

Sustentabilidade e Edição Genética – Desafios para a Biologia no Século XXI

Simão Teixeira da Rocha

IX Congresso Associação Portuguesa de Professores de Biologia e Geologia (APPBG)

Coimbra, 27/04/2019

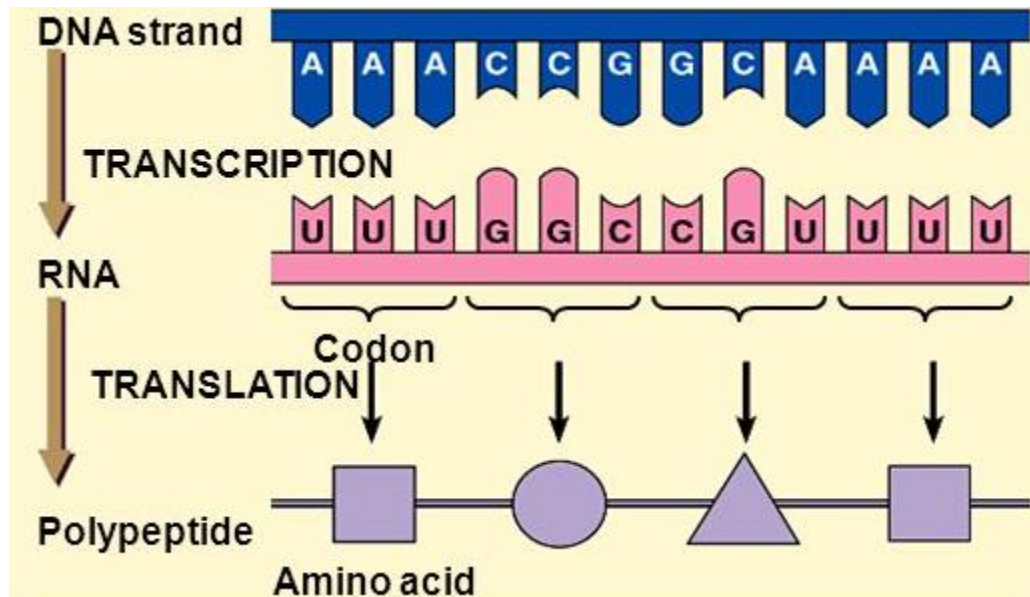
Sumário

- Tecnologias de Edição Genética
- A descoberta da tecnologia CRISPR
- Aplicações da Tecnologia CRISPR
- Potenciais perigos e aspectos éticos associados à Tecnologia CRISPR

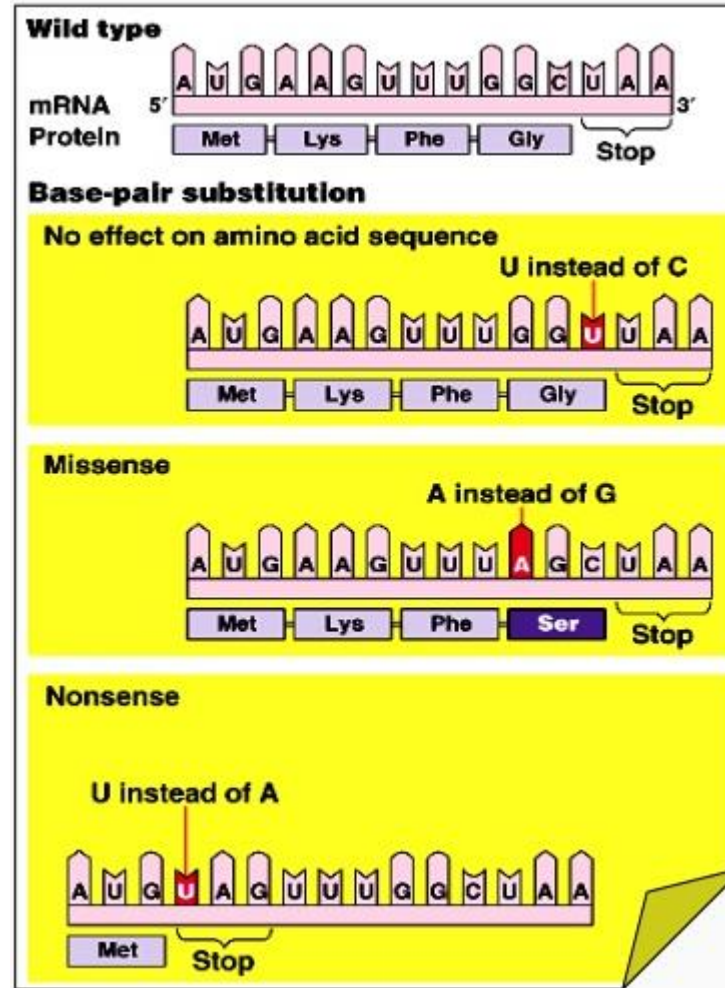
1. Tecnologias de Edição Genética

Mutações estão na base de muitas doenças humanas

O Dogma central da Biologia Molecular



Erros genéticos

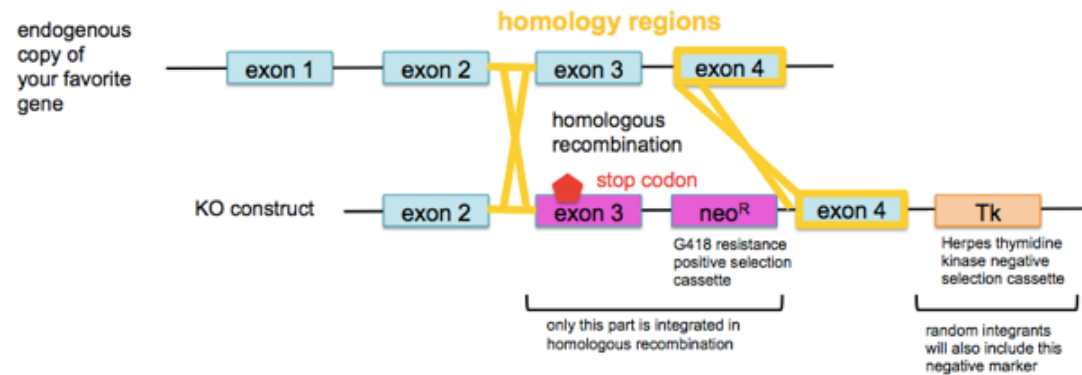


Será possível reverter uma mutação?

Como alterar o genoma em laboratório?

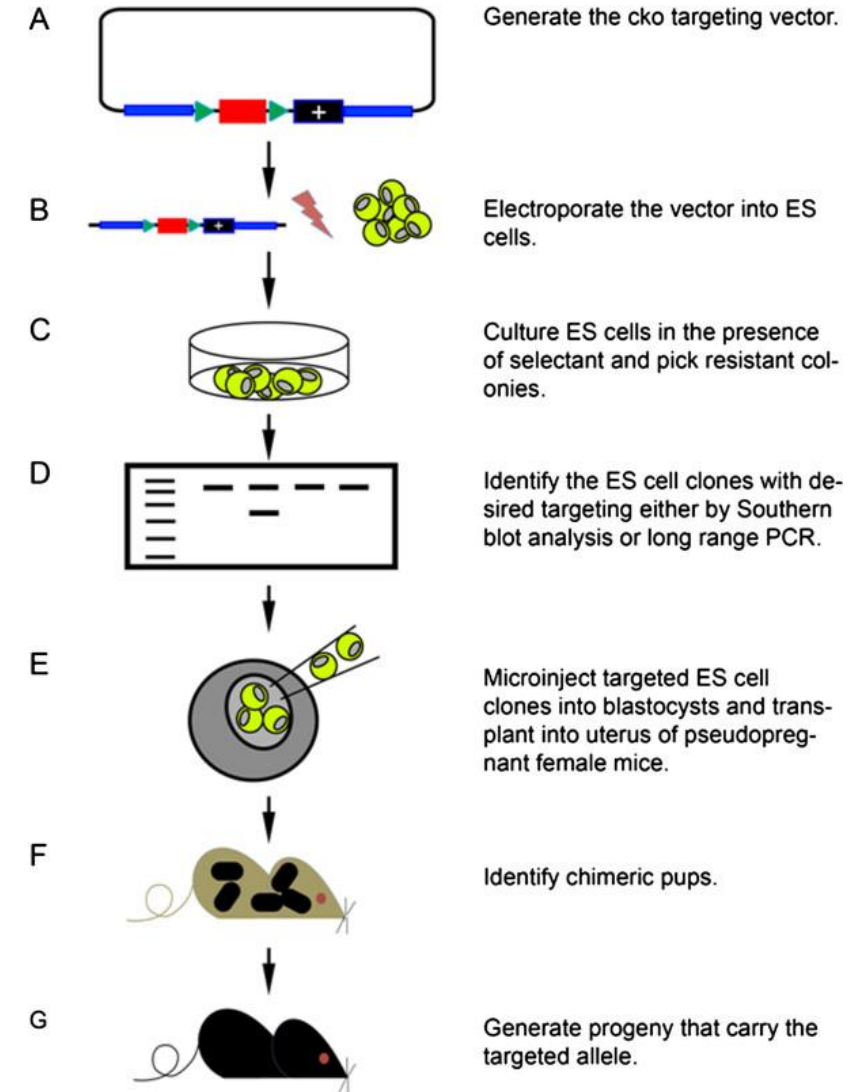
Geração de ratinhos Knock-Out (KO) por recombinação homóloga

How to make a knockout mouse – step 1



➤ PROBLEMA – A recombinação homóloga é demasiadamente ineficiente

Qual a chave para tornar este processo mais eficiente?



Tecnologias de Edição Genética

RESPOSTA: É necessário causar um corte na dupla hélice de DNA de forma específica no locus que se quer alterar

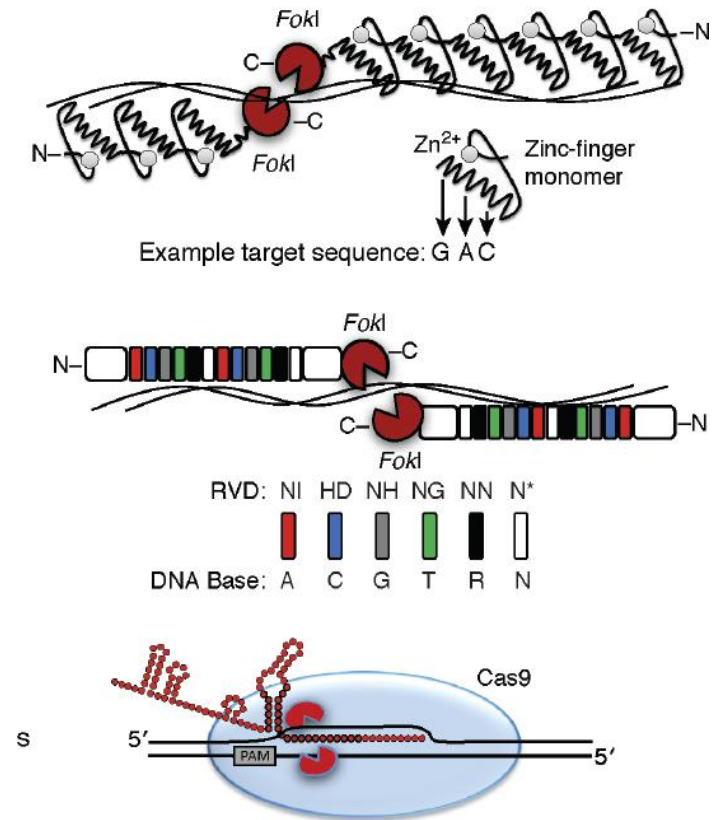
➤ Zinc finger nucleases
(ZNFs)

➤ Transcription activator-like effector nucleases
(TALENs)

Criação de nucleases com domínios proteicos que reconhecem sequências de DNA específicas

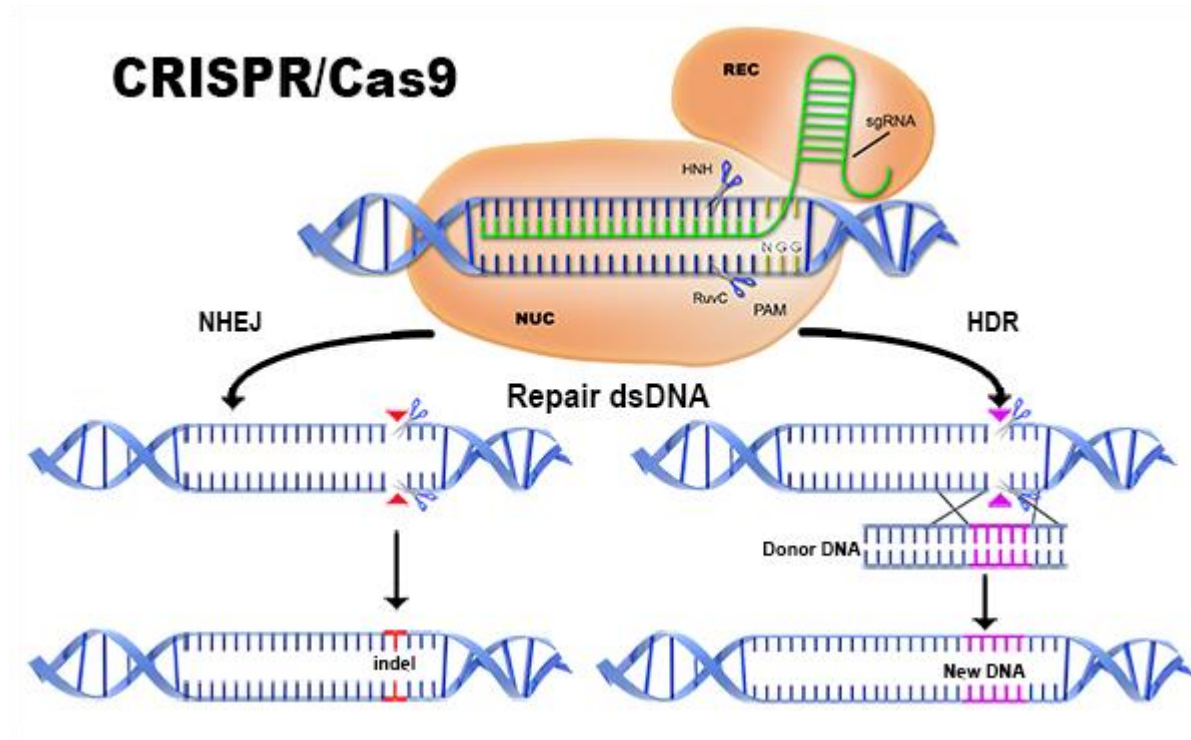
➤ Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats
(CRISPRs)

A mesma nuclease é guiada para uma sequência específica por um RNA complementar (gRNA)



Pela simplicidade e pela eficácia, CRISPR rapidamente se tornou a técnica de eleição para edição genética

O sistema CRISPR



- Existe apenas uma nuclease - Cas9
- A especificidade de ligação ao DNA é conferida por um RNA com sequência complementar ao DNA alvo (RNA guião).
- Após o corte, a dupla hélice do DNA é reparada:
 - (1) NHEJ – Non-homologous end joining: repara o DNA, mas pode causar erros
 - (2) HDR – Homology-directed repair: repara o DNA sem erros

2. A descoberta da tecnologia CRISPR

A descoberta do locus CRISPR

Cientista: Francisco Mojica

Organismo de estudo: *Haloferax mediterranei*;
Arqueobactéria com tolerância extrema ao sal

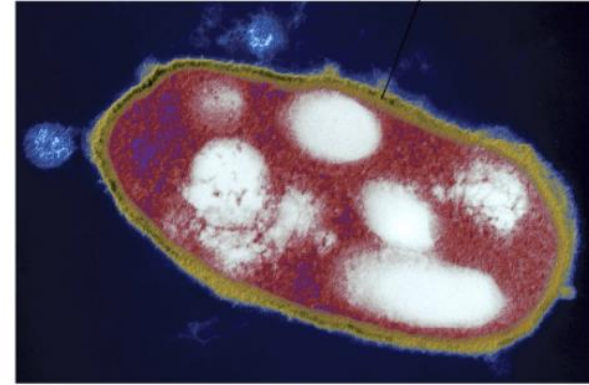
Years: 1993-2005

Descobertas:

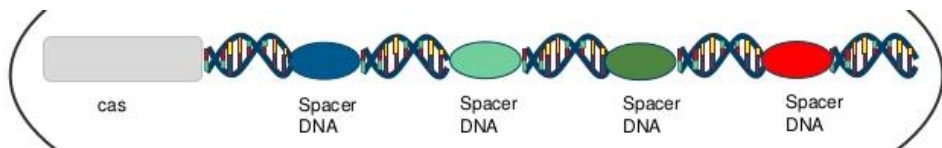
1. Locus CRISPR - Composto por DNA repetitivo intercalado por sequências não repetitivas, denominadas de “spacers”;
2. DNA dos “spacers” correspondia a sequências virais (bacteriófagos)
3. A presença destas sequências conferia resistência aos vírus de onde essas sequências derivaram

Publicação: Rejeitado na *Nature*, *PNAS*,
Molecular Microbiology, *Nucleic Acid Research*

Publicado no *Journal of Molecular Evolution*



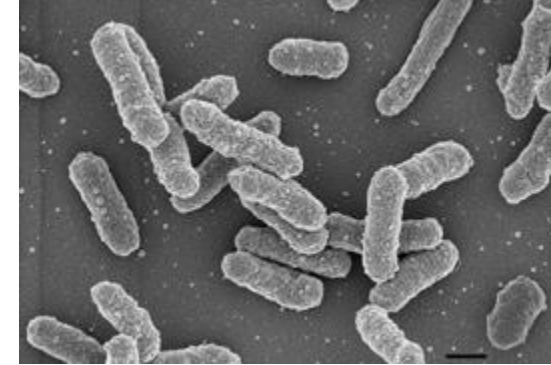
Santa Pola, Costa Blanca, Espanha



CRISPR como um sistema imunitário adquirido em bactérias



Ministério da Defesa Francês, Paris



Cientistas: Gilles Vergnaud /Christine Pourcel

Organismo de estudo: *Yersinia pestis* - amostras de 61 estirpes providas de um surto de peste no Vietname em 1964-1966.

Ano: 2003

Descoberta: As estirpes eram geneticamente idênticas com a exceção do locus do CRISPR onde algumas das estirpes tinham adquirido novas regiões “spacers” no início do locus CRISPR e cujo DNA se assemelha a vírus que infectam estas bactérias

Publicação: *Microbiology*

Evidência experimental para o CRISPR como um sistema de imunidade adaptativo

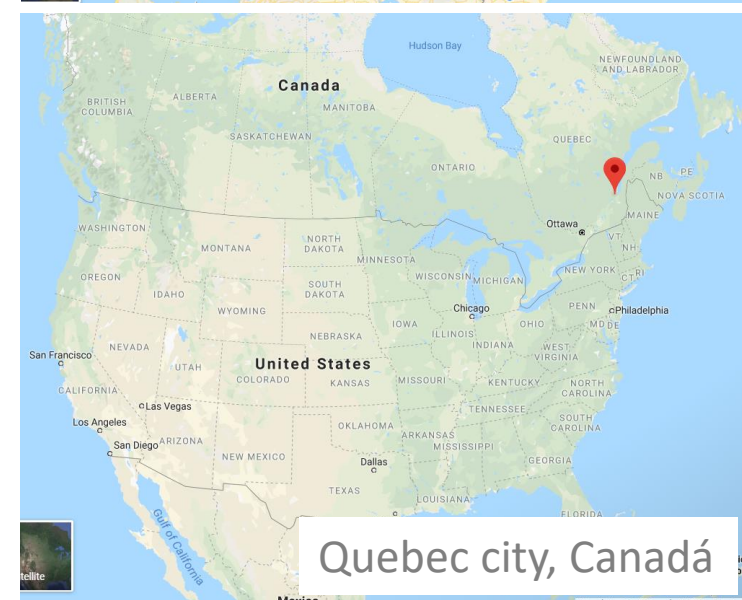
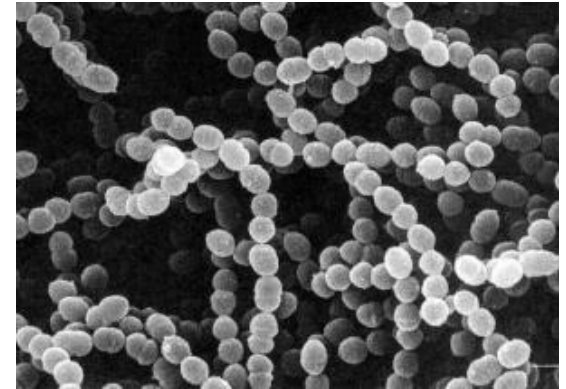
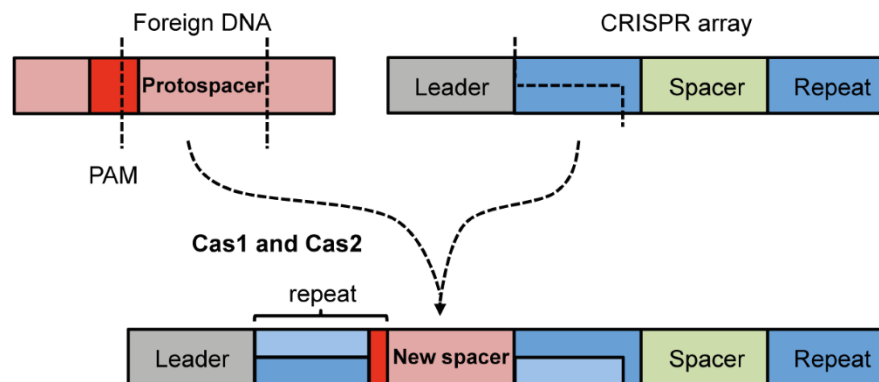
Cientistas: Philippe Horvath /Rodolphe Barrangou (França)
Sylvain Moineau (Canadá)

Organismo de estudo: *Streptococcus thermophilus* – bactéria ácido-láctica

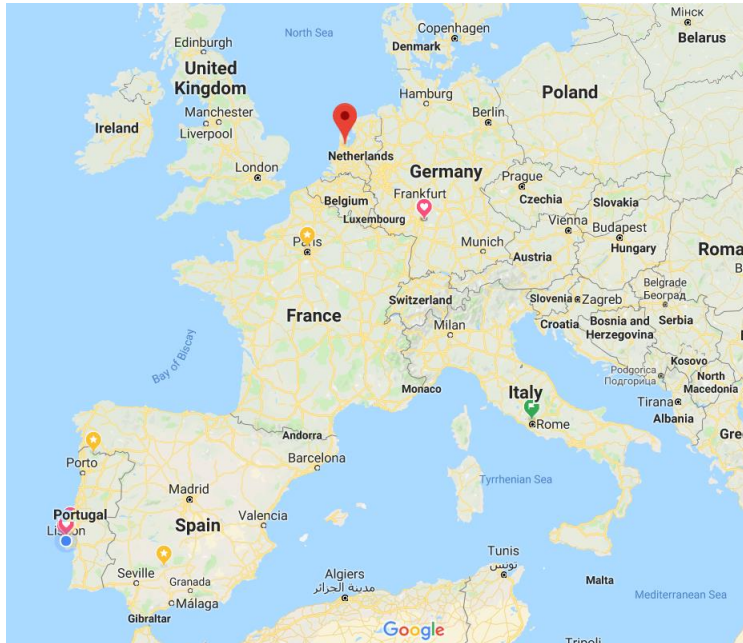
Ano: 2007

Descoberta: Usando uma estirpe de *S. thermophilus* sensível a invasões de bacteriófagos, os investigadores conseguiram isolar uma estirpe resistente e verificaram a inclusão da sequência dos fagos no locus do CRISPR

Publicação: *Science*



Reconstrução do sistema de CRISPR num organismo da mesma espécie



Amesterdão, Holanda

Cientistas: Stan Brouns, John van der Oost

Organismo de estudo: *Escherichia coli* deficiente para o locus CRISPR

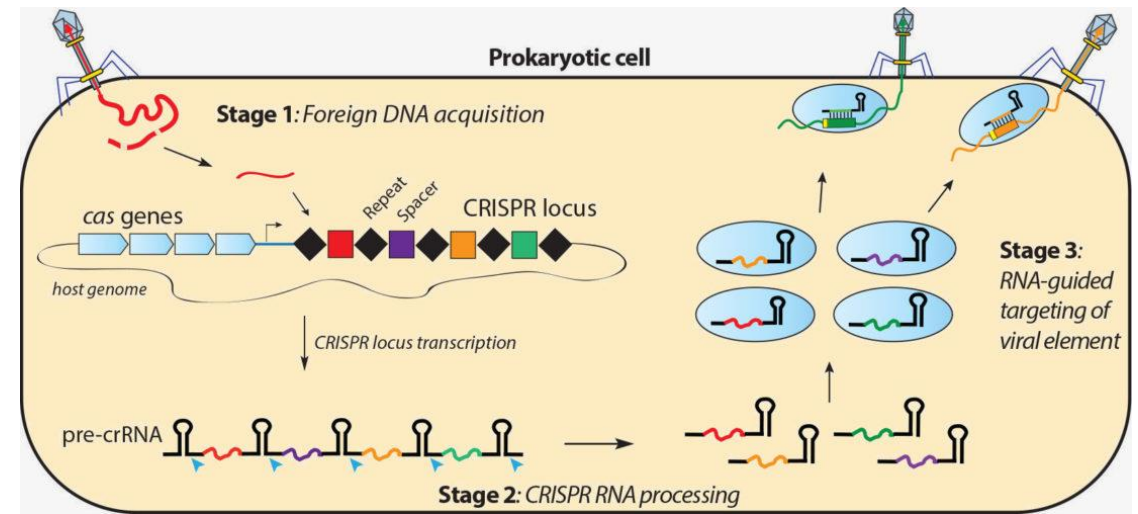
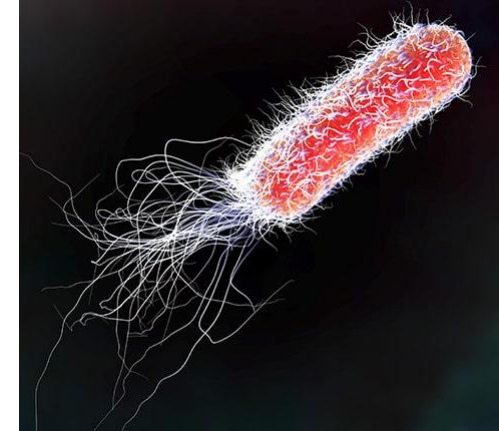
Ano: 2008

Descobertas:

Criação de um locus CRISPR artificial com sequências do fago lambda (λ) em bactérias – que assim se tornaram resistentes a infecções desse vírus

Descoberta do crRNA – Molécula de RNA produzida a partir do locus do CRISPR que contem as repetições e “spacers”.

Publicação: *Science*



O sistema CRISPR actua no DNA e não no RNA



Chicago, Estados Unidos da América

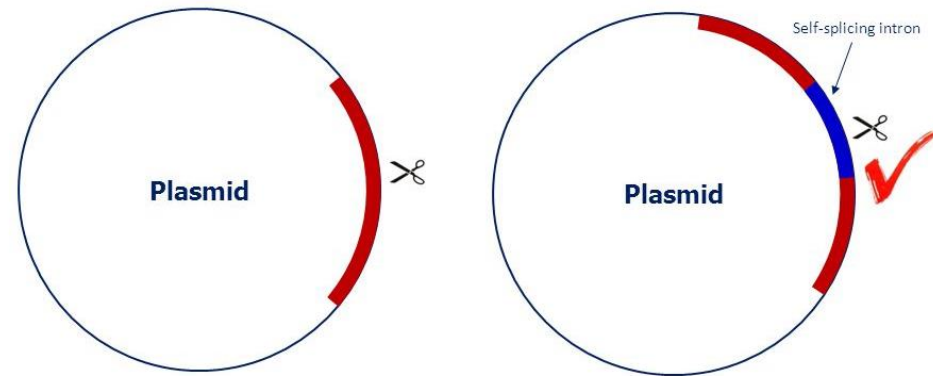
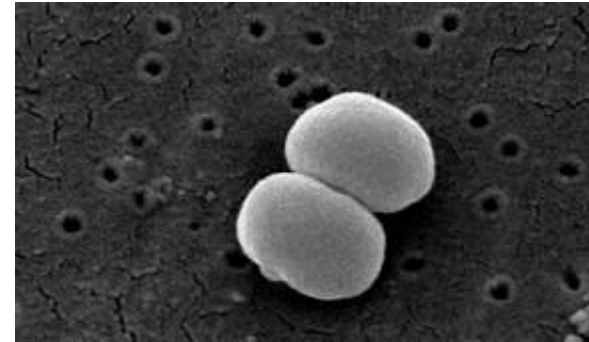
Cientistas: Luciano Marrafini /Erik Sontheimer

Organismo de estudo: *Staphylococcus epidermis*

Ano: 2008

Descoberta: Descobriram que o CRISPR targets DNA em vez de RNA

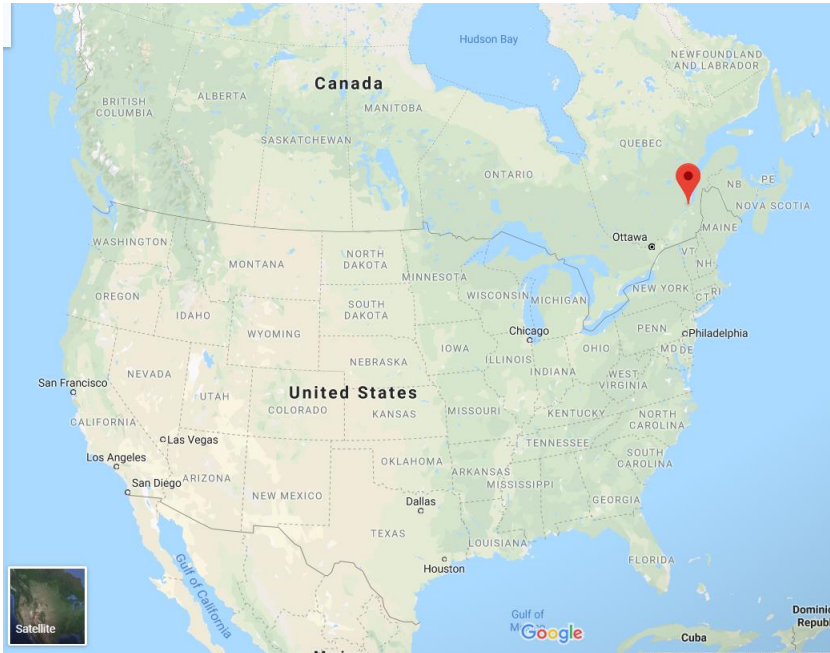
Publicação: *Science*



"From a practical standpoint, ... it's possible to manipulate genomic DNA"

- Marrafini and Sontheimer

O sistema CRISPR corta o DNA numa posição específica



Quebec city, Canadá

Cientistas: Josiane Garneau / Sylvain Moineau

Organismo de estudo: Estirpe de *Streptococcus thermophilus* com um sistema de CRISPR ineficiente

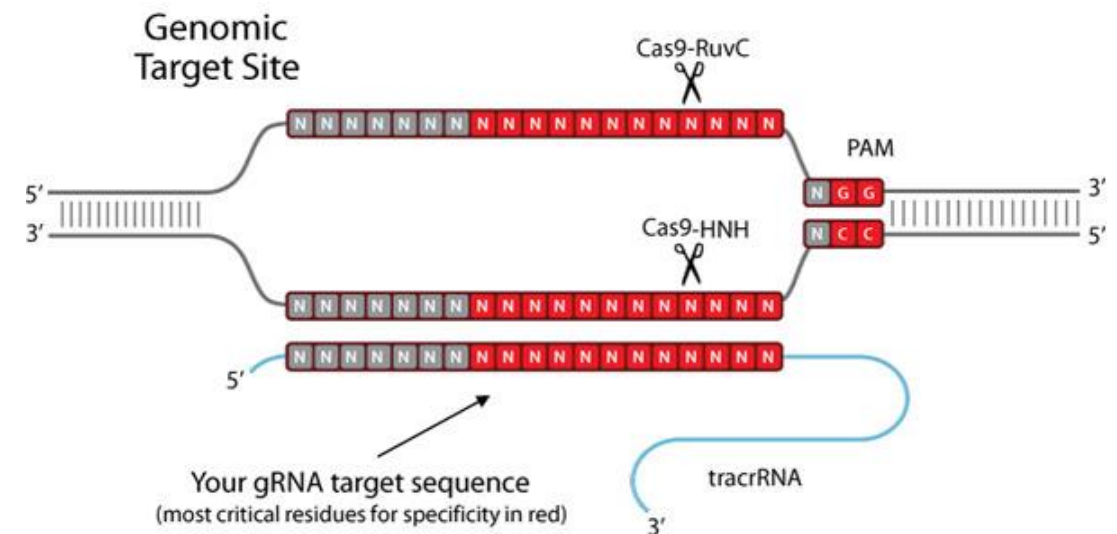
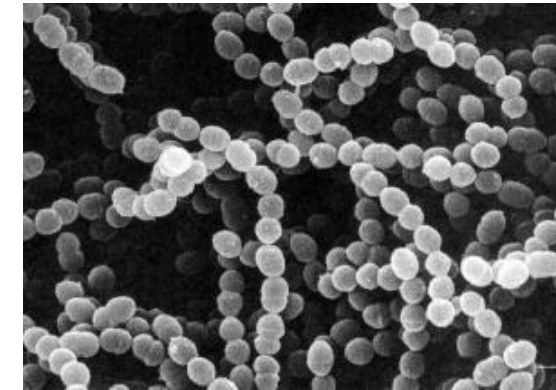
Ano: 2010

Descobertas:

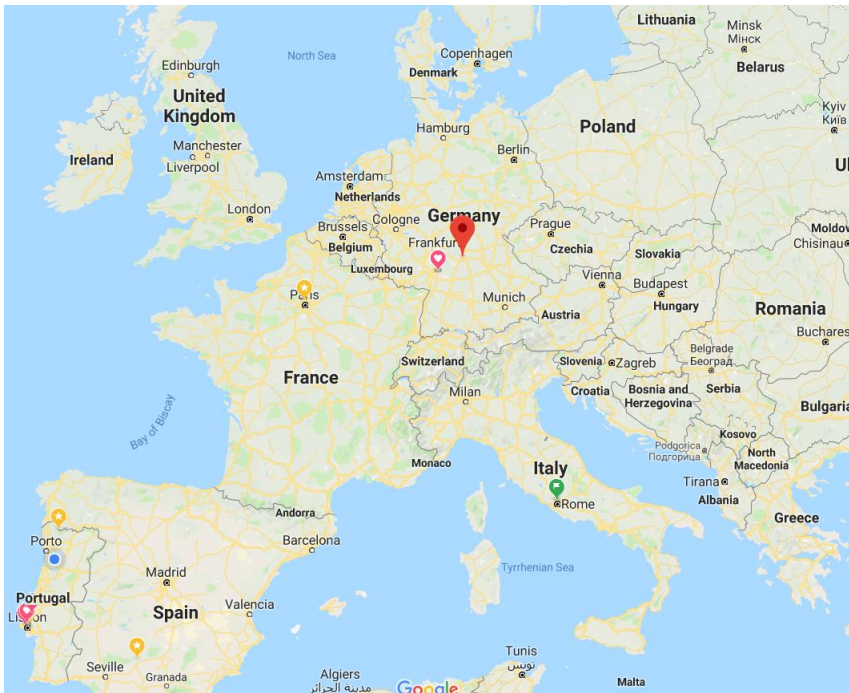
O local do corte do DNA pela maquinaria do CRISPR

A endonuclease que faz o corte é a Cas9

Publicação: *Nature*



Descoberta do tracrRNA



Würzburg, Alemanha

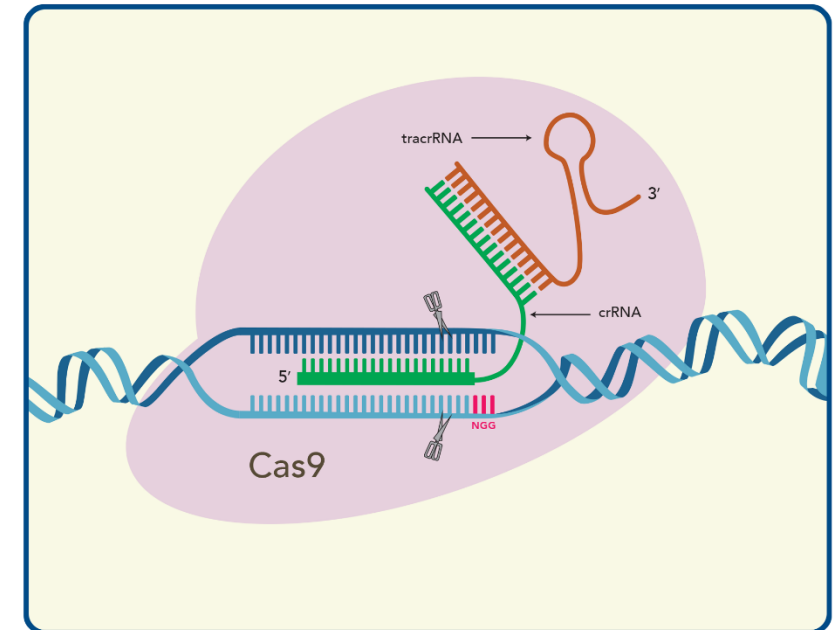
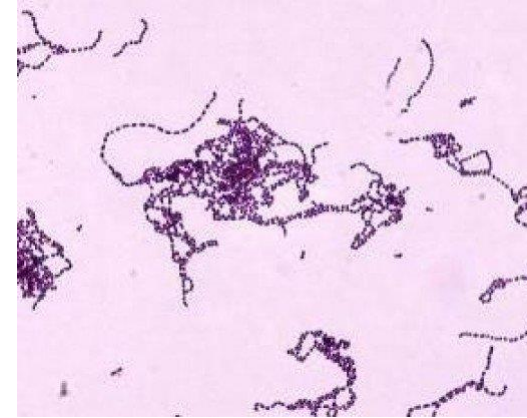
Cientistas: Elitza Delcheva / Emanuelle Charpentier / Jörg Vogel

Organismo de estudo: *Streptococcus pyogenes*

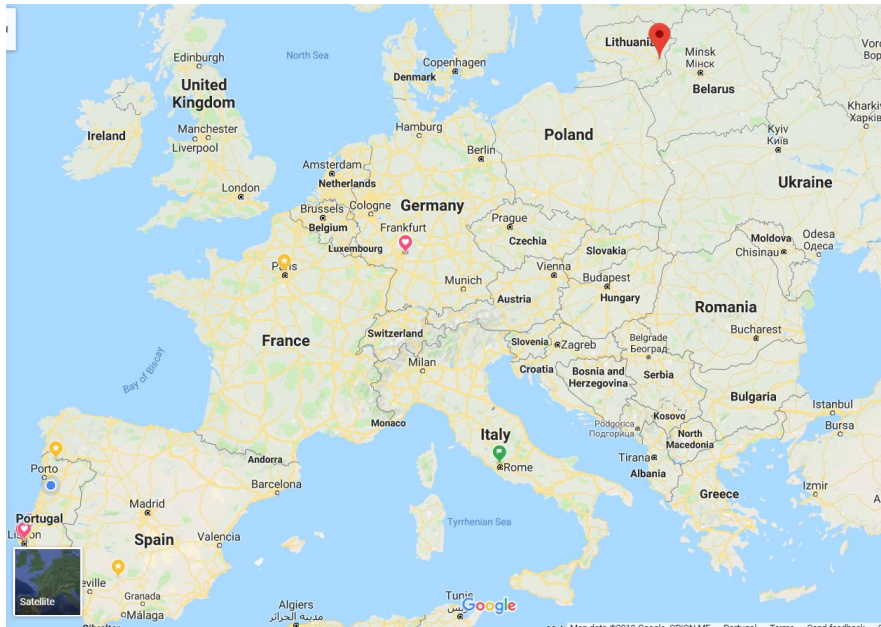
Ano: 2011

Descoberta: Descoberta de um RNA não codificante muito em bactérias que hibridiza com o crRNA e essencial para a clivagem por CRISPR/Cas9

Publicação: *Nature*



Reconstrução do sistema de CRISPR num outro organismo



Vilnius, Lituânia

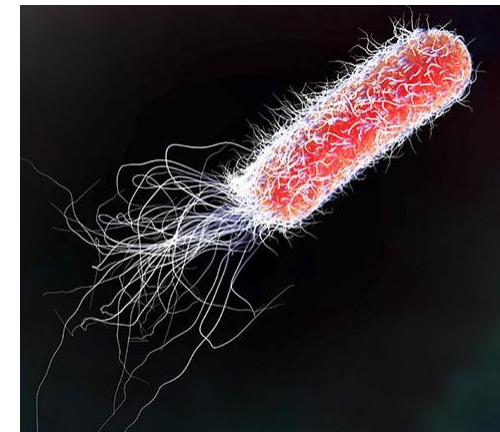
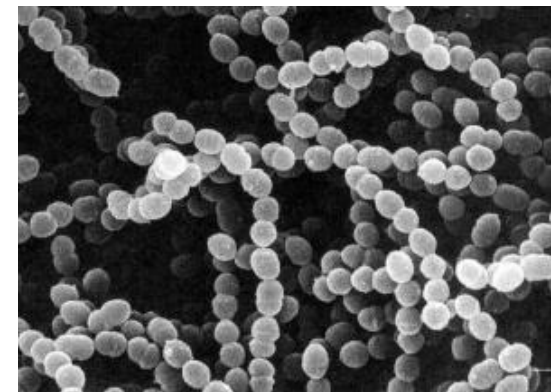
Cientistas: Rimantas Saprunauskas / Virginijus Siksnys

Organismo de estudo: *Streptococcus thermophilus* / *Escherichia coli*

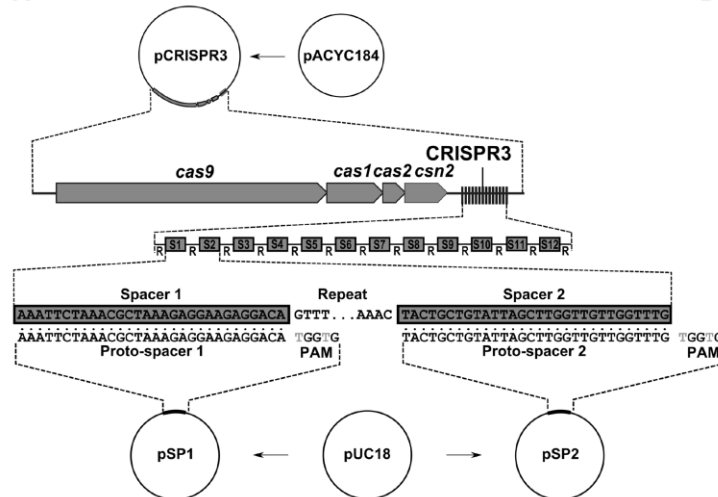
Ano: 2011

Descoberta: Reconstrução do sistema de CRISPR de *S. thermophilus* em *E. coli* confere-lhe imunidade

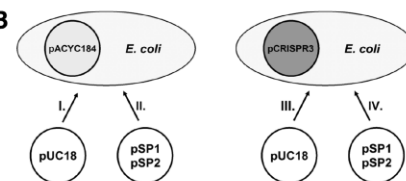
Publicação: *Nucleic Acid Research*



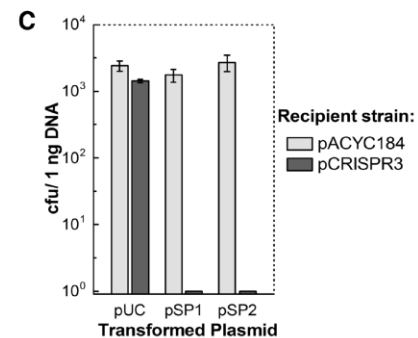
A



B



C

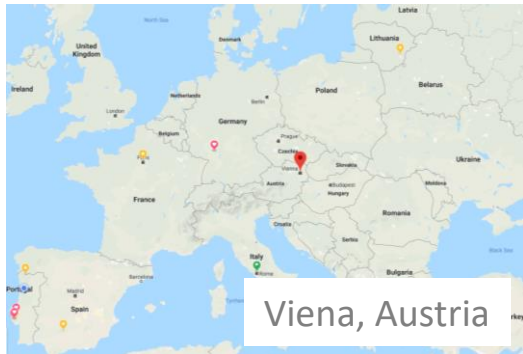


Reconstrução do sistema de CRISPR num tubo de ensaio



Cientistas: Giedrius Gasiunas, Virginijus Siksnys (Vilnius, Lituânia);
Martin Jinek, Emanuelle Charpentier (Viena / Umea - Suécia);
Jennifer Doudna (Berkeley)

Ano: 2012

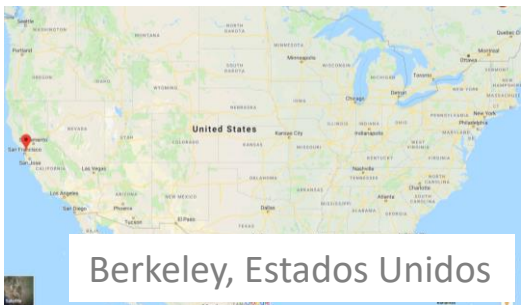


Descobertas:

Reconhecimento da maquinaria mínima para a reconstrução do sistema de CRISPR num tubo de ensaio;

Criação de um RNA híbrido – small-guide RNA (sgRNA) : fusão de tracrRNA and crRNA

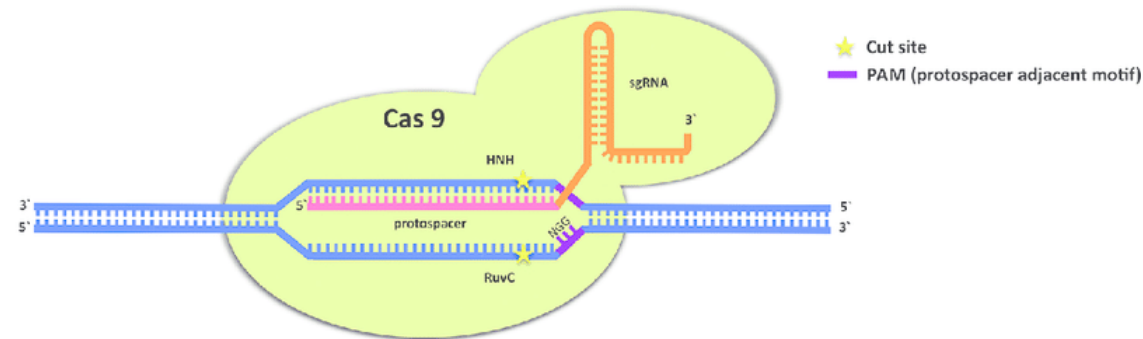
Alteração da sequência do crRNA/sgRNA resulta no corte de uma sequência complementar de DNA sintético



Publicações:

PNAS, Science

Berkeley também escreveu uma patente para garantir os direitos sobre esta descoberta



O uso do CRISPR para efeitos de edição genética em células eucarióticas



Boston, Estados Unidos

Desafios:

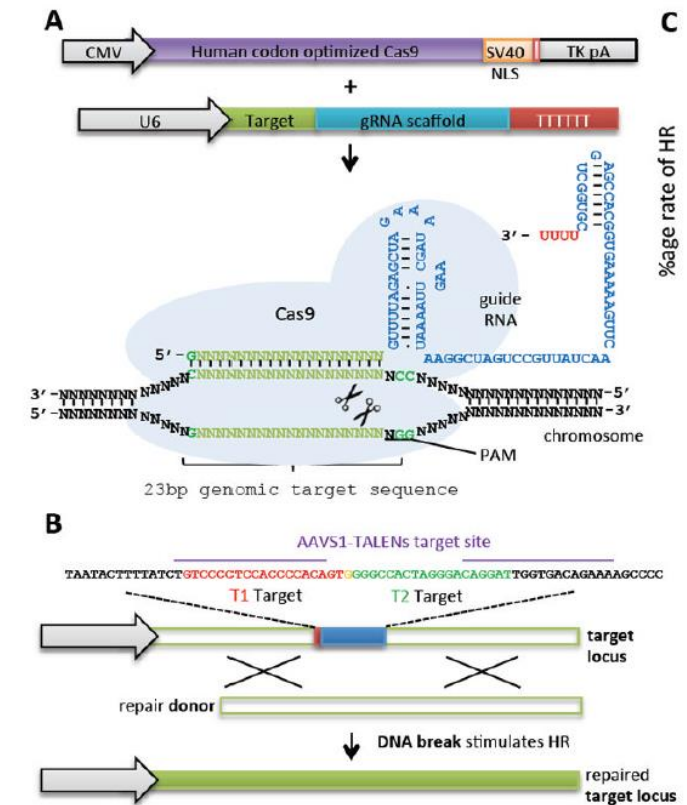
1. Genoma dos eucariotas é consideravelmente maior do que o dos procariotas
2. Genoma dos eucariotas reside no núcleo
3. DNA encontra-se altamente compacto na cromatina

Cientistas: Le Cong, Feng Zhang (Board Institute - MIT)
Prashant Mali, George Church (Harvard)

Ano: 2013

Descoberta: Optimização do sistema de CRISPR para edição genética em células de mamíferos, incluindo de humanos

Publicações: *Science*
Board Institute – MIT
também escreveu uma patente para garantir os direitos sobre esta descoberta



Mali et al., *Science* 2013

A luta pela patente da descoberta do CRISPR como tecnologia de edição genética

Guerra entre “[Berkeley University](#)” e o
“[Broad Institute of Massachussets Institute of Technology](#)”

Principais argumentos:

[Berkeley](#): Submeteram a patente primeiro e dizem que o *Board Institute* se inspirou nas suas descobertas para aplicá-las em células de ratinho e humanos

[Broad Institute - MIT](#): Declaram que a patente submetida inicialmente por Berkeley só descrevia o interesse do uso da técnica em procariotas e não em eucariotas

USPTO (EUA): Concedeu a patente ao *Broad Institute*

Berkeley ainda não desistiu...

INTELLECTUAL PROPERTY

Titanic clash over CRISPR patents turns ugly

Accusations of impropriety feature in escalating dispute.

ADAM ROGERS AND ERIC NIELER SCIENCE 02.16.17 10:15 AM

A PATENT DECISION ON CRISPR GENE EDITING FAVORS MIT

Berkeley strikes back in CRISPR patent tussle

Charlotte Harrison

3. Aplicações da Tecnologia CRISPR

Aplicações da Tecnologia CRISPR

➤ Investigação:

- Manipulação genética de células/animais para o estudo da função de determinado gene
- Criação de modelos animais ou celulares de doenças humanas, incluindo o cancro
- “Screen” genéticos para descobrir genes importantes em determinado processo biológico
- Aumento do número de organismos modelo que se pode usar em investigação

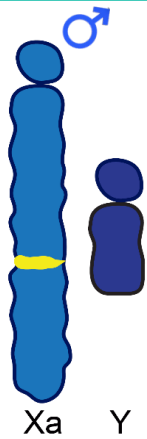
➤ Agricultura:

- Modificação genética de plantas

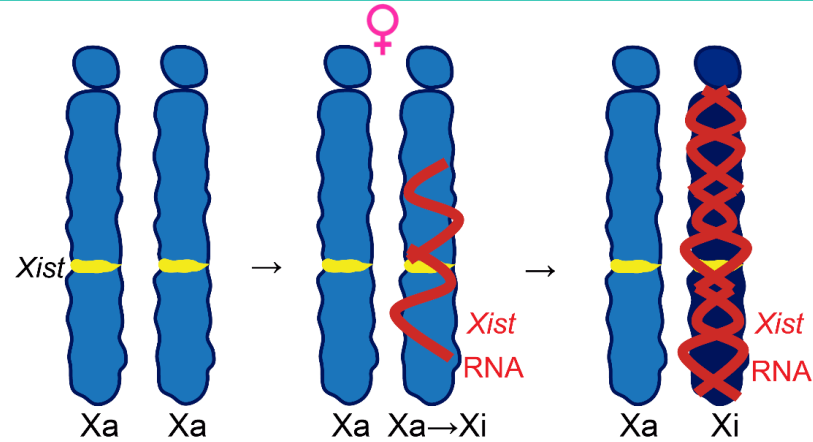
➤ Medicina:

- A potencialidade de modificar o genoma na linha germinativa ou no embrião para reverter mutações que estão nas doenças genéticas

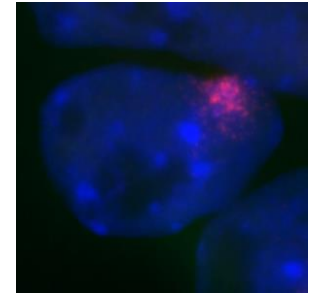
Investigação



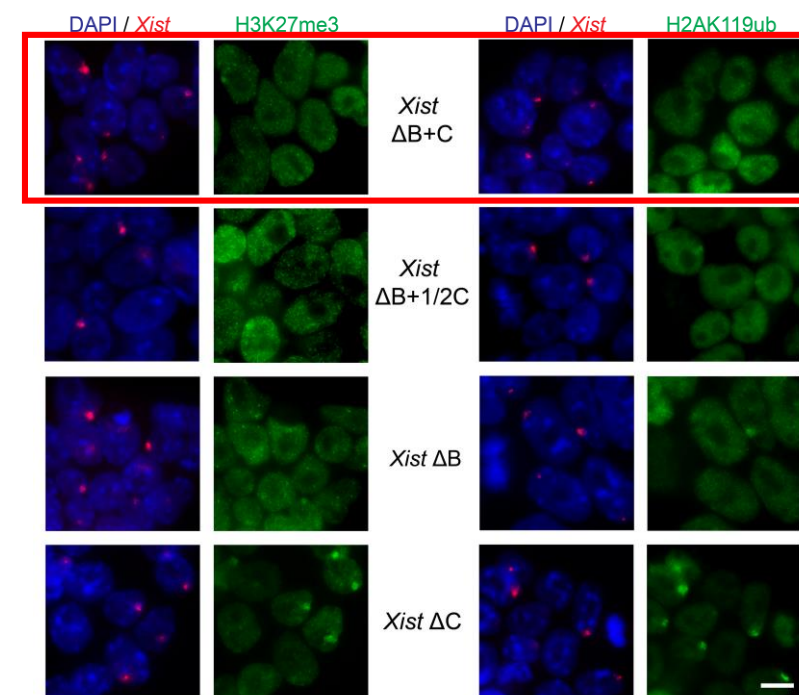
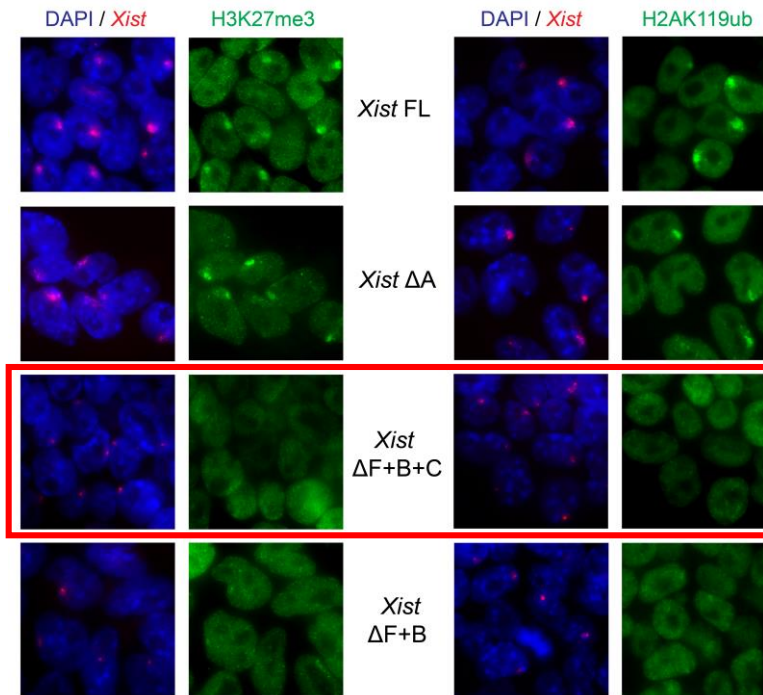
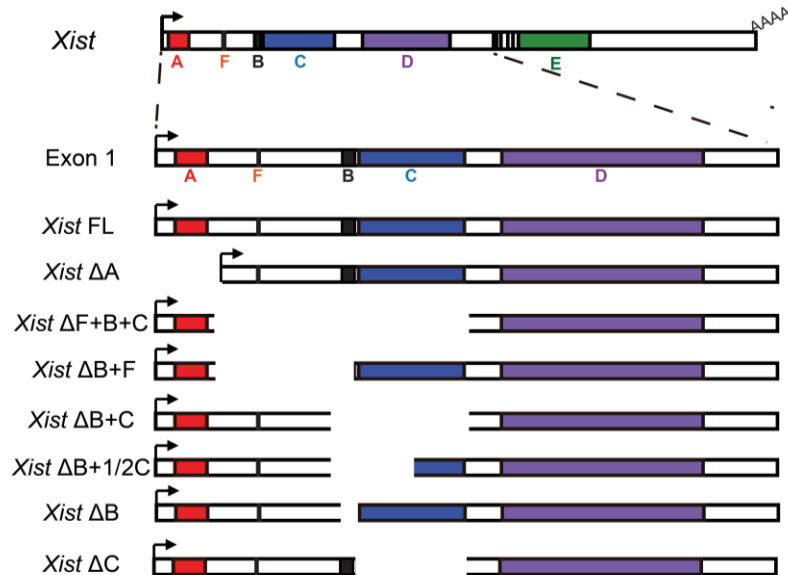
Inactivação do cromossoma X



Xist RNA FISH



Mutantes de *Xist* criados por CRISPR



Agricultura

Here's How

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CRISPR-Cas Works

for advanced plant breeding



DNA

is the instruction manual for the growth and development of all living organisms

/,dē ,en 'ā/
noun BIOCHEMISTRY

deoxyribonucleic acid, a self-replicating material present in all living organisms as the main constituent of chromosomes. It is the carrier of genetic information.

DNA Breaks & Repairs Happen in Nature



SCIENTISTS HAVE DEVELOPED A DEEP UNDERSTANDING OF THE

Genetic & Physical Attributes

WITHIN PLANTS

CRISPR-Cas DIRECTS DNA BREAKS & REPAIRS TO

Create Specific Outcomes



CRISPR-Cas Reads the DNA of a Plant

BASED ON HOW CRISPR-CAS IS PROGRAMMED, IT FINDS A SPECIFIC LOCATION IN THE GENOME AND EITHER:



DELETES



EDITS



REPLACES

TARGETED GENETIC SEQUENCES

Grower & Consumer Benefits



Better Nutrition



Longer Shelf Life



Disease Resistance



Drought Tolerance



Higher Yields



More Efficient Development of Healthy Seed Products

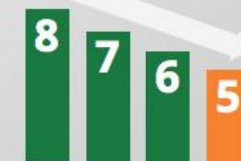
From Multiple Cycles



To 1-2 Cycles



Reduced Timeline in Years



SAME FIELD TESTING

crisprcas.pioneer.com

Medicina



Experiência: Indução de mutação no gene para o receptor CCR5 importante para a entrada do vírus da sida (e presente em 10% da população Europeia com resistência ao HIV); A mutação foi induzida num genoma saudável de modo a evitar a transmissão do vírus da sida do pai VIH+ para a(s) filha(s)

Cientista: He Jiankui

Organismo: Duas irmãs gémeas

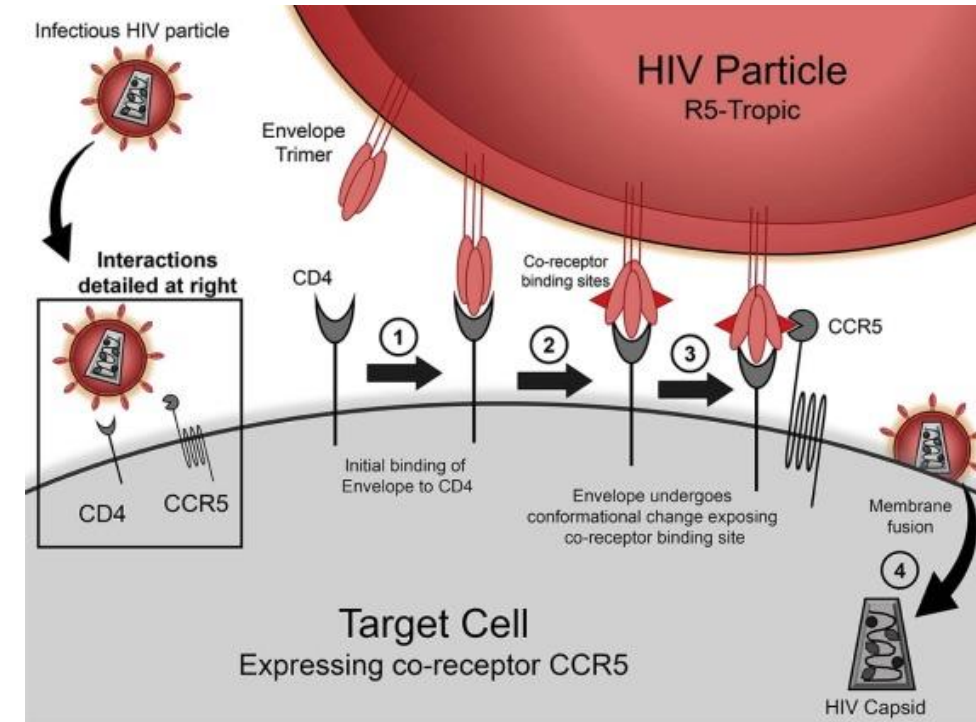
Data: 26 de Novembro de 2018

Descoberta: Suposto nascimento de duas bebés cujo genoma foi editado por CRISPR/Cas9

Conferência: 2nd International Summit on Human Genome Editing in Hong Kong

Críticas:

- (1) Existem outros métodos eficazes que previnem a transmissão do vírus de pais para filhos
- (2) A via do CCR5 não é a única porta de entrada para o vírus da sida
- (3) Mutações no CCR5 poderão ter consequências imprevistas no sistema imunitário destas crianças
- (4) A tecnologia de CRISPR não está ausente de potenciais perigos e erros
- (5) Aspectos éticos não foram tidos em conta



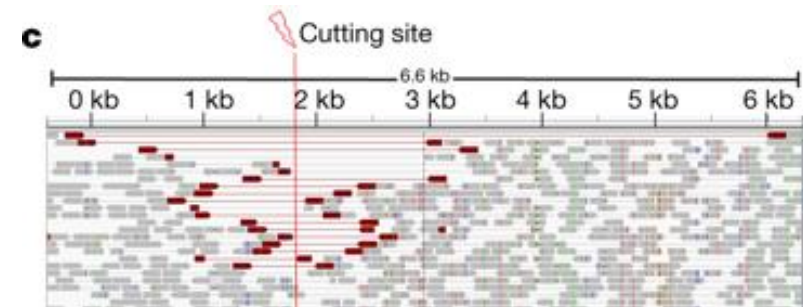
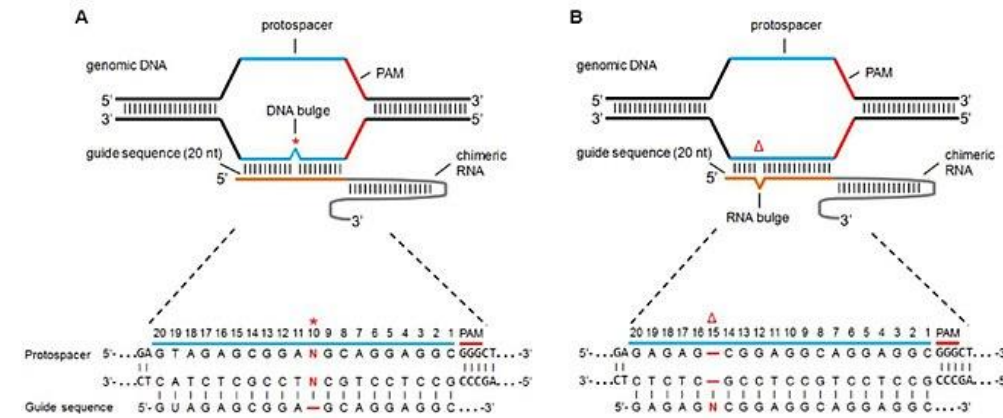
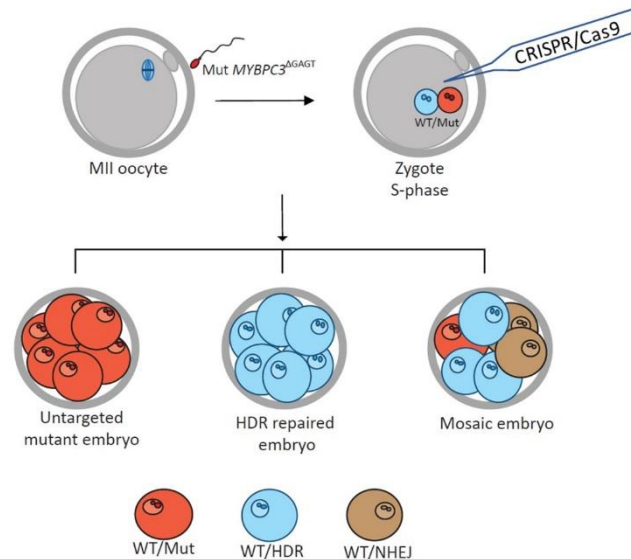
4. Potenciais perigos e aspectos éticos associados à Tecnologia CRISPR

Problemas associados à técnica de CRISPR

1. Edição genética fora do alvo

2. Mosaicismo

3. Deleções imprevisíveis



A experiência de He Jiankui e a controvérsia sobre alguma convivência

O que levou He Jiankui a seguir com as suas experiências na criação dos bebés CRISPR?

- A primeira experiência de edição do genoma de embriões humanos já tinha sido testada e publicada
- Influência de cientistas de renome americanos e britânicos
 - [Nuffield Council on Bioethics](#) (Comité britânico de Ética) em Julho 2018 – *“there are moral reasons to continue with present lines of Research and to secure the conditions under which heritable genome editing would be permissible”*
 - [Contactos com Stanford University](#) – He Jiankui foi um pós-doutorando na Universidade de Stanford e supostamente terá mantido contactos com vários cientistas sobre as suas experiências na China; no início deste ano, Stanford ilibou os seus trabalhadores dessa suspeições
- Elevada pressão da comunidade científica para descobertas inovadoras num ambiente competitivo

Aspectos éticos e edição genética

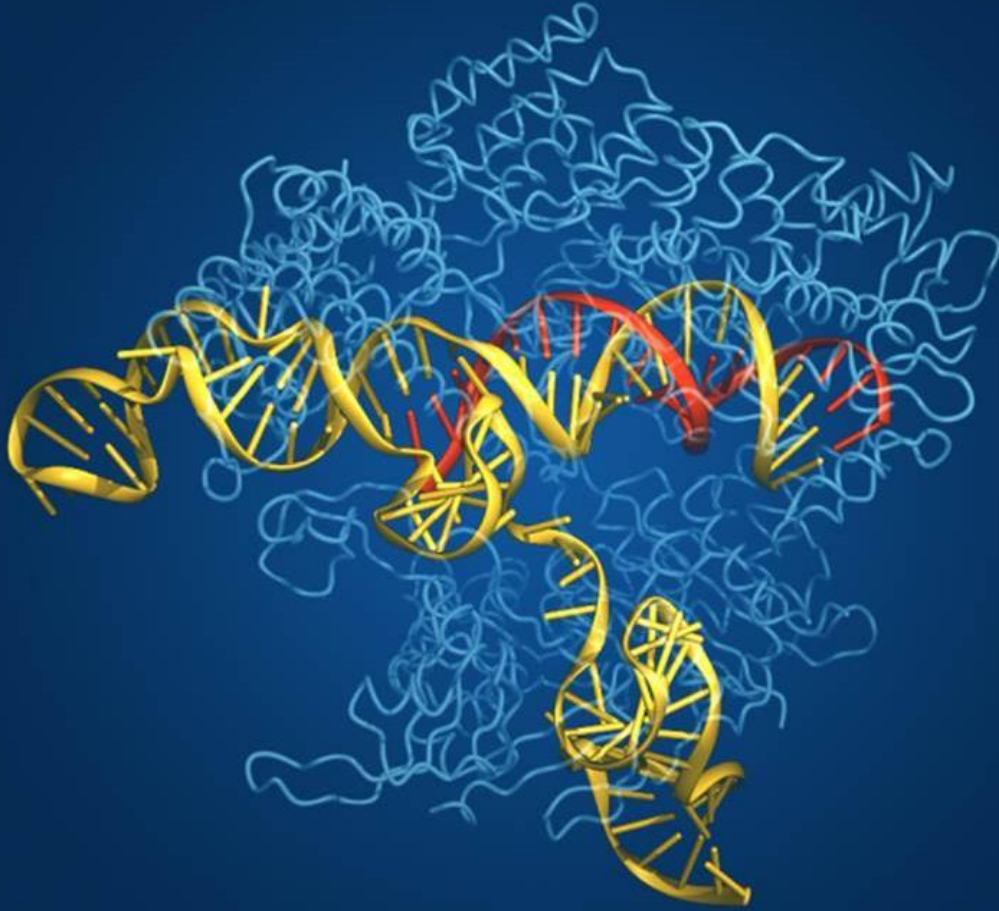
Declaração sobre o genoma e direitos humanos da UNESCO e a Convenção Europeia para os Direitos Humanos e Biomedicina desencorajam ou proíbem a aplicação clínica da edição genética em embriões humanos para fins de procriação

Como respostas às experiências de He Jiankui, vieram dois tipos de visões:

- (1) Um grupo de investigadores (incluindo alguns inventores do CRISPR) e comités de ética pediram um “*período de tempo em que nenhum uso de edição genética para fins procriativos fosse permitida*” (E. S. Lander *et al. Nature* **567**, 165–168; 2019)
- (2) A Academia Nacional da Medicina e das Ciências dos EUA e a “Royal Society” britânica, por outro lado, opuseram-se a tal visão para argumentar que “*we must achieve broad societal consensus before making any decisions, given the global implications of heritable genome editing*” (V. J. Dzau *et al. Nature* **567**, 175; 2019).

Numa tentativa para apaziguar estas duas visões de certa forma opostas, o conselho consultivo da Organização Mundial da Saúde decidiu intervir neste debate para dizer que se deveria tornar necessário o registro de todos os estudos que envolvam edição do genoma humano antes de dar directrizes mais fundamentadas sobre o procedimentos éticos a cumprir no futuro para este tipo de experiências

Muito obrigado



CRISPR/Cas9
gene editing system