

ib

butantan

USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



XV SIMPÓSIO DE BIOSSEGURANÇA E SEGURANÇA QUÍMICA E  
BIOLÓGICA EM INSTITUIÇÕES DE ENSINO E PESQUISA

# "Edição de genomas, direcionamento gênico e biossegurança"

Paulo Lee Ho ([paulo.ho@butantan.gov.br](mailto:paulo.ho@butantan.gov.br))

Diretor

Laboratório Especial de Inovação e Desenvolvimento Industrial  
Instituto Butantan

Abril 2016

# Novas Técnicas de Edição Genética

---

## Engenharia Genética de Precisão:

**Metodologias que permitem  
a modificação de uma sequência genômica de forma precisa,  
específica e sítio dirigida**

**Potencial infinito, necessidade de uma regulação especial?  
Por que?**

# Etapas

---

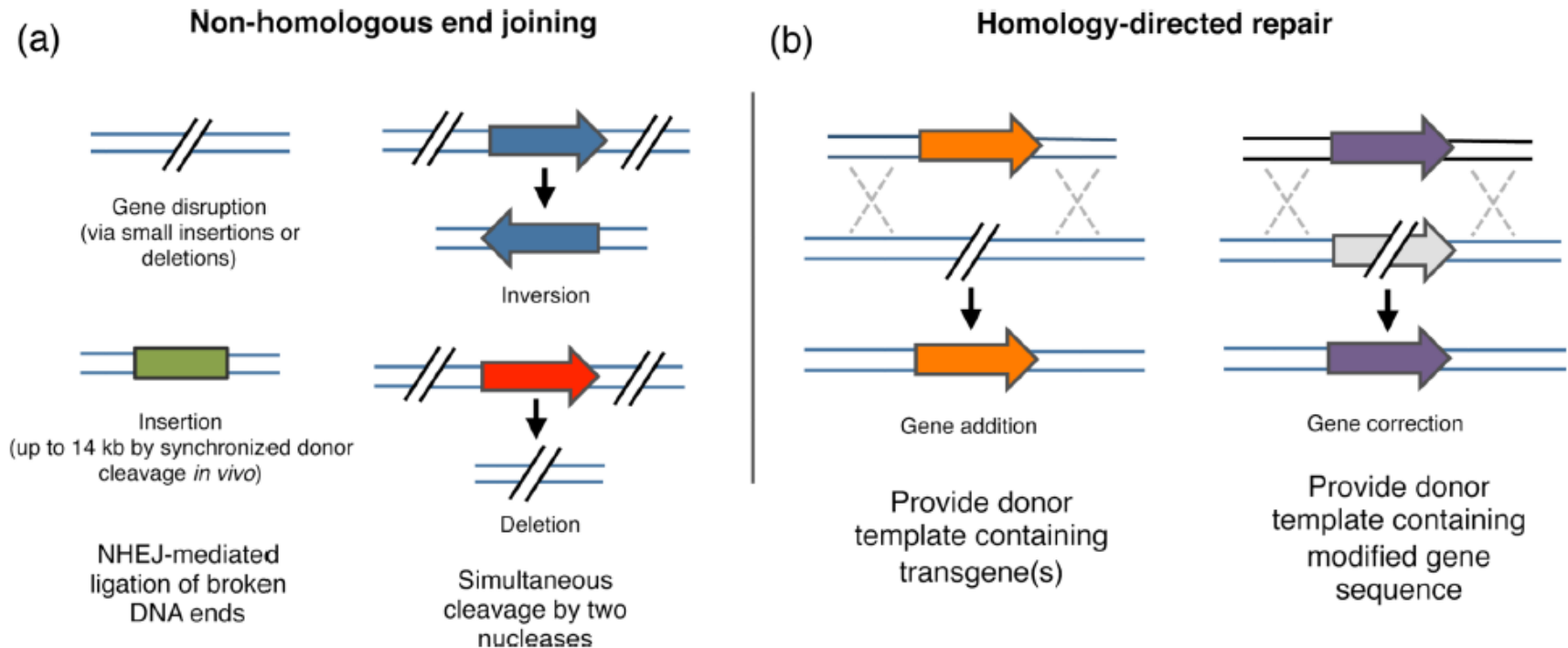
- 1- Dupla quebra do DNA na região desejada (Double strand breaks, DSB):**
  - a) Junções de extremidades não homólogas ou
  - b) Recombinação homóloga
  
- 2- Junção de extremidades não homólogas (Non-homologous end joining, NHEJ):**

Reparo do DNA com propensão a erros Dependendo do que se deseja, pode ocorrer inserções ou deleções (Indels).

Em geral o gene não fica funcional por problemas de fase de leitura.
  
- 3- As tecnologias permitem hoje a substituição e edição de genomas por mecanismo de recombinação homóloga (Homologous recombination, HR)**

O gene fica funcional, ao contrário quando ocorre Indels.

# Reparo no DNA por mecanismos não homólogos e homólogos



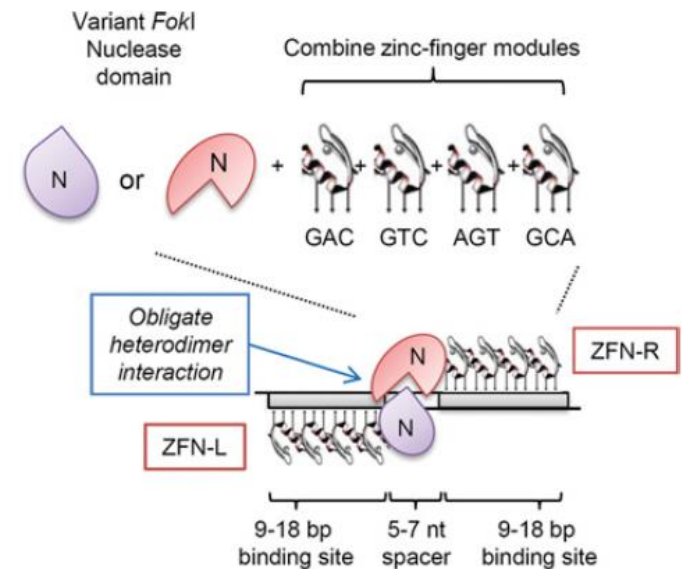
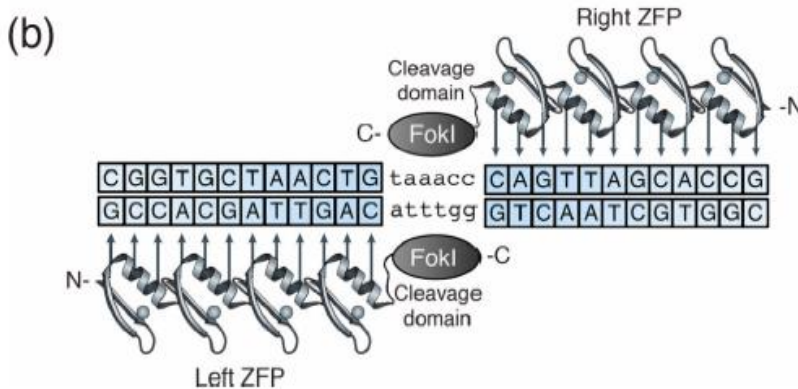
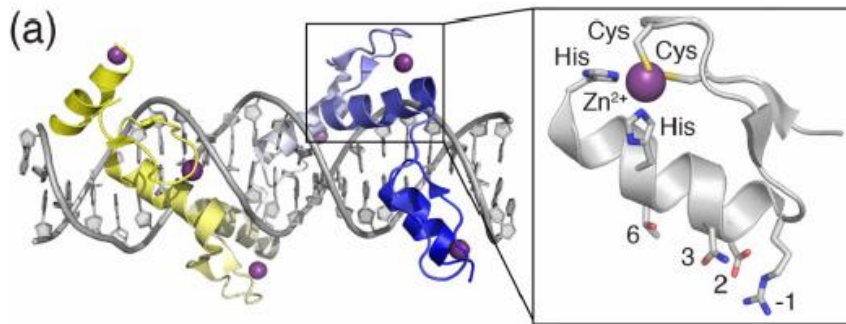
**Figure 2. Overview of possible genome editing outcomes using site-specific nucleases**  
 Nuclease-induced DNA double-strand breaks (DSBs) can be repaired by homology-directed repair (HDR) or error-prone non-homologous end joining (NHEJ). **(a)** In the presence of donor plasmid with extended homology arms, HDR can lead to the introduction of single or multiple transgenes to correct or replace existing genes. **(b)** In the absence of donor plasmid, NHEJ-mediated repair yields small insertion or deletion mutations at the target that cause gene disruption. In the presence of double-stranded oligonucleotides or *in vivo* linearized donor plasmid, DNA fragments up to 14 kb have been inserted via NHEJ-mediated ligation. Simultaneous induction of two DSBs can lead to deletions, inversions and translocations of the intervening segment.

# Zinc finger nucleases

2 domínios: domínio nuclease e domínio de ligação (baseado em fatores de transcrição com domínio zinc fingers)

Domínio de ligação: - reconhece de forma específica 3 nucleotídios  
 - construção de "arrays" dos domínios de ligação permite o reconhecimento específico de seqüências

Nuclease Fok I: domínio de ligação ao DNA mais domínio nuclease não específico, cortando a 9 e 13 nt após seqüência de reconhecimento. Ativado por dimerização



**Figure 1** Target sequence recognition and specificity of ZFNs

N, nuclease domain; ZFN-L, left ZFN; ZFN-R, right ZFN.

# TALENs (Transcriptional activators like effectors nucleases)

TALEs são proteínas identificadas em bactérias *Xanthomonas* que possuem um domínio de ligação a DNA composto de uma série de repetições de 33-35 aas. Cada repetição de 33-35 aas reconhece um nucleotídeo específico. TALENs é um TALE acrescido do domínio nuclease Fok I.

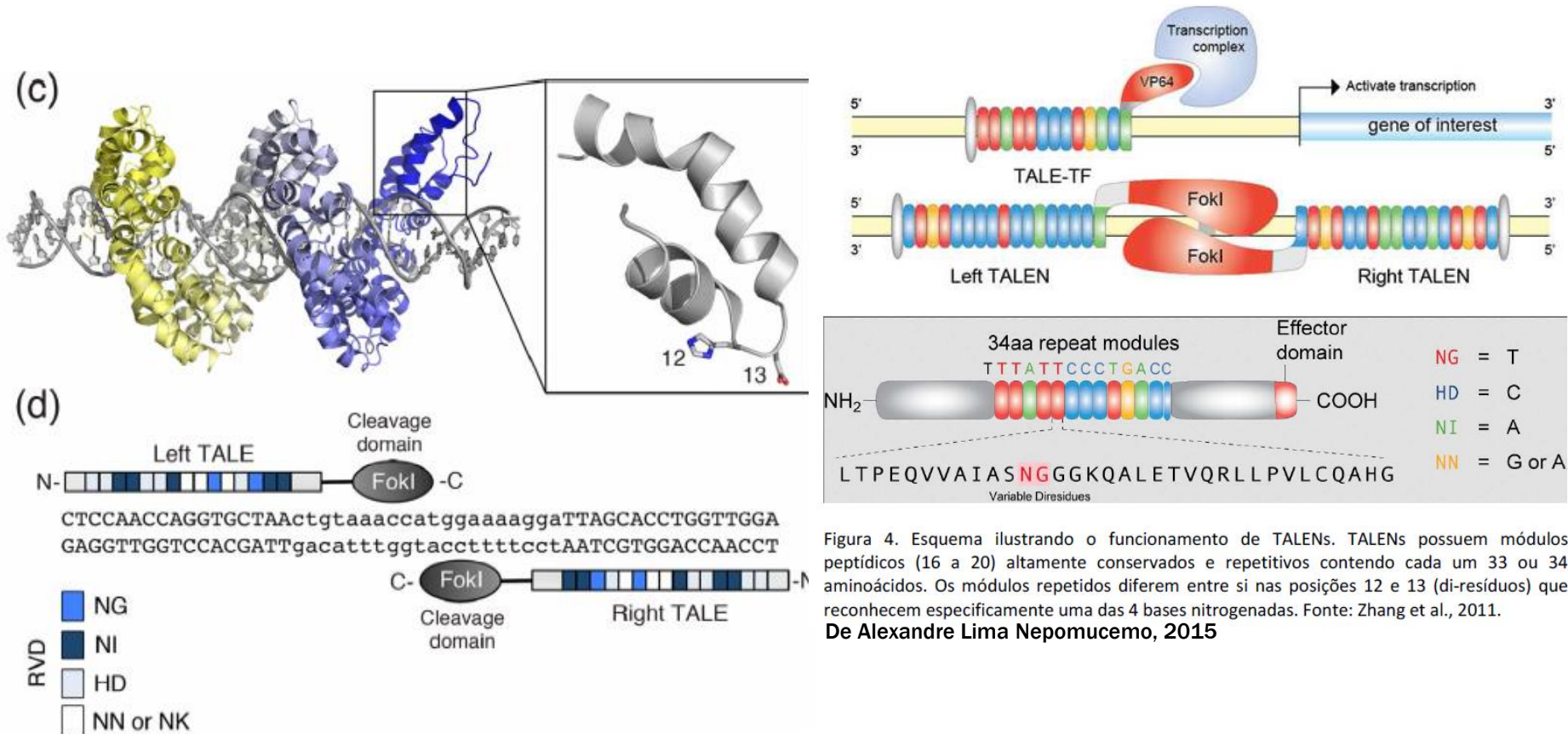


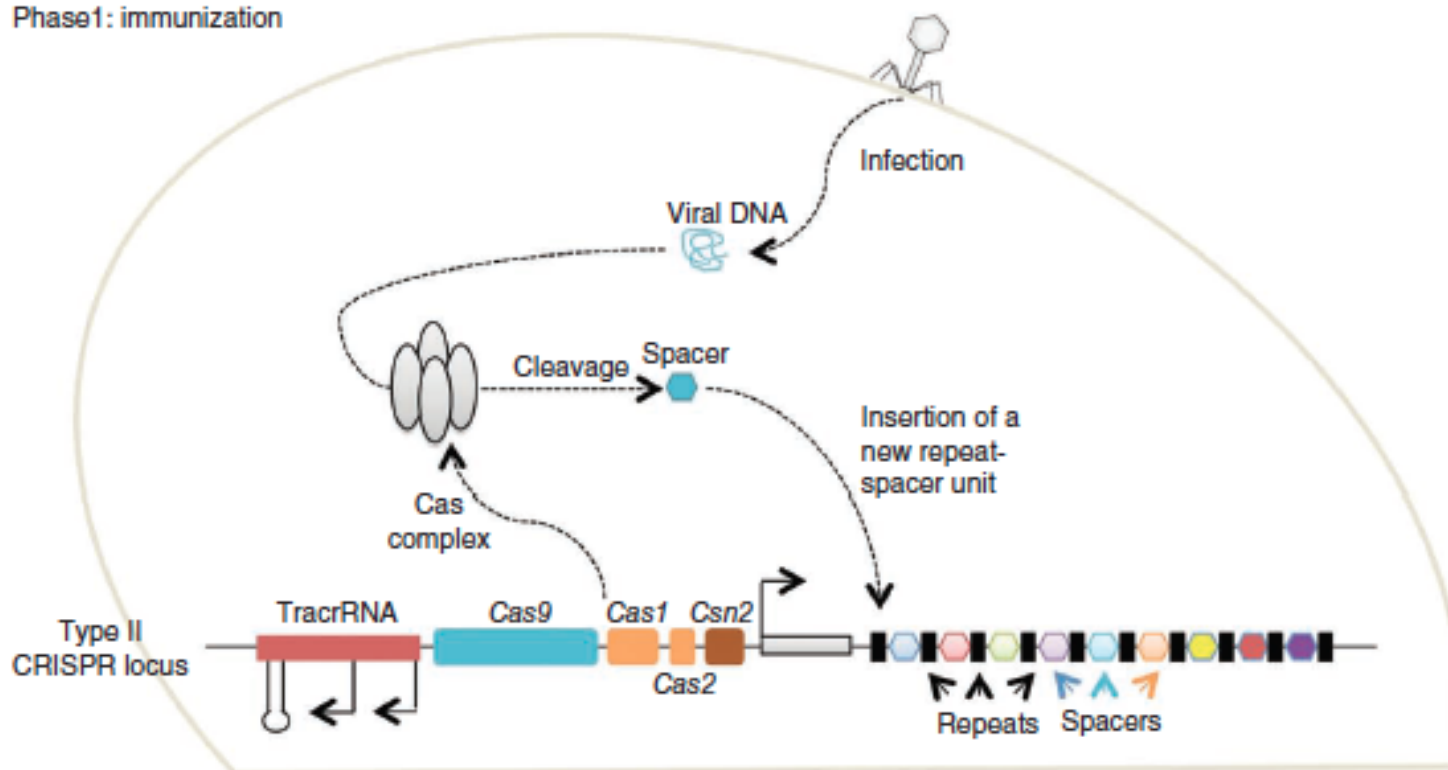
Figura 4. Esquema ilustrando o funcionamento de TALENs. TALENs possuem módulos peptídicos (16 a 20) altamente conservados e repetitivos contendo cada um 33 ou 34 aminoácidos. Os módulos repetidos diferem entre si nas posições 12 e 13 (di-resíduos) que reconhecem especificamente uma das 4 bases nitrogenadas. Fonte: Zhang et al., 2011. De Alexandre Lima Nepomuceno, 2015



# Edição de genomas por CRISPR-Cas9

Bactéria tem sistema imune adaptativo contra fagos!  
CRISPR - Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats

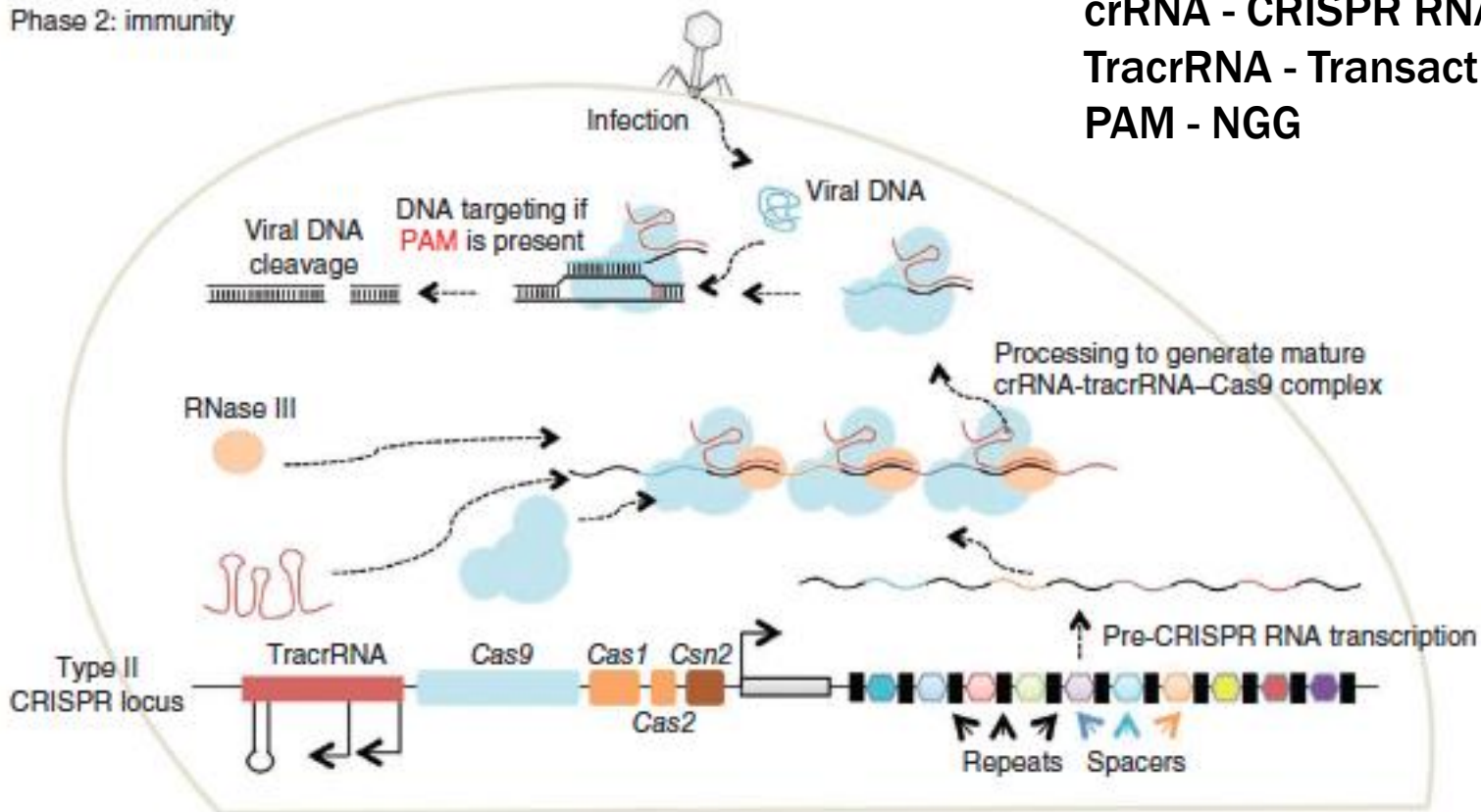
Phase 1: immunization



# Edição de genomas por CRISPR-Cas9

gRNA - RNA guia  
 crRNA - CRISPR RNA  
 TracrRNA - Transactivator crRNA  
 PAM - NGG

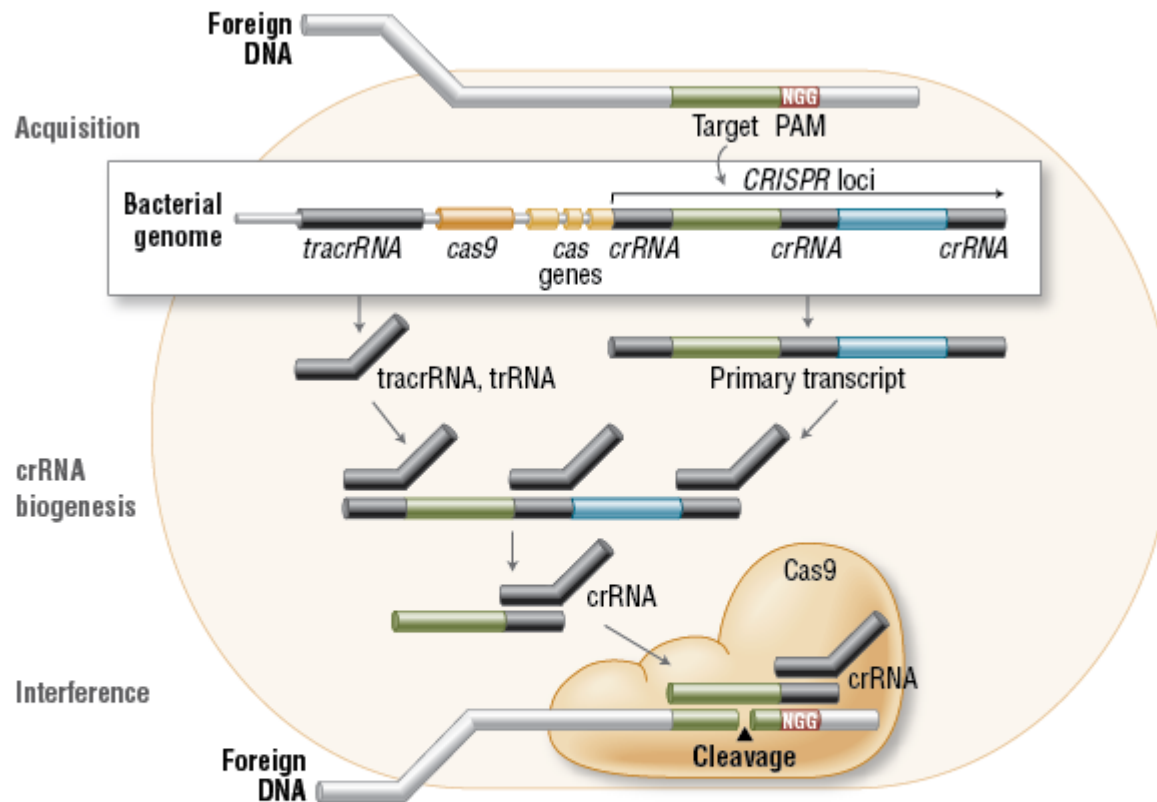
Phase 2: immunity





# Edição de genomas por CRISPR-Cas9

Figure 1. Cas9 *in vivo*: Bacterial Adaptive Immunity

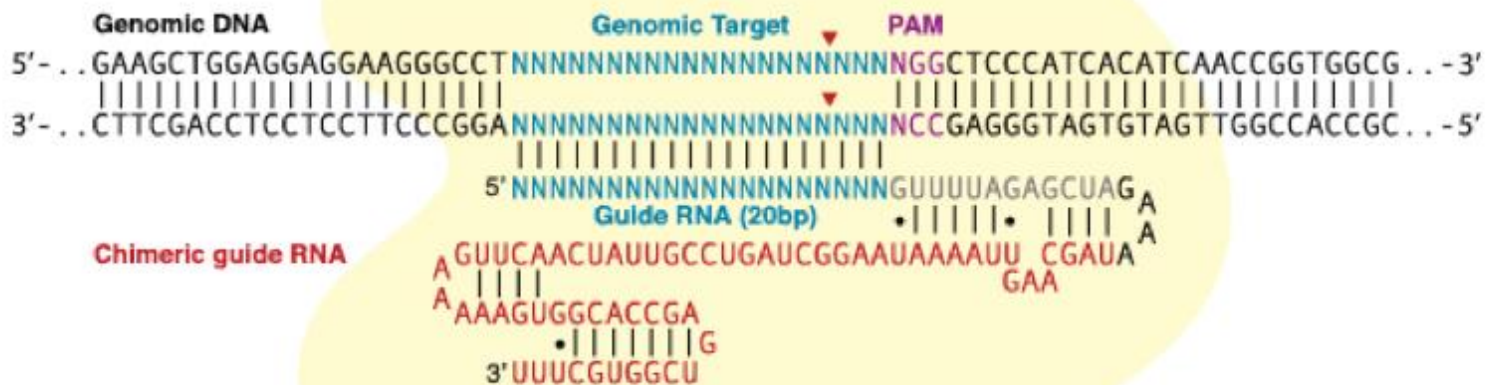


*In the acquisition phase, foreign DNA is incorporated into the bacterial genome at the CRISPR loci. CRISPR loci is then transcribed and processed into crRNA during crRNA biogenesis. During interference, Cas9 endonuclease complexed with a crRNA and separate tracrRNA cleaves foreign DNA containing a 20-nucleotide crRNA complementary sequence adjacent to the PAM sequence. (Figure not drawn to scale.)*

# Edição de genomas por CRISPR-Cas9

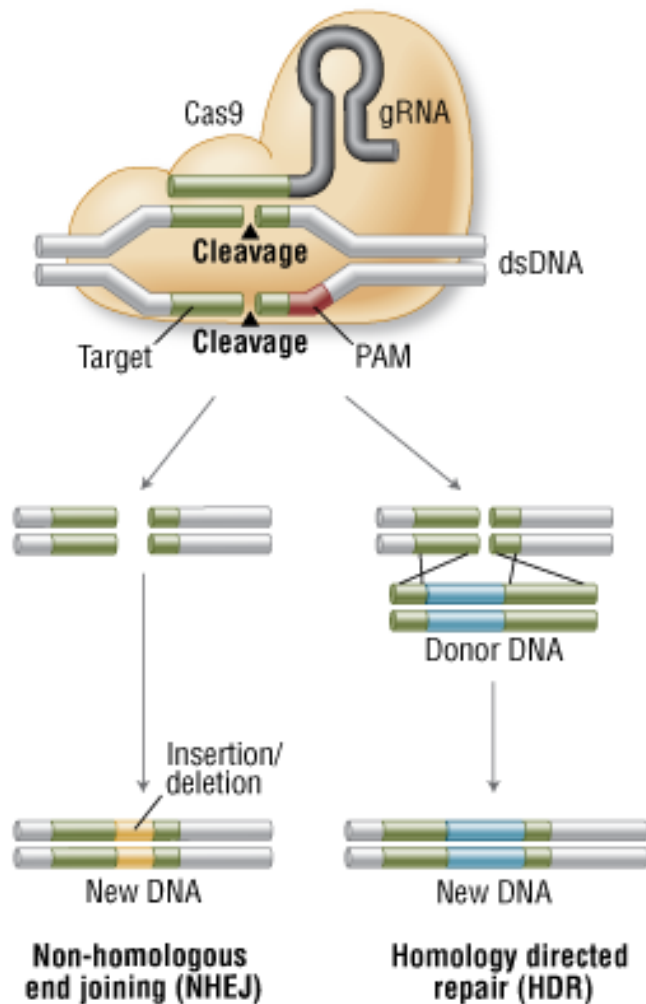
Uso do Small guide RNA (sgRNA) - quimérico e artificialmente sintetizado

- Cas9
- crRNA + tracrRNA + loop = sgRNA, RNA guia pequeno
- Protospacer Adjacent Motif (PAM) sequence
- NGG (*S. pyogenes*)

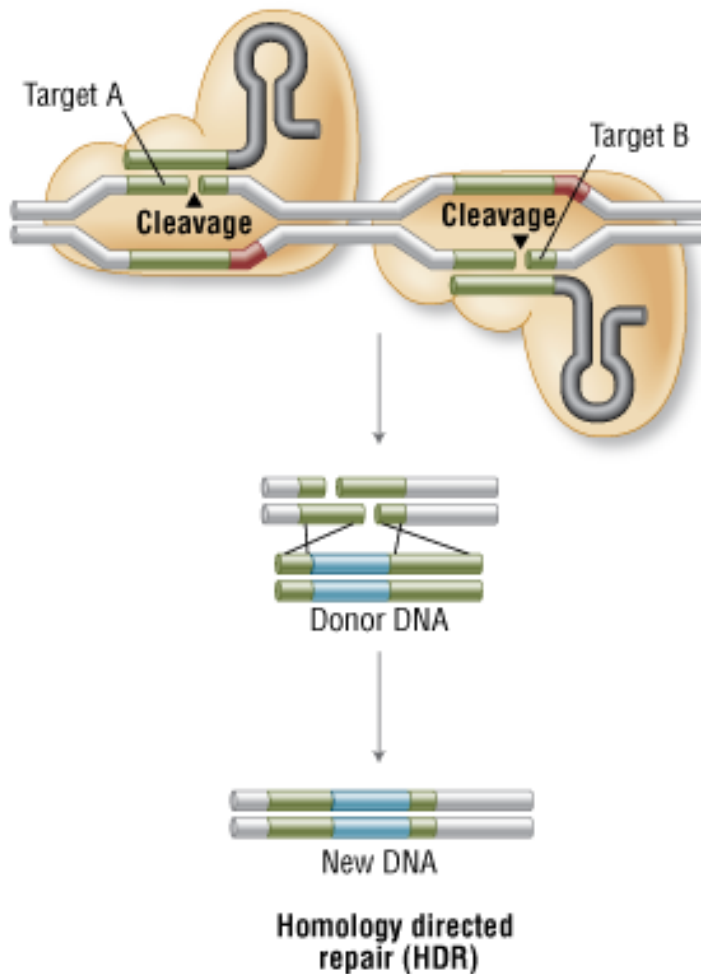


# Edição de genomas por CRISPR-Cas9

A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease

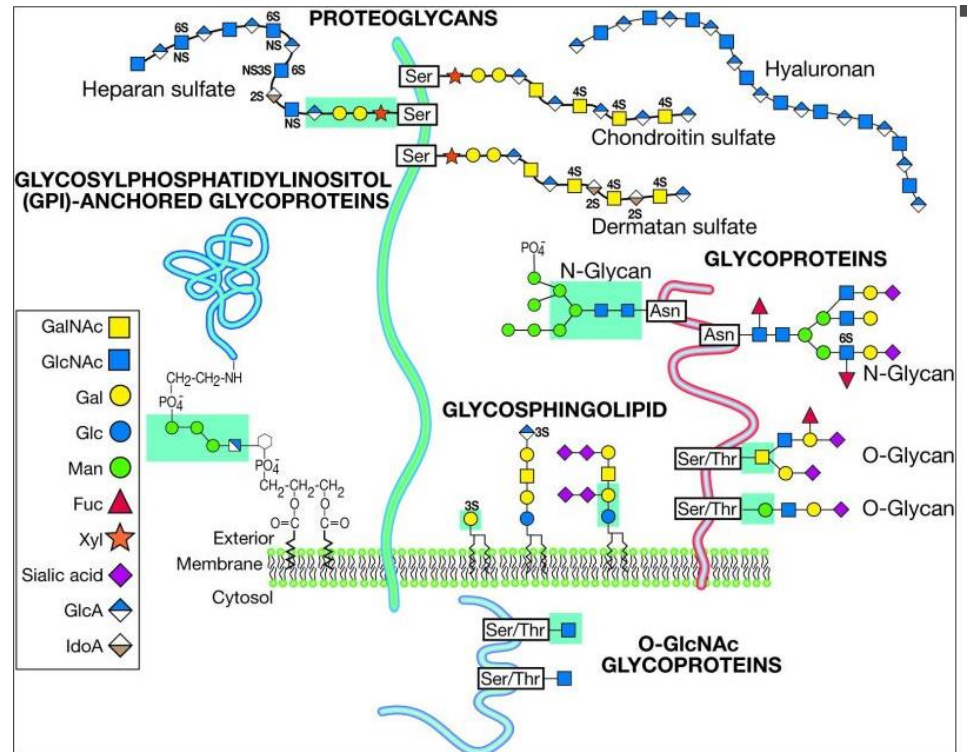


B. Genome Engineering By Double Nicking With Paired Cas9 Nickases



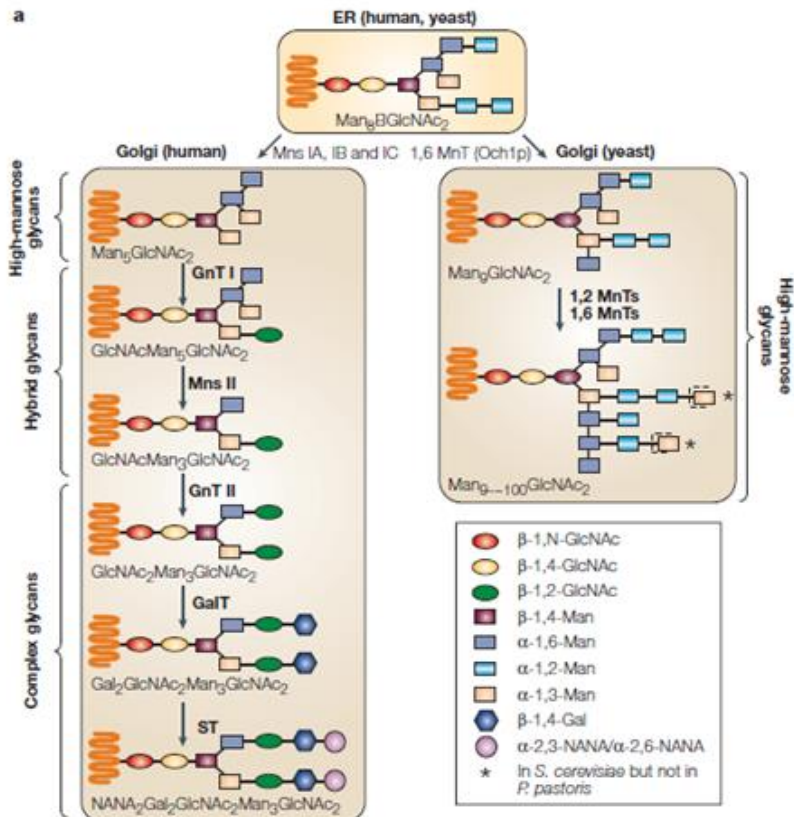
# Glicosilação

- Mais comum das modificações pós-traducionais
- Ligação covalente de resíduos de carboidratos a um polipeptídeo
- Importância:
  - Dobramento
  - Estabilidade
  - Atividade biológica
  - Direcionamento celular
  - Immunogenicidade



# Humanização específica do sistema de glicosilação de *P. pastoris*

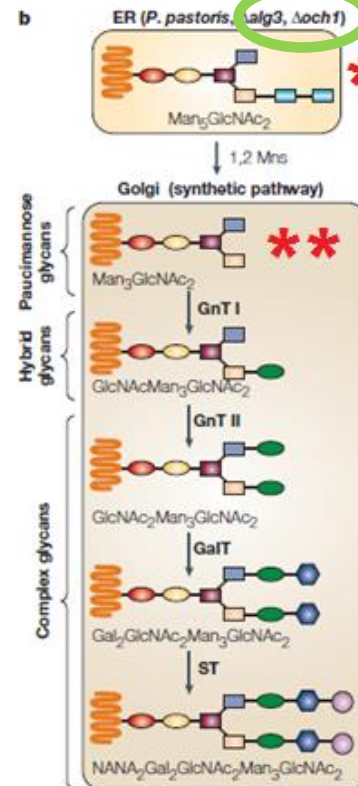
## Via normal



Humana

Pichia

## Via sintética (humanizada)

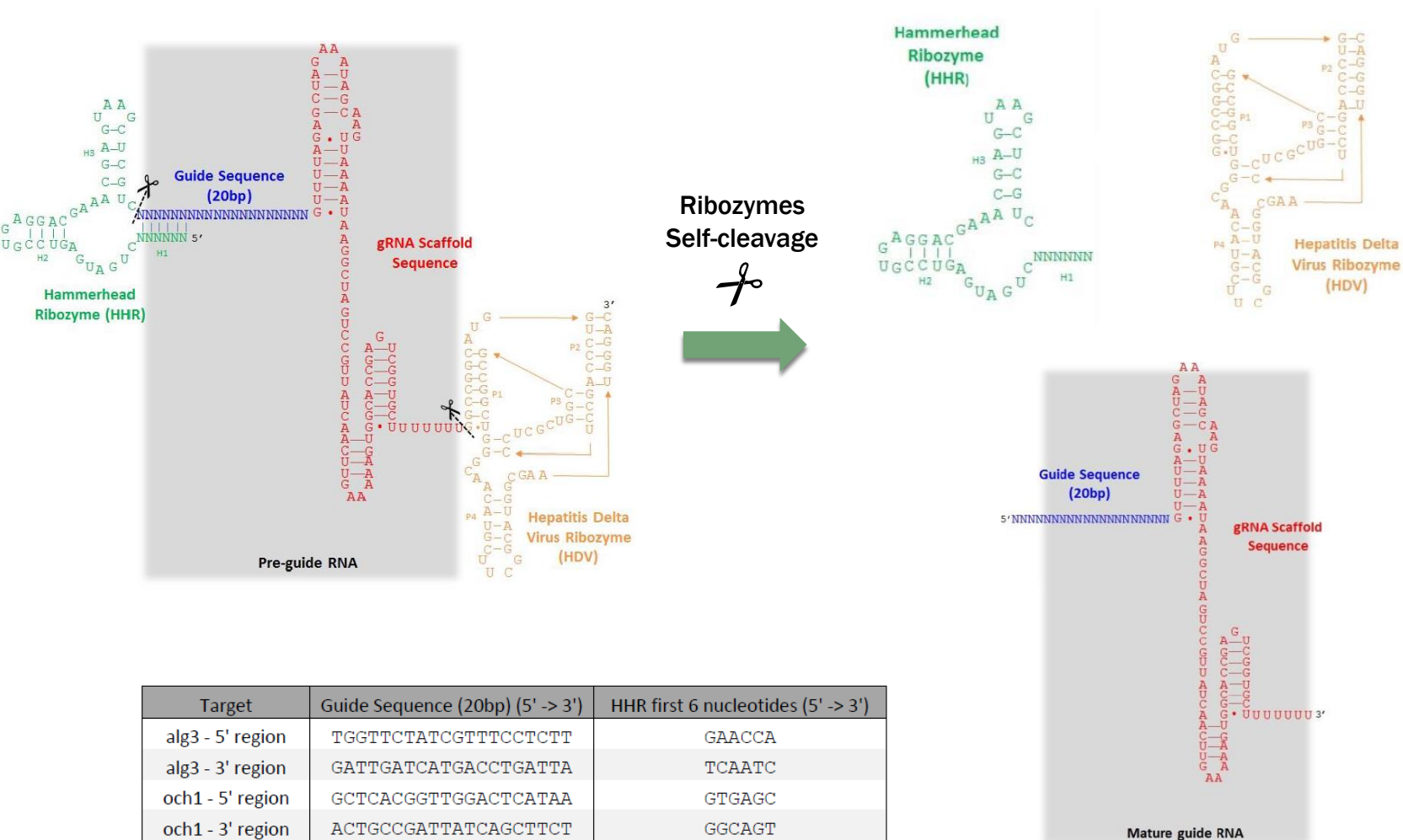


Pichia humanizada

## Glucocerebrosidase



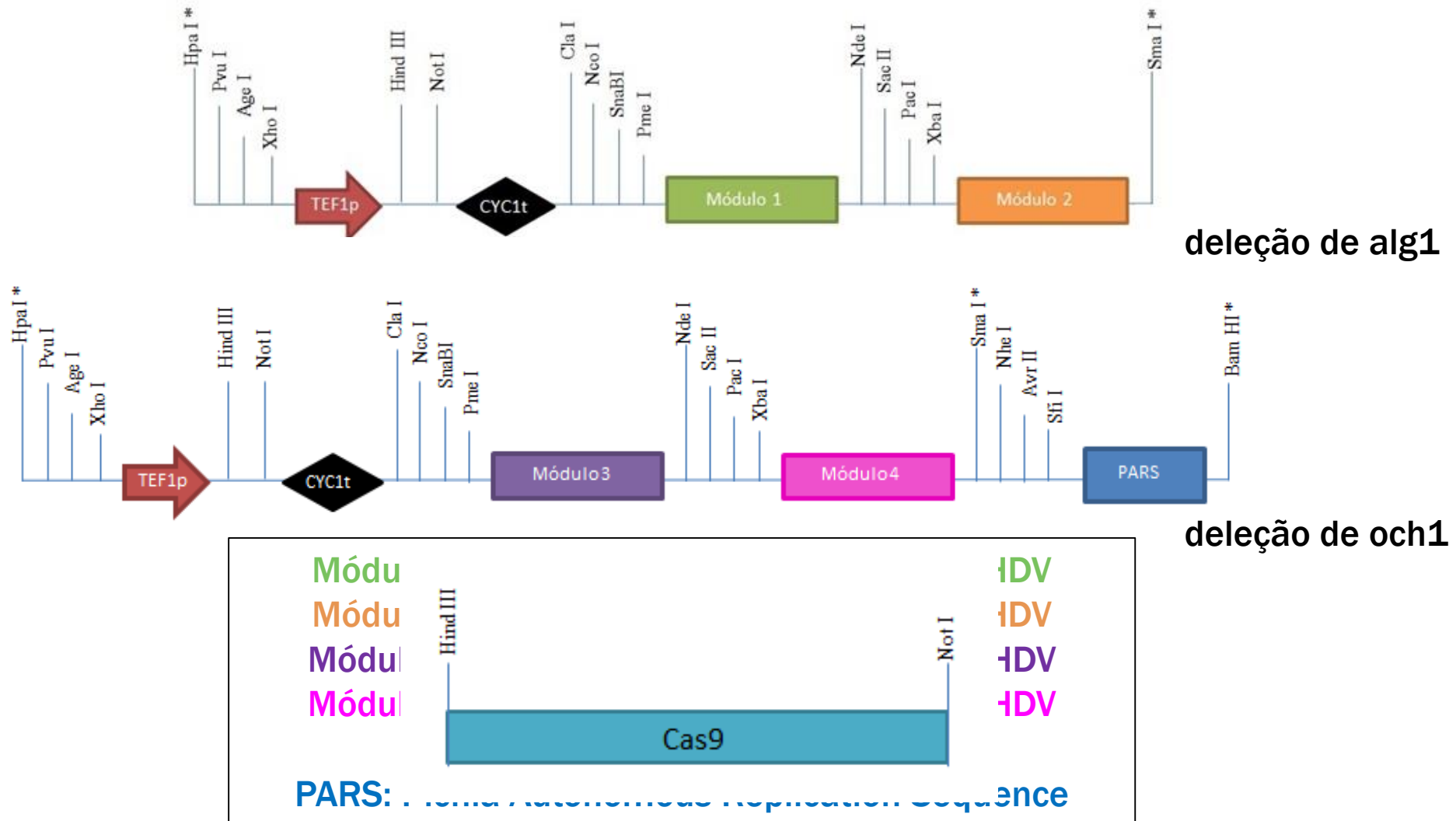
# Ribozimas: RNAs autocatalíticos



Target	Guide Sequence (20bp) (5' -> 3')	HHR first 6 nucleotides (5' -> 3')
alg3 - 5' region	TGGTTCTATCGTTTCCTCTT	GAACCA
alg3 - 3' region	GATTGATCATGACCTGATTA	TCAATC
och1 - 5' region	GCTCACGGTTGGACTCATAA	GTGAGC
och1 - 3' region	ACTGCCGATTATCAGCTTCT	GGCAGT

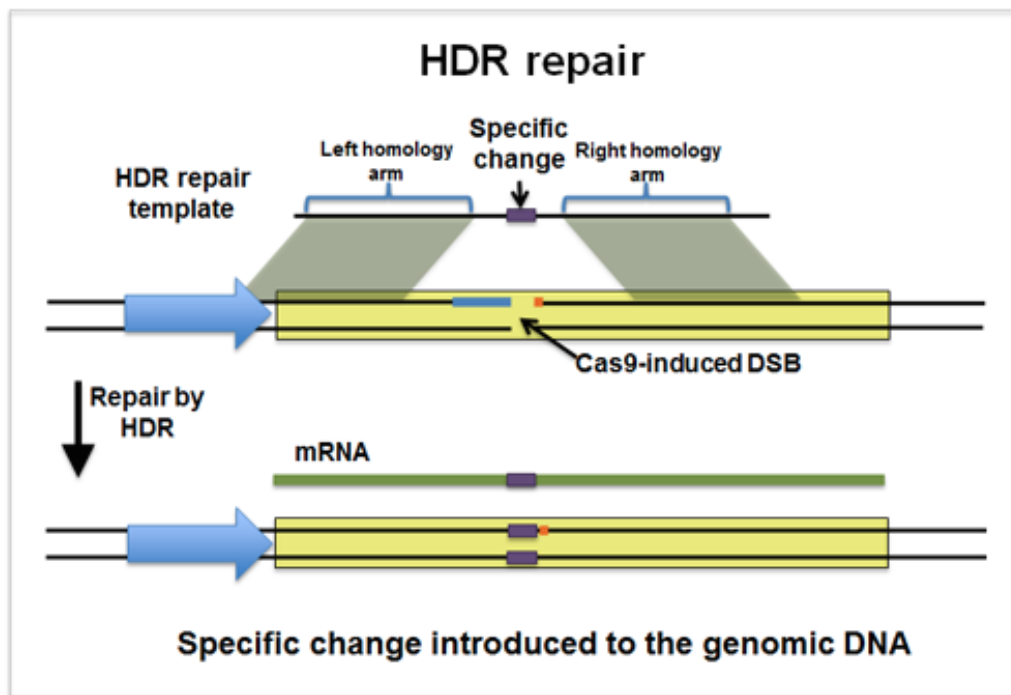


# Genes sintéticos

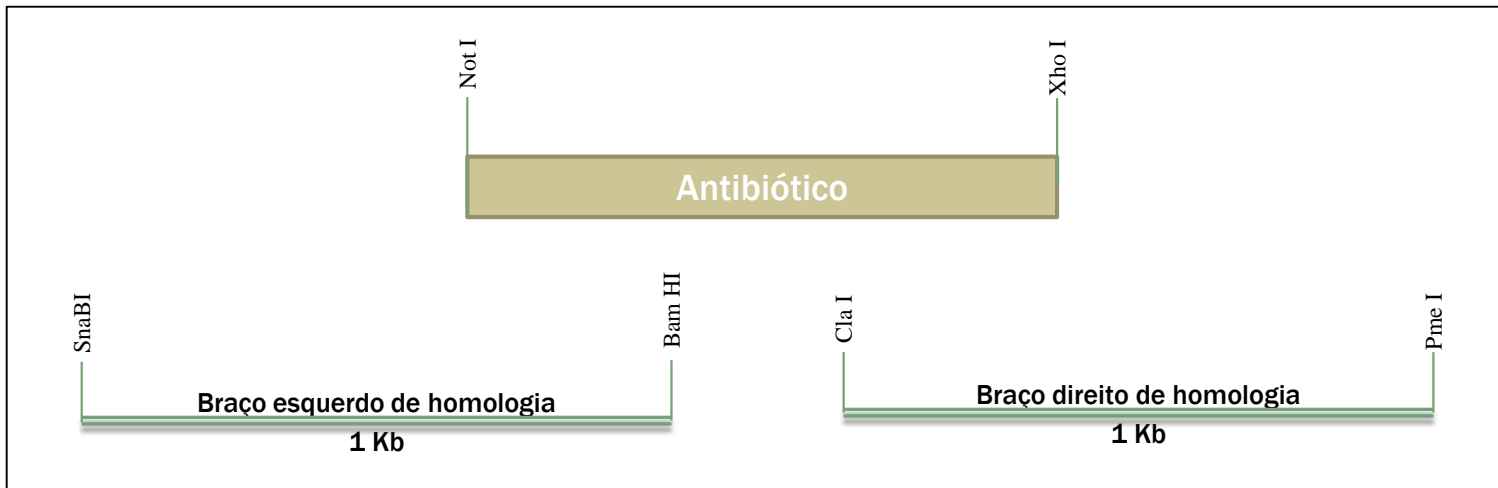
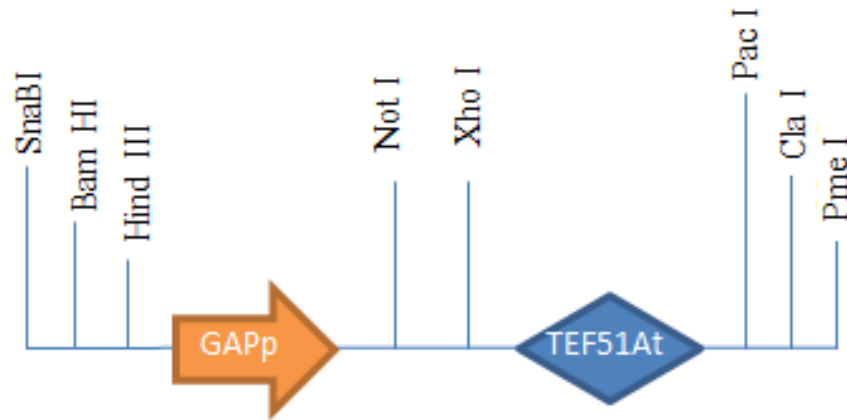


# Reparo por recombinação homóloga

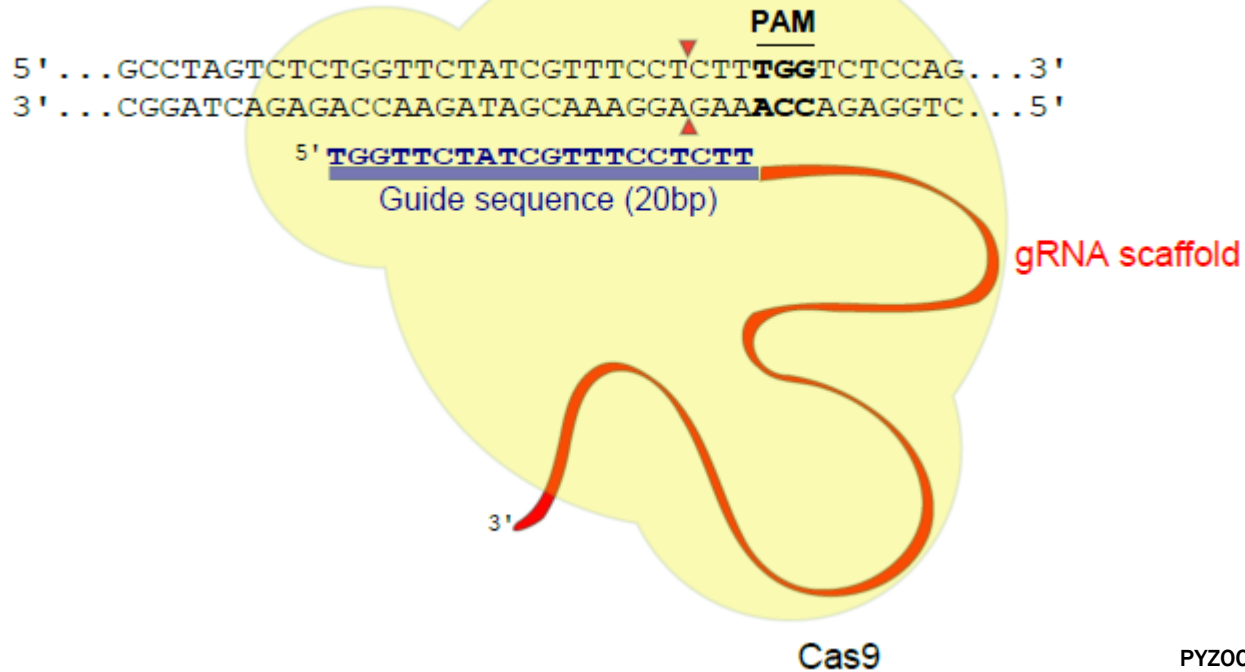
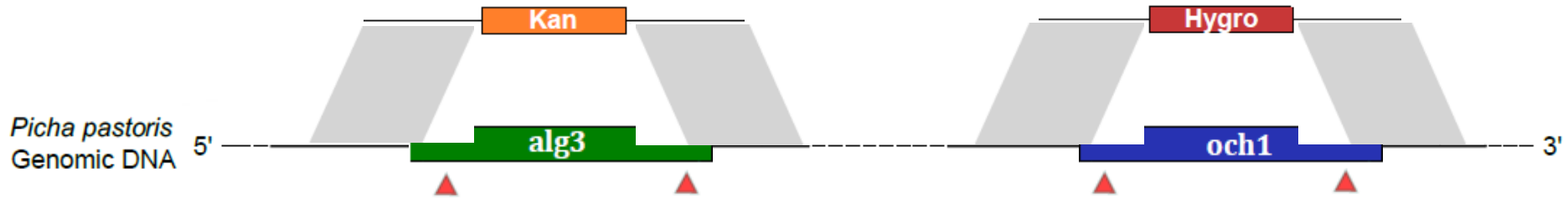
- Necessita de um alto grau de homologia à sequência imediatamente upstream e downstream da dupla quebra do DNA
- $\Delta alg3$ ,  $\Delta och1$  e inserção de genes de resistência

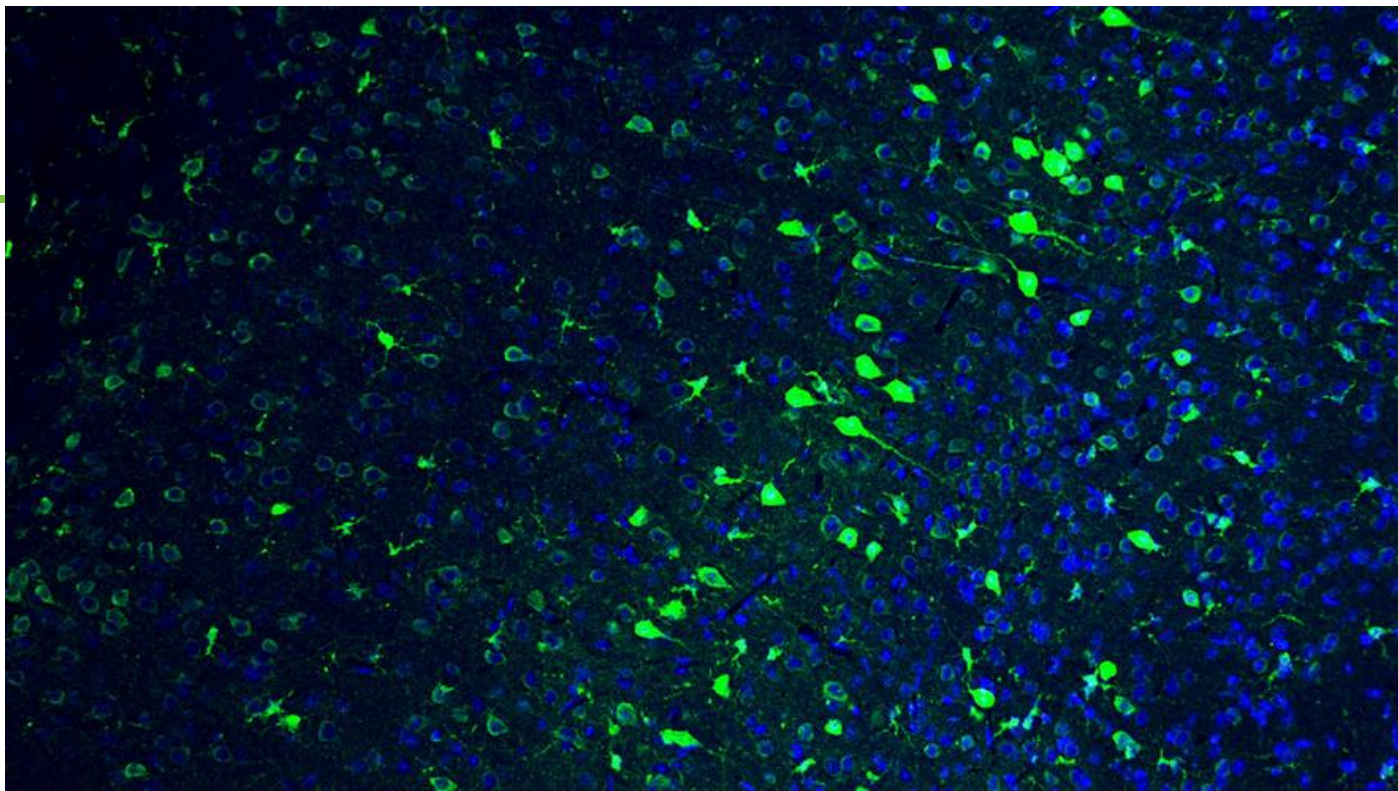


# Genes sintéticos



# Resumindo...





## Gene editor CRISPR restores some sight in vision-damaged rats

Nov. 16, 2016

CRISPR, the genome editing tool, **has improved eyesight in rats with damaged vision** by precisely inserting new DNA into a defective gene, *The Guardian* reports. Importantly, the study shows that CRISPR can work in the nondividing cells that form most adult tissue. The “unprecedented” finding **used a novel pathway to “knock in” the DNA** that typically is used to cripple, or knock out, genes, the scientists report online today in *Nature*. Other researchers caution that the knockin did not have particularly high efficiency, which will make it difficult to apply in humans. But with further improvements, they add, CRISPR may one day be a useful way of adding genes to nondividing cells, for basic research and eventually for gene therapy to treat otherwise incurable diseases like cystic fibrosis and muscular dystrophy.

Potencial  
Ilimitado?



# Genética de Precisão em Doenças genéticas?

## Exemplos:

### 1) Em indivíduos adultos:

Anemia falciforme

### 2) Embriões, células reprodutivas

Cancer

## Problemas:

- Técnicos: efeitos "off target"
- Morais e éticos (crianças sob encomenda)

A Sociedade deve decidir...  
ela está preparada? esclarecida?  
decisão técnica x cultural x religiosa

## From Science Fiction to Ethics Quandary

Newspaper readers across the United States got a jolt last week. Full-page ads announced: Children made to order. The ad offered a checklist of traits—including musical ability, athletic prowess, and protection against premature baldness—for parents to choose for their offspring. And it provided a toll-free telephone number and a Web site for readers to set up an appointment. Tiny type at the bottom of the page provided the only giveaway: The ad is promoting a science fiction movie called *GATTACA* (a clever play on the letters of the genetic code), set to open in late October. Get ready for a few weeks of hype about using genetic manipulation to enhance individual qualities.

that research teams are already working on genetic treatments to restore lost hair and to strengthen muscles. Researchers are likely to propose the first tests of such therapies in chemotherapy patients or those with muscular dystrophy, but if they prove effective, it would

Coincidentally, the day before the ads ran, a group of leading gene-therapy researchers was discussing exactly that issue—and they concluded that the possibilities aren't entirely in the realm of science fiction. At the first Gene Therapy Policy Conference sponsored by the Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) of the National Institutes of Health (NIH), scientists predicted that within 2 years, a researcher will propose a gene-therapy experiment that, although initially aimed at curing disease, could eventually be used to enhance a trait in healthy people. "It's going to happen," pediatrician and gene-therapy researcher W. French Anderson of the University of Southern California in Los Angeles told the conference. "It's going to happen pretty quickly, and it's going to happen in the guise of something else."

Panelists pointed out, for example,



End of the slippery slope? *GATTACA*'s fictional world.



# Edição de Genomas: O céu é o limite?

---



**Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI**  
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio  
Secretaria Executiva



**CTNBio**

**Grupo de Trabalho Novas Tecnologias – Saúde Animal/Humana**



**Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI**  
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio  
Secretaria Executiva



## PREÂMBULO

Em face das novas tecnologias que estão surgindo nos últimos anos, novas possibilidades de alterações genéticas poderão ter um impacto no meio ambiente, saúde animal e humana de forma não prevista.

Assim, justifica-se a criação de Grupos de Trabalho visando discutir e aprofundar os conhecimentos das novas tecnologias e os seus impactos.

Um documento inicial foi criado pelo Grupo de Trabalho da Setorial Humana e Animal no dia 06 de outubro de 2016. Foi a seguir, apresentado e discutido durante a sessão de trabalho da setorial humana e animal no dia 07 de outubro de 2016 (com a presença dos membros Paulo Lee Ho, Heidge Fukumasu, Maria Lúcia Zaidan Dagli, Jenifer Saffi, Luciana Cezar de Cerqueira Leite, Anibal Eugênio Vercesi, Nadja Cristhina de Souza Pinto, Rafael Diego da Rosa e dos Assessores Rubens José Nascimento, Jackson Martins de Sousa, Pamella Queiroz Meireles, Allan Edver Mello dos Santos, Fabiano Bonfim Carregaro). Durante a discussão houveram várias sugestões que foram incorporados neste documento/apresentação.

## 1) O que é um OGM? (Várias definições dependem do entendimento do que é um OGM)

A CTNBio define OGM como sendo um organismo cujo material genético – DNA, RNA – tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética (Decreto 5.591, de 22 de novembro de 2005, Capítulo 1, artigo 3). A Lei 11.105 de 24 de março de 2005 também contribui para o esclarecimento do que seria ou não um OGM e outras definições importantes:

Art. 3º Para os efeitos desta Lei, considera-se:

I – organismo: toda entidade biológica capaz de reproduzir ou transferir material genético, inclusive vírus e outras classes que venham a ser conhecidas;

II – ácido desoxirribonucléico - ADN, ácido ribonucléico - ARN: material genético que contém informações determinantes dos caracteres hereditários transmissíveis à descendência;

III – moléculas de ADN/ARN recombinante: as moléculas manipuladas fora das células vivas mediante a modificação de segmentos de ADN/ARN natural ou sintético e que possam multiplicar-se em uma célula viva, ou ainda as moléculas de ADN/ARN resultantes dessa multiplicação; consideram-se também os segmentos de ADN/ARN sintéticos equivalentes aos de ADN/ARN natural;

IV – engenharia genética: atividade de produção e manipulação de moléculas de ADN/ARN recombinante;

**V – organismo geneticamente modificado - OGM: organismo cujo material genético – ADN/ARN tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética;**

**VI – derivado de OGM: produto obtido de OGM e que não possua capacidade autônoma de replicação ou que não contenha forma viável de OGM;**

**VII – célula germinal humana: célula-mãe responsável pela formação de gametas presentes nas glândulas sexuais femininas e masculinas e suas descendentes diretas em qualquer grau de ploidia;**

**VIII – clonagem: processo de reprodução assexuada, produzida artificialmente, baseada em um único patrimônio genético, com ou sem utilização de técnicas de engenharia genética;**

**IX – clonagem para fins reprodutivos: clonagem com a finalidade de obtenção de um indivíduo;**

**X – clonagem terapêutica: clonagem com a finalidade de produção de células-tronco embrionárias para utilização terapêutica;**

**XI – células-tronco embrionárias: células de embrião que apresentam a capacidade de se transformar em células de qualquer tecido de um organismo.**

**§ 1º Não se inclui na categoria de OGM o resultante de técnicas que impliquem a introdução direta, num organismo, de material hereditário, desde que não envolvam a utilização de moléculas de ADN/ARN recombinante ou OGM, inclusive fecundação in vitro, conjugação, transdução, transformação, indução poliplóide e qualquer outro processo natural.**

**§ 2º Não se inclui na categoria de derivado de OGM a substância pura, quimicamente definida, obtida por meio de processos biológicos e que não contenha OGM, proteína heteróloga ou ADN recombinante.**

**Art. 4º Esta Lei não se aplica quando a modificação genética for obtida por meio das seguintes técnicas, desde que não impliquem a utilização de OGM como receptor ou doador:**

**I – mutagênese;**

**II – formação e utilização de células somáticas de hibridoma animal;**

**III – fusão celular, inclusive a de protoplasma, de células vegetais, que possa ser produzida mediante métodos tradicionais de cultivo;**

**IV – autoclonação de organismos não-patogênicos que se processe de maneira natural.**



**Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI**  
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio  
Secretaria Executiva



**Algumas considerações derivadas do conceito de OGM**

Assim, a título de esclarecimento, também entendemos que se houver acréscimo de informação genética extracromossômica obtido por engenharia genética de forma estável, o organismo resultante também deverá ser considerado um OGM.

Processos de terapia gênica ou edição de genoma que resultem na alteração do genótipo, seja ele selvagem ou não, os indivíduos resultantes deste processo serão considerados OGMs.

Células tronco com pluripotência induzida (iPS) quando oriundas de modificações por engenharia genética serão considerados OGMs.

Por outro lado, a transferência estável de mitocôndria de uma célula para outra célula, a célula resultante não é um OGM.

Não consideramos um OGM, células que recebam algum material genético que não se perpetue através de gerações ou não é estável no sistema. Um exemplo disto, seria a introdução transitória e não replicativa de micro RNAs na célula para a obtenção de um fenótipo de silenciamento gênico. Da mesma maneira, o uso de aptâmeros de ácidos nucleicos em terapias não resultam em OGMs se não forem estáveis e autoreplicativos.

Fenômenos de epigenética, ainda que induzidos por material genético exógeno de forma não estável, as células resultantes não são OGMs pois o seu material genético não foi alterado.

As células que receberam o material genético por processos naturais de transferência horizontal de genes não são considerados OGMs.

# **Novas Tecnologias, conceitos, usos, consequências e recomendações:**

- 1) Reação Mutagênica em Cadeia (Mutagenic chain reaction (MCR)) e Direcionamento Gênico (Gene drive);**
- 2) Biologia Sintética;**
- 3) Ganho ou perda de função (Gain or loss of function).**

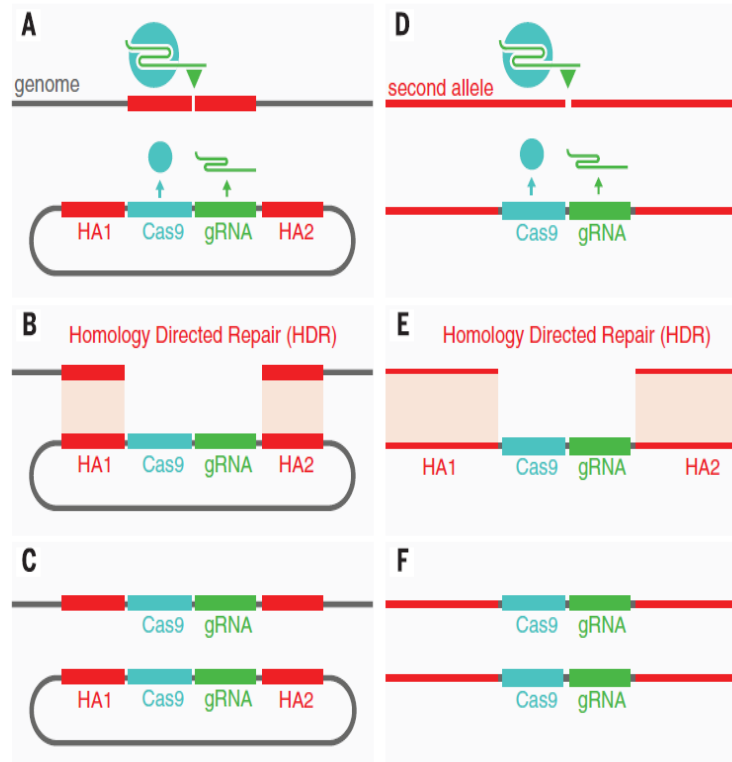


## 2) Mutagenic chain reaction e Gene drive (Reação mutagênica em cadeia e direcionamento gênico)

Mutagenic chain reaction (MCR) ou Gene drive (GD) é um processo de edição genômica que tem por princípio a geração de mutações “autocatalíticas” resultando sempre em homozigose do alelo editado. Inicialmente, a MCR foi desenvolvido usando o sistema CRISPR-Cas9 (Gantz, VM and Bier E., The mutagenic chain reaction: A method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science* 348: 442-444, 2015; ver comentário de John Bohannon, *Science* 347: 1300, 2015). No entanto, entendemos que outras tecnologias e estratégias de edição gênica poderão ser usadas para o mesmo fim, não se restringindo apenas a tecnologia de CRISPR-Cas9, como de Zinc fingers nucleases (ZFN), transcription activator-like effector nucleases (TALENs), e outras novas tecnologias que surjam com o progresso da área como a CRISPR-Cpf1 (Zetsche B et al. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*. 2015 Sep 25. pii: S0092-8674(15)01200-3. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038).

**Como resultado desta tecnologia, o processo de MCR transformará sempre o organismo heterozigoto em homozigoto**

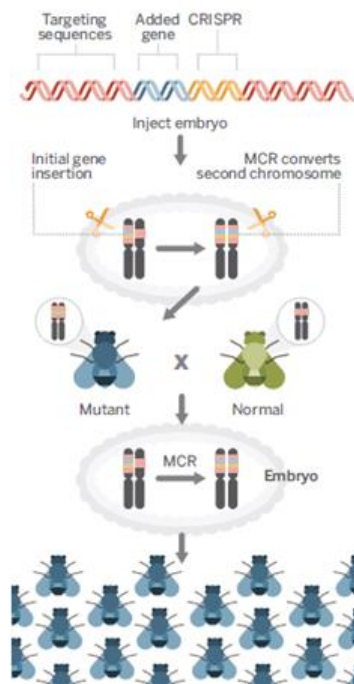
**Fig. 1. Scheme outlining the mutagenic chain reaction (MCR).** (A to C) A plasmid consisting of a core cassette carrying a Cas9 transgene, a gRNA targeting a genomic sequence of interest, and flanking homology arms corresponding to genomic sequences abutting the target cleavage site (A) inserts the core Cas9-gRNA cassette into the targeted locus via HDR [(B) and (C)]. (D to F) In turn, the inserted cassette expresses both Cas9 and the gRNA, leading to cleavage (D) and HDR-mediated insertion of the cassette into the second allele, thereby rendering the mutation homozygous [(E) and (F)]. HA1 and HA2 denote the two homology arms that directly flank the gRNA-directed cut site.



Em outras palavras, este OGM quando liberado na natureza e for sexualmente competente, poderá potencialmente ao longo das gerações substituir toda a população pelo fenótipo determinado pelo MCR:

**Driven to excess**

A method dubbed mutagenic chain reaction (MCR) may be able to drive an added gene, such as one for disease resistance, through an insect population.



Em função deste potencial, consideramos que o uso desta tecnologia deve ser controlado de forma estrita e caso a caso, uma vez que tem o potencial de substituir todos os alelos selvagens do gene em uma população, afetando a biodiversidade da espécie e do bioma.

Para os trabalhos de edição gênica, não recomendamos o sistema de MCR.

No caso de necessidade de uso da tecnologia MCR, recomendamos que sejam adotadas ações que visem controlar o potencial escape de um OGM resultante. Os controles visando o confinamento deste OGM não devem ser únicos mas pelo menos a combinação de 2 tipos diferentes de estratégias de controle (Tabela 1), as quais podem ser em nível molecular, ecológico, reprodutivo e/ou de barreiras físicas. Maiores detalhes podem ser obtidos em Akbari, OS et al, Safeguarding gene drive experiments in the laboratory. *Science* 349: 927-929, 2015 (recomendamos também a leitura do artigo escrito por Esvelt, KM et al, Concerning RNA-guided gene drives for the alterations of wild populations. *eLife* 2014;3e03401, DOI: 10.7554/eLife.03401).

## Potentially stringent confinement strategies for gene drive research

TYPE	STRINGENT CONFINEMENT STRATEGY	EXAMPLES
Molecular	Separate components required for genetic drive Target synthetic sequences absent from wild organisms	sgRNA and Cas9 in separate loci (8) Drive targets a sequence unique to laboratory organisms (3,4,8)
Ecological	Perform experiments outside the habitable range of the organism Perform experiments in areas without potential wild mates	<i>Anopheles</i> mosquitoes in Boston <i>Anopheles</i> mosquitoes in Los Angeles
Reproductive	Use a laboratory strain that cannot reproduce with wild organisms	<i>Drosophila</i> with compound autosomes*
Barrier	Physical barriers between organisms and the environment • Remove barriers only when organisms are inactive • Impose environmental constraints • Take precautions to minimize breaches due to human error	Triply nested containers, >3 doors (6) Anesthetize before opening (6) Low-temperature room, air-blast fans Keep careful records of organisms, one investigator performs all experiments (6)

\*An example of reproductive confinement would be *Drosophila* laboratory strains with a compound autosome, where both copies of a large autosome are conjoined at a single centromere. These strains are fertile when crossed inter se but are sterile when outcrossed to any normal or wild-type strain because all progeny are monosomic or trisomic and die early in development.

Os controles visando o confinamento deste OGM não devem ser únicos mas pelo menos a combinação de 2 tipos diferentes de estratégias de controle, as quais podem ser em nível molecular, ecológico, reprodutivo e/ou de barreiras físicas.

**Todas as análises de OGMs que envolvam MCR ou gene drive deverão ser feitas pela CTNBio, mesmo sendo de nível 1 de biosegurança.**

Ministério da  
Ciência, Tecnologia  
e Inovação

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAÍS RICO E PAÍS SEM POBREZA

**Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI**  
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio  
Secretaria Executiva

comissão técnica nacional  
**CTNBio**  
de biossegurança

**OBRIGADO!**









