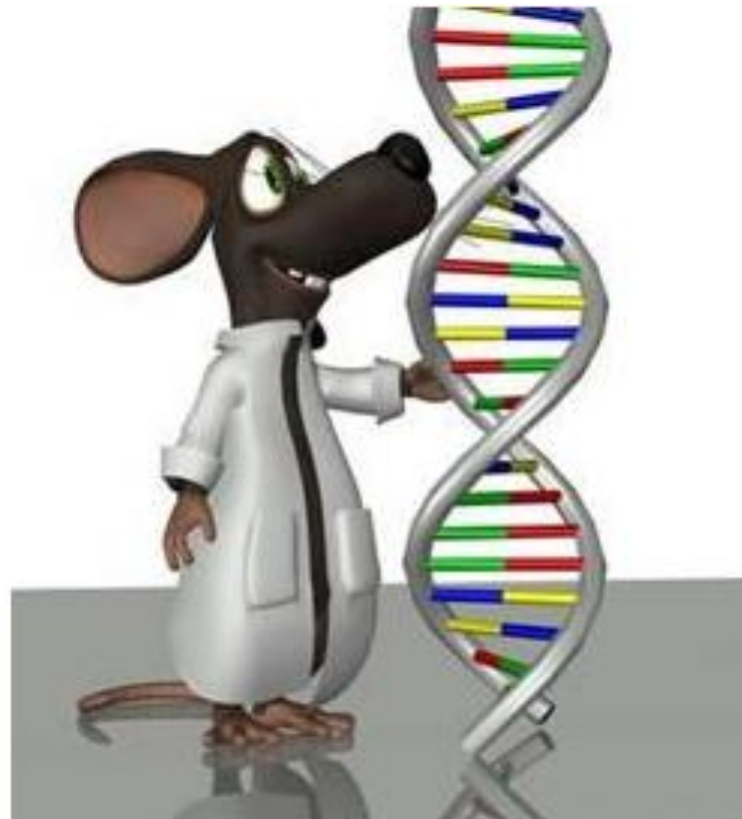


# Engenharia genética e animais transgênicos



Organismo transgênico é um organismo cujo material genético foi modificado utilizando-se a tecnologia de DNA recombinante

A tecnologia do DNA recombinante nos permite manipular sequências de DNA e introduzi-las em novos organismos

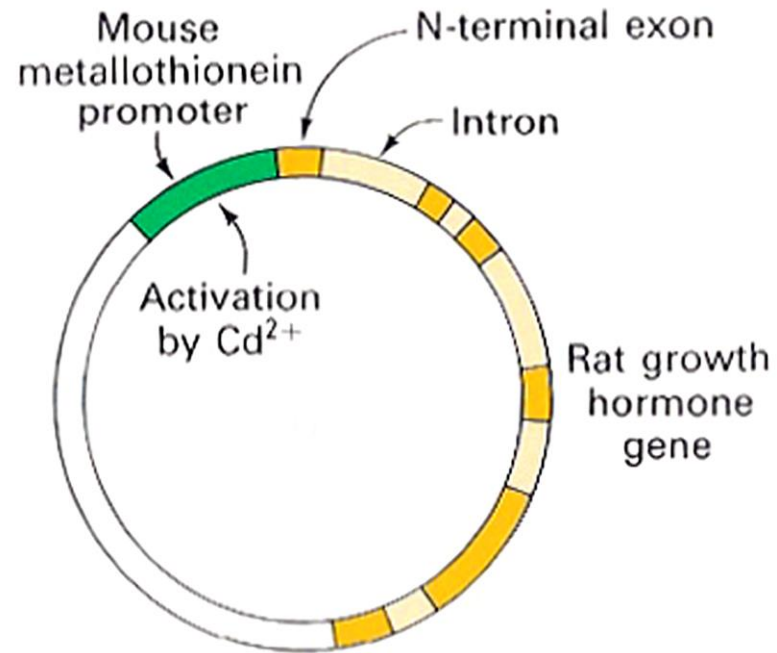
Transgene é um gene que foi transferido de um organismo para outro

# CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS (adição de genes)

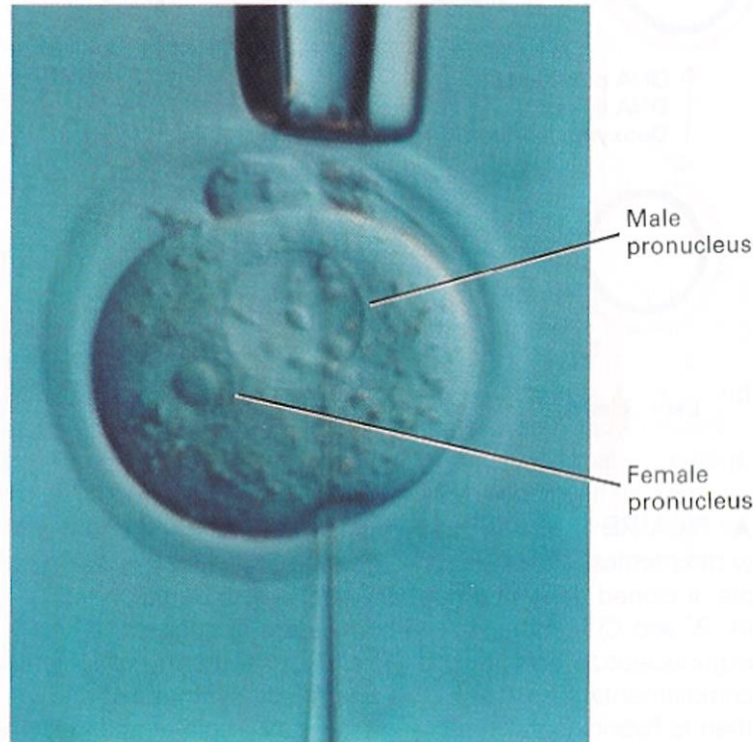
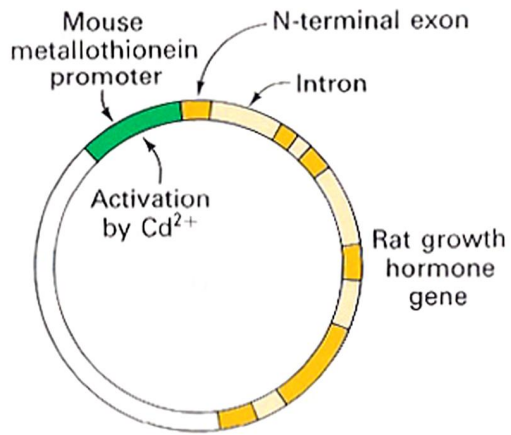
O exemplo dos camundongos gigantes

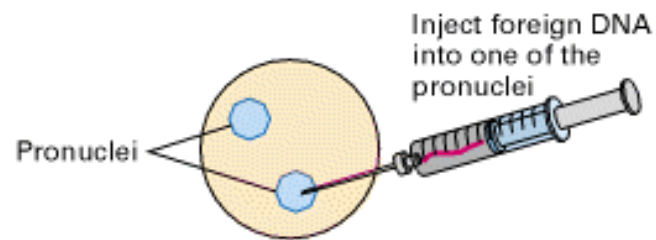


# O exemplo dos camundongos gigantes



# Injeção do DNA contendo o transgene no ovócito fecundado de camundongo





Fertilized mouse egg prior to fusion of male and female pronuclei

Transfer injected eggs into foster mother



About 10 to 30% of offspring contain injected foreign DNA. Foreign DNA is present in equal amounts in all tissues



Mice expressing foreign DNA are bred to continue DNA in germ line

camundongos transgênicos →



Camundongo transgênico que apresenta múltiplas cópias do hormônio de crescimento de ratos, inseridas *in tandem* em um único sítio randômico em um de seus cromossomos.





# Animais transgênicos como biorreatores para produção de proteínas para uso terapêutico ou industrial

## NEWS

### First US approval for a transgenic animal drug

The animal biotech sector reached a landmark in February when the US Food and Drug Administration (FDA) announced the approval of ATryn, an anticoagulant protein derived from the milk of transgenic goats. Although the product had previously been approved in Europe, GTC Biotherapeutics of Framingham, Massachusetts, is the first company to have a transgenic animal drug approved for US use.

So far, 2009 has been a good year for animal biotech companies. ATryn's approval follows closely on the heels of the FDA final guidance issued a month earlier that describes the regulatory path for transgenic animals and their products for both health-care and food production. The timing of the announcements provides a welcome boost to an industry that has long been struggling in the US because of the lack of a clear regulatory framework and low investment levels.

ATryn, a recombinant human anti-thrombin- $\alpha$  produced in transgenic goats' milk, validates "the regulatory process they [FDA] just codified in the guidance," says Barbara Glenn, who is managing director for animal biotech at the Biotechnology Industry Organization in Washington, DC.

The FDA's recently issued regulatory framework, years in the making, is the first US government guidance for transgenic animals. It oversees all such animals, whether used as bioreactors to produce proteins and replacement tissues for therapeutic/industrial uses or modified for improved nutritional



Milk from GTC's transgenic goats pictured here will be used to produce ATryn, the first animal drug to be approved in the US.

status, disease resistance or faster growth (*Nat. Biotechnol.* 26, 1205–1207, 2008). The agency's experience with ATryn manufacturers GTC Biotherapeutics and other animal biotech companies has helped shape the approval pathway into its final form.

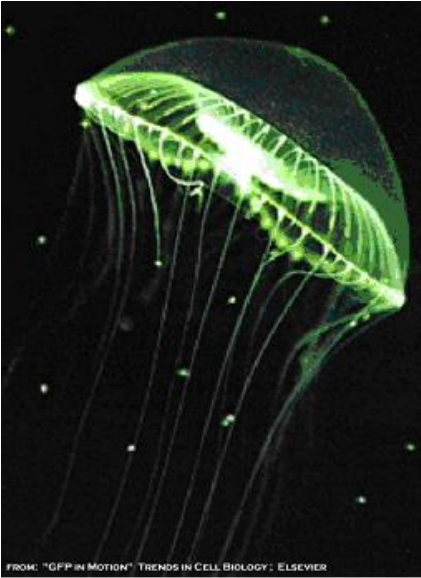
ATryn was approved in the European Union (EU) in 2006 on the basis of a phase 2 study of 13 people and compassionate use in another 5. But the FDA required an additional phase 3 study, says Tom Newberry, vice president of corporate relations at

Ex: Anti- $\alpha$ -trombina humana recombinante, produzida no leite de cabra transgênica

Nature Biotechnology 27,302 - 304 (2009)

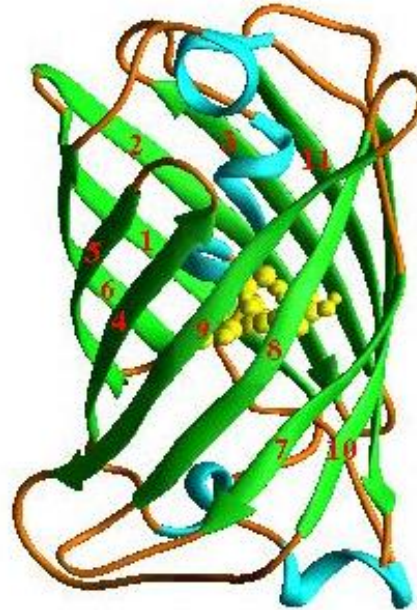


# Green Fluorescent Protein (GFP)



*Aequoria victoria*

395 nm  
(UV)



509 nm  
(verde)

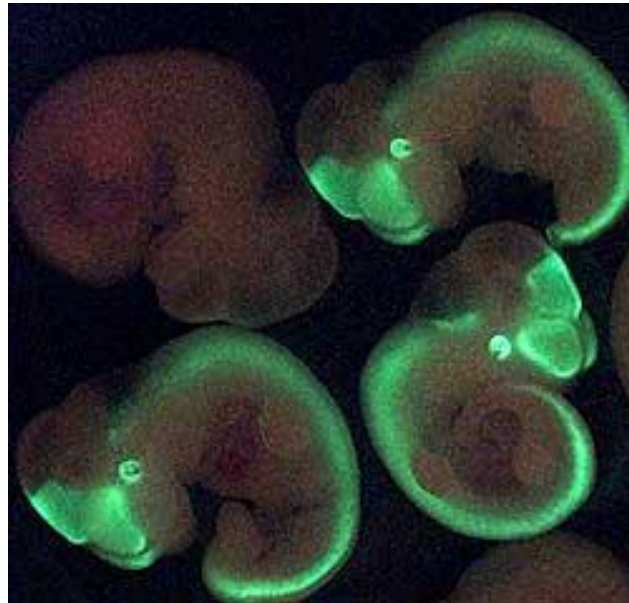
# GFP pode ser utilizado como indicador de expressão de genes (como **gene repórter**)

Ex: Pax 6 - fator de transcrição envolvido no desenvolvimento de tecido nervoso

Transgene



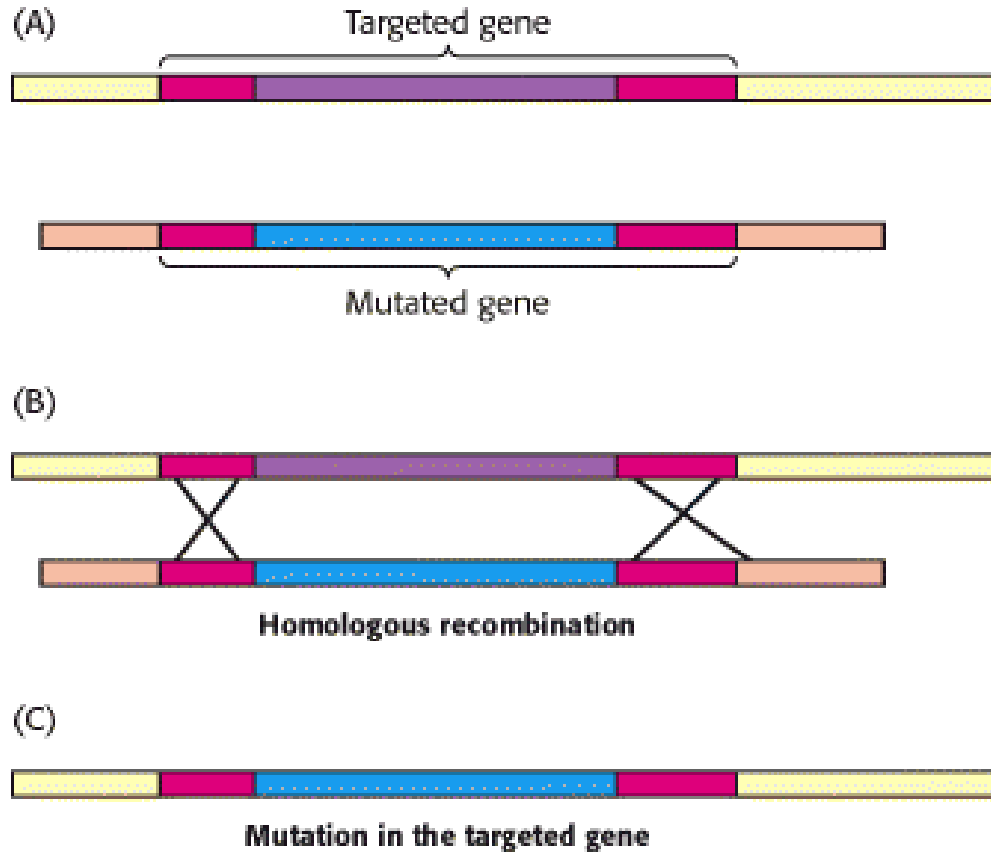
P= Promotor do gene Pax 6



Expresso no sistema nervoso, olho e sistema olfatório.

# *KNOCK OUT* DE GENES:

Por recombinação homóloga



Recombinação homóloga do DNA inserido na célula ocorre com baixa frequência

# KNOCK OUT DE GENES através de recombinação homóloga requer:

## Células tronco embrionárias (ES cells)

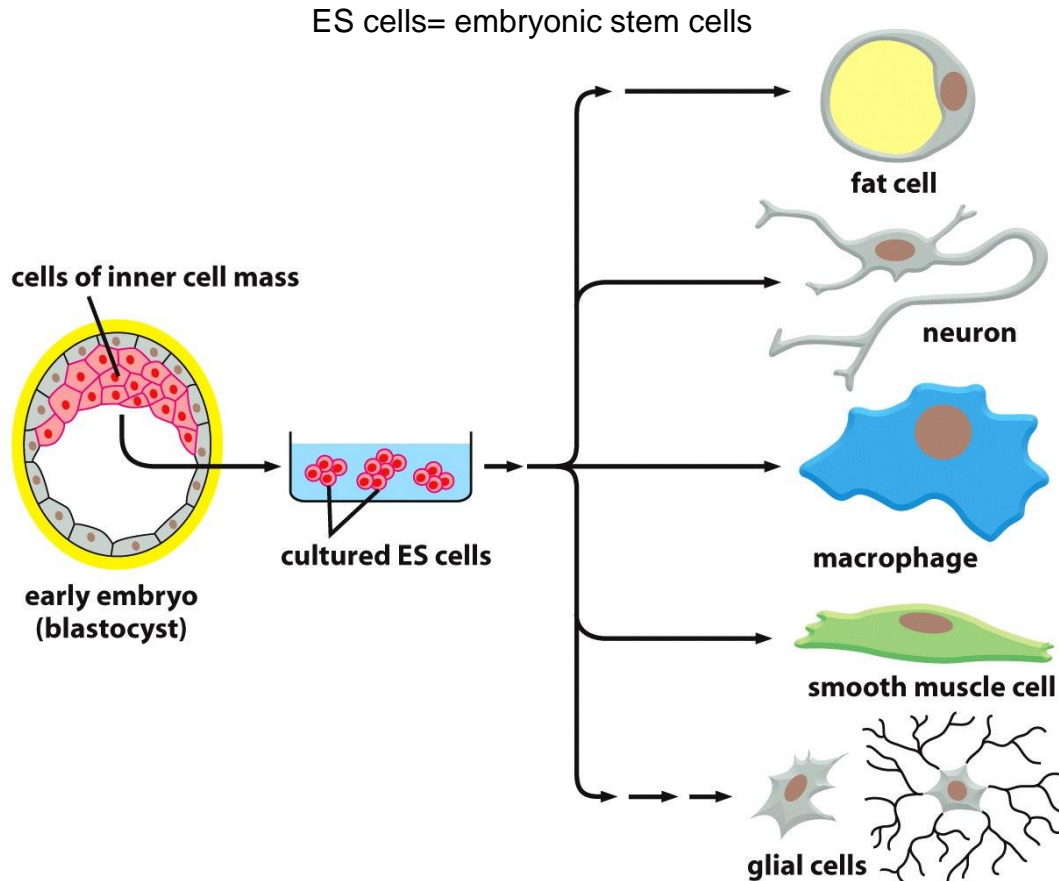
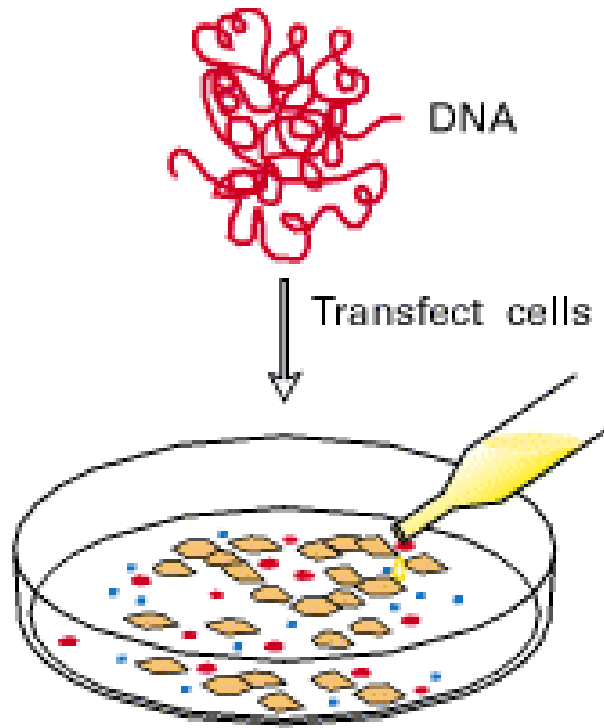
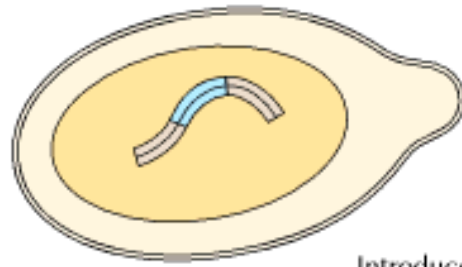


Figure 8-5 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



Células tronco embrionárias podem ser transfectadas com DNA exógeno

Cell carrying normal copy of gene

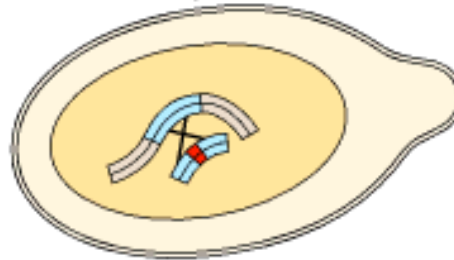


Introduce mutated DNA into cells



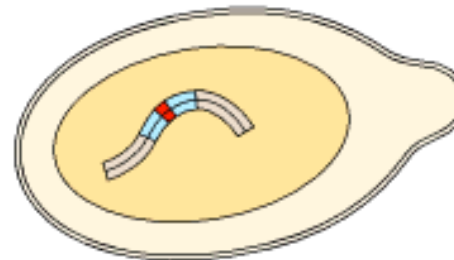
Cloned mutated copy of gene

Mutated DNA recombines with normal chromosomal copy of gene

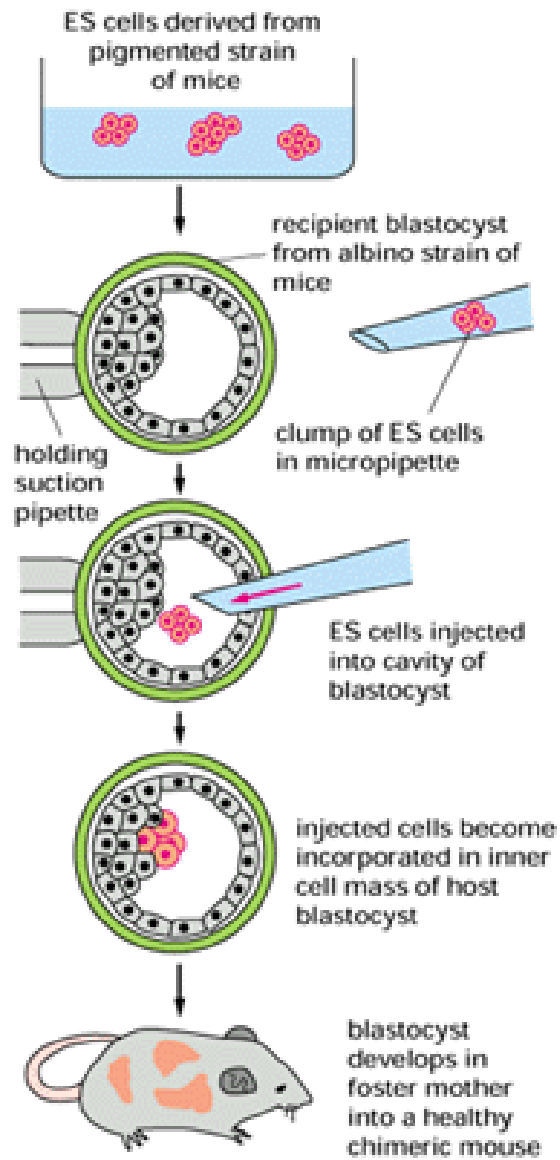


Homologous recombination

Cell carrying mutated gene in place of normal copy







Camundongo quimérico

# Camundongo quimérico



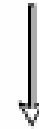
Chimaeric mouse with pigmented tissue derived from injected ES cells



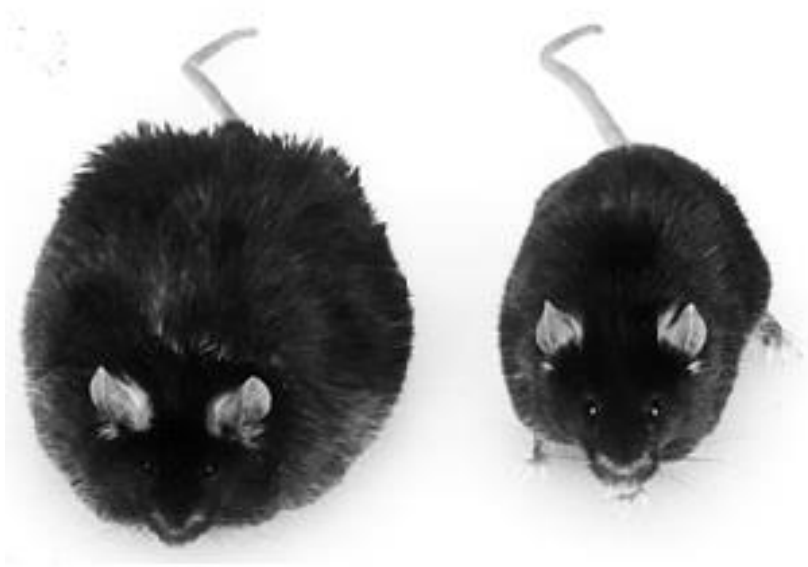
×



Mate chimeric mice to homozygous white mice



Black progeny develop from germ-line cells derived from ES cells and are heterozygous for disrupted gene X



Camundongo  
*knock out*  
para o gene  
da leptina

Camundongo  
tipo *selvagem*

# Engenharia de Genomas – CRISPR/Cas9



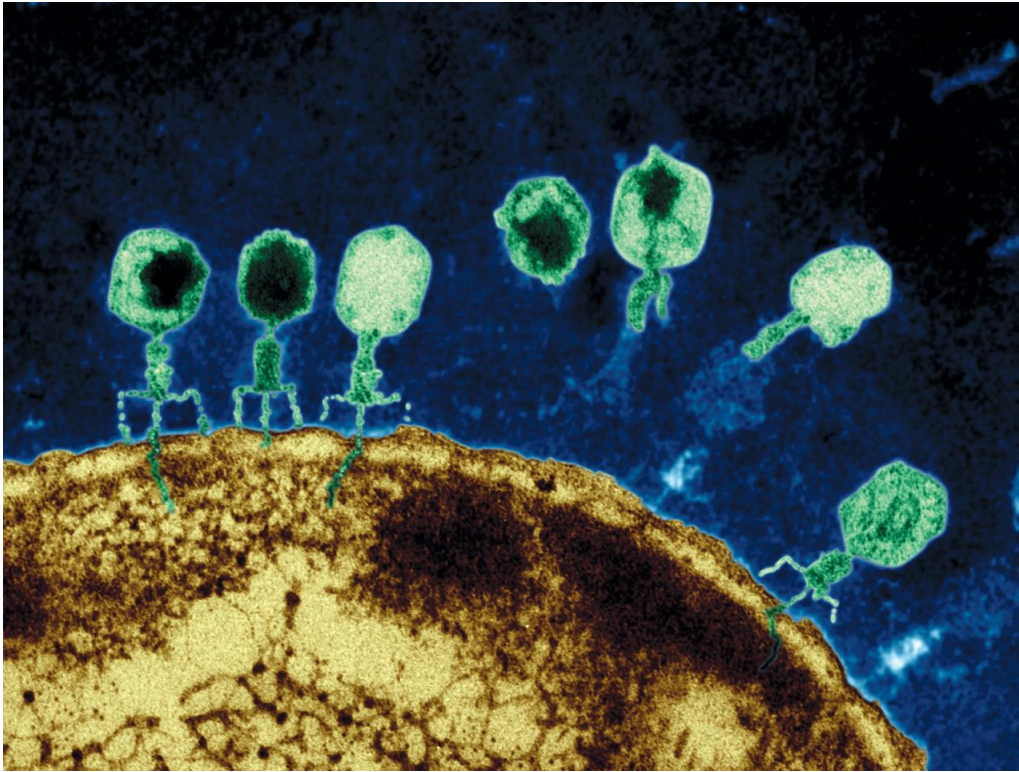
O CRISPR/Cas9 é o nome de uma técnica de biologia molecular capaz de editar (remover, adicionar, trocar) sequências de DNA localizadas em qualquer região do genoma. Essa técnica é baseada em um sistema de memória imunológica presente nas bactérias, usado para protegê-las de invasões por bacteriófagos.

O sistema CRISPR/Cas9 consiste em duas moléculas:

Cas9: uma enzima (nuclease) que atua como um par de “tesouras” que pode cortar as duas fitas do DNA em um local específico no genoma.

RNA guia (gRNA): um pequeno pedaço de sequência de RNA (com cerca de 20 bases de comprimento) localizada dentro de uma estrutura de RNA mais longa. Essa molécula de RNA “guia” a Cas9 para a parte do genoma que deverá ser cortada.



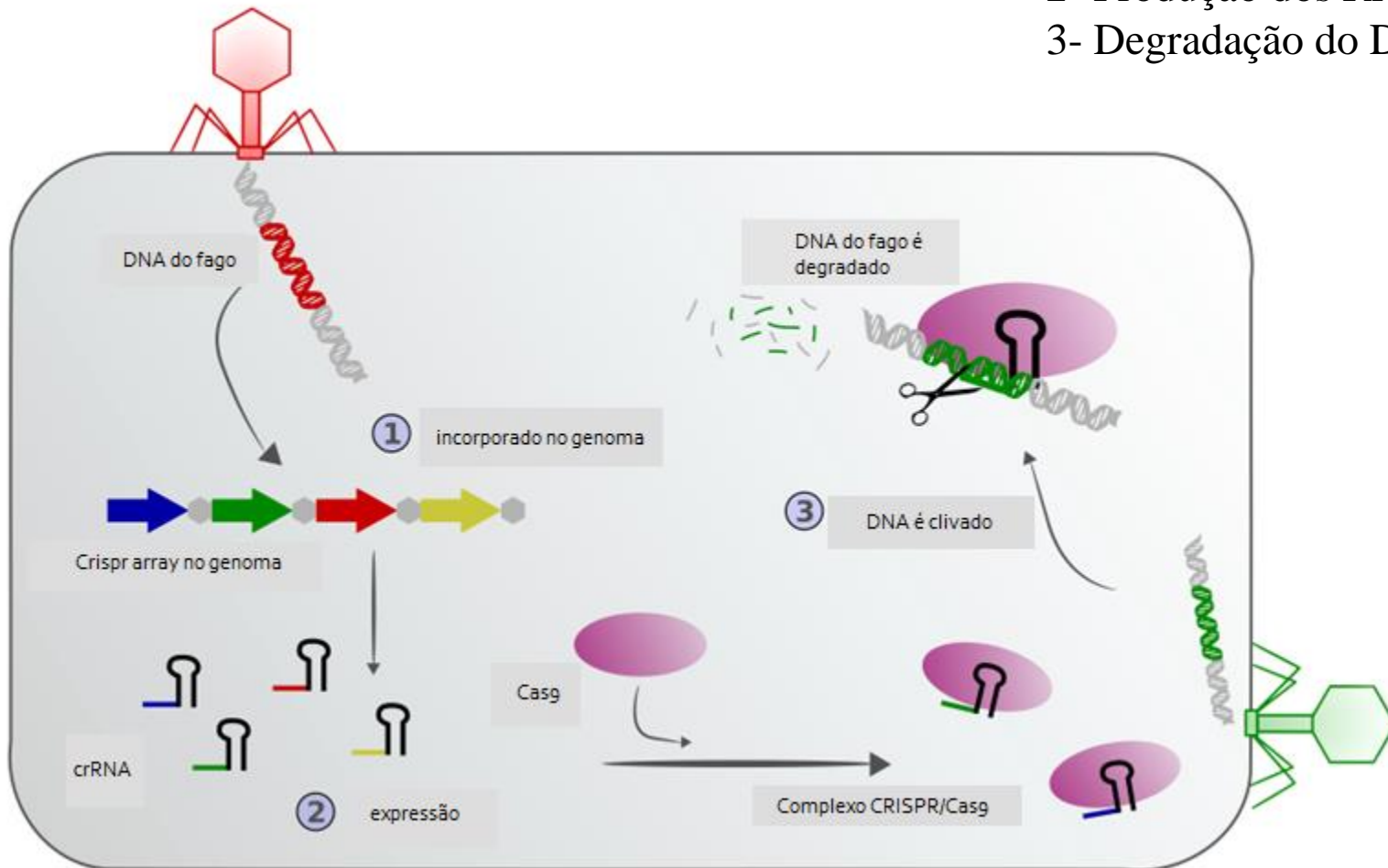


The CRISPR Craze  
SCIENCE  
23 Aug 2013  
Vol 341, Issue 6148  
pp. 833-836

Bactérias como a *Streptococcus thermophilus* são utilizadas para fazer iogurtes e queijos. Mas certos vírus – bacteriófagos podem debilitar a bactéria, causando estragos na qualidade ou quantidade dos alimentos que ela ajuda a produzir. Em 2007, cientistas da Danisco, uma empresa de ingredientes alimentares sediada em Copenhague, agora propriedade da DuPont, descobriram uma forma de aumentar as defesas destas bactérias a fagos. Expuseram a bactéria a um fago e mostraram que isso essencialmente a vacinava contra esse vírus (Science, 23 de março de 2007, p. 1650). O truque permitiu à DuPont criar cepas de bactérias mais resistentes para a produção de alimentos. Também revelou algo fundamental: **as bactérias têm uma espécie de sistema imune adaptativo, que lhes permite lutar contra ataques repetidos de fagos específicos.**

# Imunidade mediada por CRISPR/Cas em procariotos

- 1- Aquisição do DNA viral
- 2- Produção dos RNAs guias
- 3- Degradação do DNA invasor



# CRISPR-Cas 9

(Conjunto de Repetições Palindrômicas Regularmente Espaçadas em associação com a nuclease Cas9)



Francisco Mojica  
Microbiologist who discovered  
and named **CRISPR**

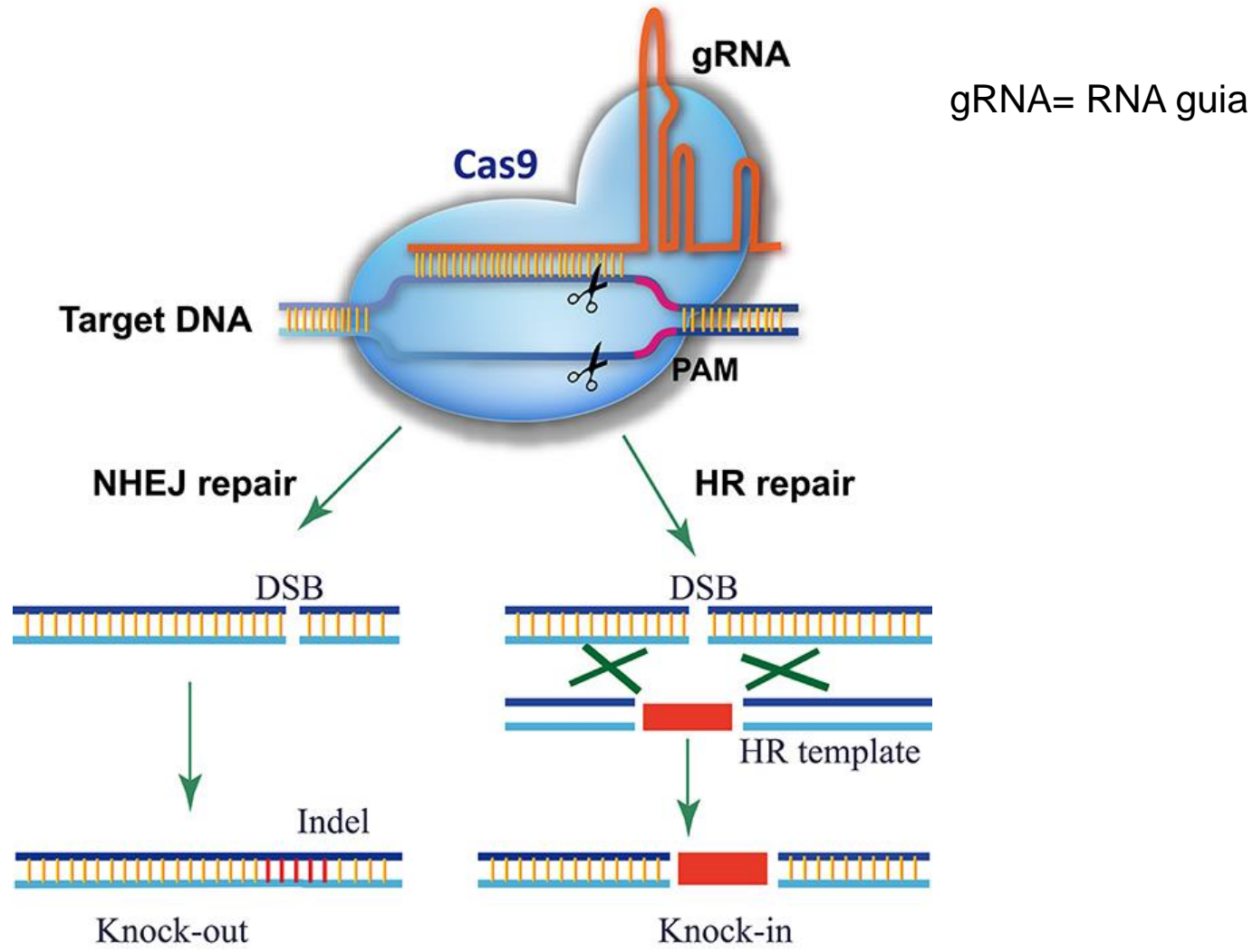
**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced  
**S**hort **P**alindromic **R**epeats



Credit: Alexander Heinel/Picture Alliance/DPA

Jennifer Doudna and Emmanuelle Charpentier showed that the system could be programmed to cut specific sites in isolated DNA. They shared the 2020 Nobel Chemistry Prize.

# Edição de genoma utilizando CRISPR/Cas





## Limitações:

- muitas pesquisas ainda são necessárias para avaliar a eficiência e, principalmente, a segurança de utilizar essa técnica em humanos.
- “off-targets” (fora do alvo): geração de mutações indesejadas.
- edição do DNA levanta muitas questões éticas.

He Jiankui alegou ter modificado um gene (o CCR5) de embriões que foram implantados em uma mulher e resultaram no nascimento de duas crianças com uma alteração que as torna resistentes à infecção por HIV.

<https://revistapesquisa.fapesp.br/chines-e-suspenso-por-ter-criado-bebes-com-gene-alterado/>



## **Vantagens:**

- Simplicidade e facilidade em desenhar o alvo (complexo Cas com sequência de RNA);
- Edições podem ser realizadas em mais de um gene ao mesmo tempo;
- Mais barato que métodos anteriores de edição de genoma.



# CRISPR/Cas como método potencial para tratamento de doenças genéticas ex hemoglobinopatias

The screenshot shows a web browser window with two tabs: 'Caixa de entrada (204) - bettina...' and 'The world's first CRISPR therapy...'. The address bar shows the URL 'nature.com/articles/d41587-023-00016-6'. The page content includes navigation links like 'Explore content', 'About the journal', 'Publish with us', and 'Subscribe'. The breadcrumb trail is 'nature > nature biotechnology > news > article'. The article is dated 'NEWS | 21 November 2023' and has the headline 'The world's first CRISPR therapy is approved: who will receive it?'. The sub-headline reads: 'The go-ahead for Vertex's gene editing therapy in sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia is a historic milestone, but this one-time treatment is costly.' The author is 'Cormac Sheridan' and there are social media icons for Twitter, Facebook, and Email. A blue-tinted image of a cell is partially visible at the bottom of the article preview.



A color-enhanced scanning electron microscope image of red blood cells distorted by sickle-cell disease. Credit...Omikron/Science Source

Ver vídeos!!

<https://www.youtube.com/watch?v=4YKFw2KZA5o>

<https://www.youtube.com/watch?v=2pp17E4E-O8>