE, Q. P.; HE, X.; SUI, Y. N.; CHEN, L. L.; SUN, L. N.; WANG, D. S. Haploinsufficiency of SF-1 causes female to male sex reversal in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Endocrinology**, v. 157, n. 6, p. 2500-2514, 2016.

YU, H.; LI, H.; LI, Q.; XU, R.; YUE, C.; DU, S. "Targeted gene disruption in Pacific oyster based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes." **Marine Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 301-309, 2019.

ZHANG, X.; WANG, H.; LI, M.; CHENG, Y.; JIANG, D.; SUN, L.; TAO, W.; ZHOU, L.; WANG, Z.; WANG, D. Isolation of doublesex-and mab-3-related transcription factor 6 and its involvement in spermatogenesis in tilapia. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 6, Art. 136, 2014.

ZHANG, S.; LI, Y.; SHAO, J.; LIU, H.; WANG, J.; WANG, M.; CHEN, X.; BIAN, W. Functional identification and characterization of IpMSTNa, a novel orthologous myostatin (MSTN) gene in channel catfish *Ictalurus punctatus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, 2020a.

ZHANG, X.; WANG, F.; DONG, Z.; DONG, X.; CHI, J.; CHEN, H.; ZHAO, Q.; LI, K. A new strain of yellow catfish carrying genome edited myostatin alleles exhibits double muscling phenotype with hyperplasia. **Aquaculture**, v. 523, Art. 735187, 2020b.

ZHONG, Z.; NIU, P.; WANG, M.; HUANG, G.; XU, S.; SUN, Y.; XU, X.; HOU, Y.; SUN, X.; YAN, Y.; WANG, H. Targeted disruption of sp7 and myostatin with CRISPR-Cas9 results in severe bone defects and more muscular cells in common carp. **Scientific Reports**, v. 6, Art. 22953, 2016.



Amazônia Ocidental

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

