
Introdução a Biotecnologia

— Biotecnologia Molecular —

Docente: Geovani de Oliveira Ribeiro, Dr.

Programa da aula

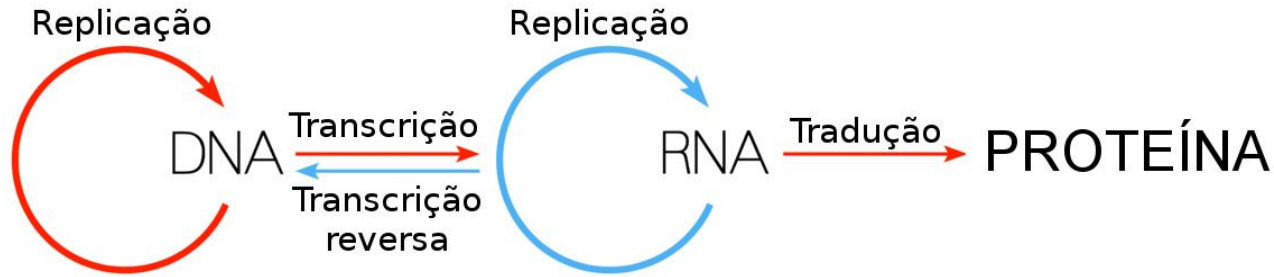
- 1) Dogma Central da Biologia Molecular
- 2) Diagnóstico Molecular
- 3) Terapia Gênica

Dogma Biologia molecular



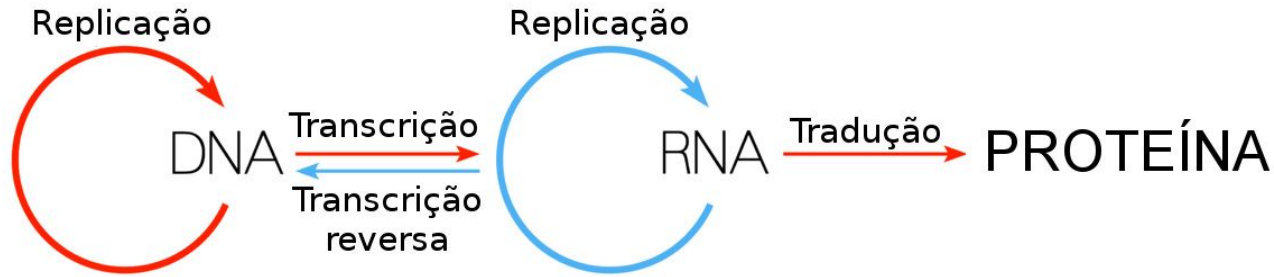
- Imagina que cada célula é uma cozinha
- DNA é o livro de receitas (fonte de toda informação biológica (exceto para alguns vírus)).
- O DNA precisa ser replicado em toda multiplicação de célula.

Dogma Biologia molecular



- Ajudante do Chef de cozinha (transcreve a receita (informação - comando) do Chef principal e leva para o restante da célula -> transcrição
- o RNA é um nucleotídeo de fita simples, enquanto DNA é fita dupla.

Dogma Biologia molecular



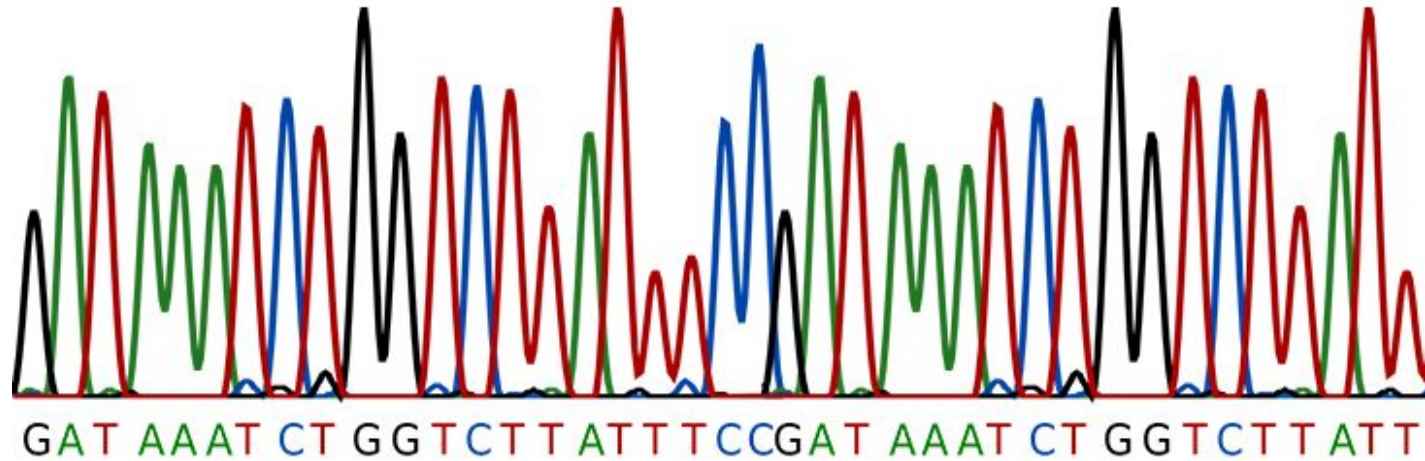
- A receita transcrita (RNA) chega nas fábricas (no fogão) para produzir as moléculas.
- Além da receita transcrita, entram outros ingredientes, que hoje não iremos abordar.
- Esse processo de transformar a receita transcrita em moléculas, chama-se tradução (pois estamos trabalhando apenas com informação de nucleotídeo e passamos a usar aminoácido, que são ingredientes essenciais para formular a proteína).
- A proteína é o resultado de todo trabalho dessa cozinha: é a macromolécula mais abundante em célula (50% da massa).
 - Proteína -> enzimas (catalisam reações, anticorpos, transporte oxigênio) - Iremos falar mais de proteína na aula de engenharia de proteína

Diagnóstico Molecular

O que é o diagnóstico?

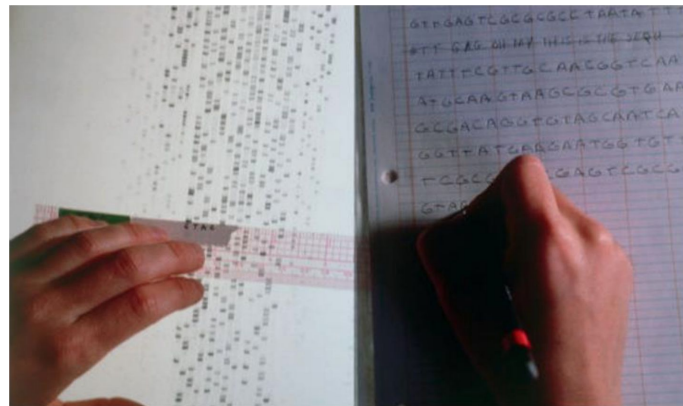
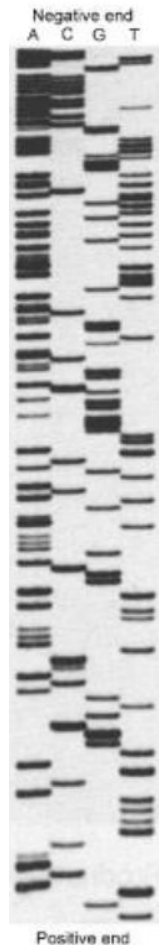
- Processo de identificar condição (boa ou ruim).
- Pode-se utilizar várias “fontes” (moléculas-alvos - biomarcador - para um diagnóstico)
 - Exemplos: Sequenciamento DNA; PCR; ELISA; Western and Southern blotting
- Uma das forma de identificar algo é o DNA
- Nem toda mudança no DNA tem mudança no fenotípica, e nem toda mudança fenotípica é mudança no DNA... mas existem muuuiitttas mudanças que são associadas entre DNA e fenótipo!

Sequenciamento de DNA



Sequenciamento de DNA

Frederick Sanger em 1970



Sequenciamento de DNA

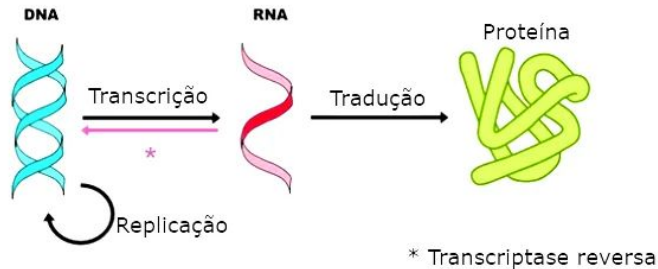
Sequenciadores automáticos



Sequenciamento de DNA

Importância do sequenciamento

Identificação de função e estrutura dos genes e proteínas

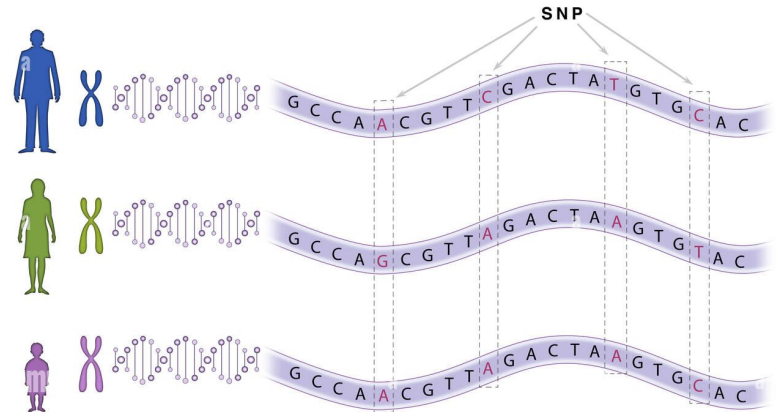


Exemplo:

- Angelina Jolie (doença)
- Marcadores outras características
- Vírus (**mutações** -> variantes)

Identificação de marcadores para determinadas características (relação causa x efeito) -> (nem sempre)

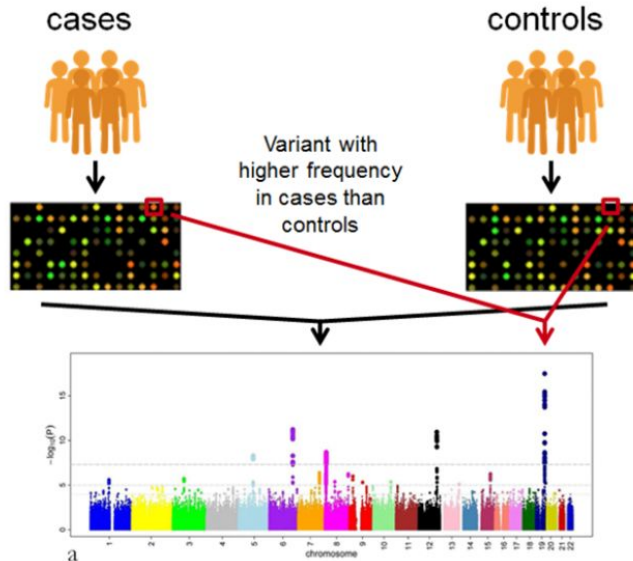
Conceito: “mutação”



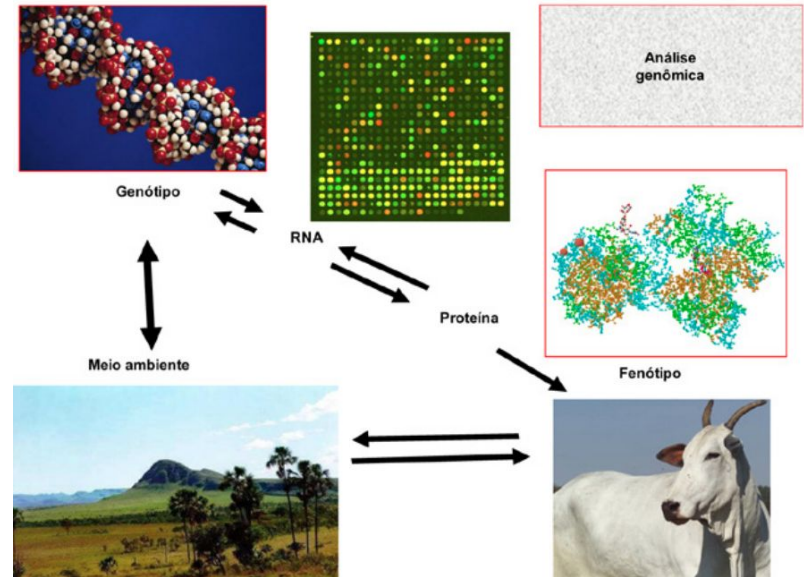
Sequenciamento de DNA

Importância do sequenciamento

Genética Qualitativa (presença/ausência) e Quantitativa (maior ou menor)

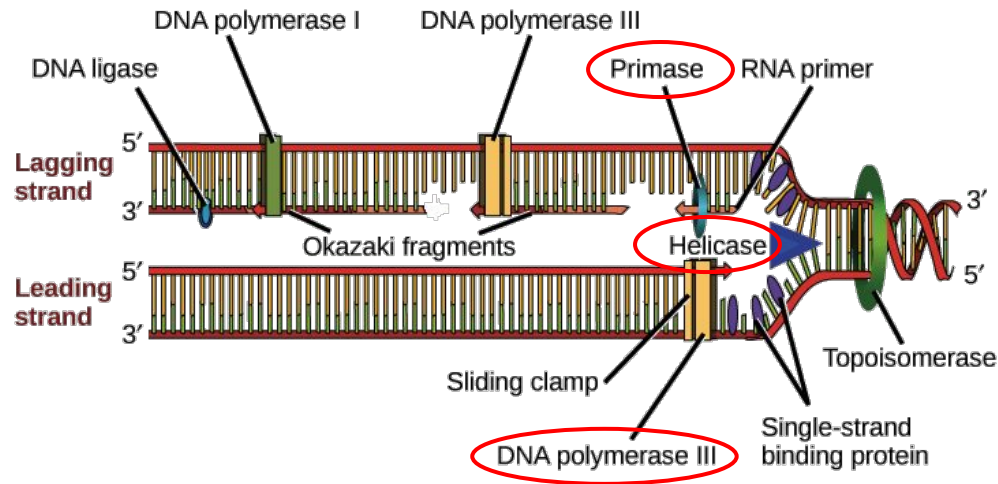


Melhoramento Genético Animal/Vegetal



PCR (Polimerase Chain Reaction)

- **Amplificação** de um segmento específico de DNA dentro de um genoma (3 bilhões pb)
- Muitas “fotocopiadora” do genoma
- Cópias “*in vitro*” usando elementos básicos do processo de replicação natural do DNA.



PCR (Polymerase Chain Reaction)

- Inventada* por Kary Mullis em 1983
- Primeira publicação em 1985 (Methods in Enzymology)
- Recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1993

PCR (Polymerase Chain Reaction)

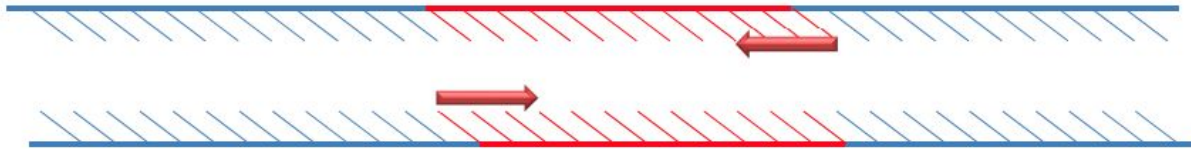
Principais componentes:

- Molécula de DNA molde (alvo): genoma que será amplificado (bactéria, vírus, amostras ambientais, animais)
- DNA Polimerase: enzima que “copia” (replica) o genoma
- Primers (iniciadores) -> curtas sequências de dNA que identificam a região de interesse (é necessário conhecer a região que será amplificada).
- Reação em cadeia (exponencial) -> 2, 4, 8, 16, 32 (fazer esquema)

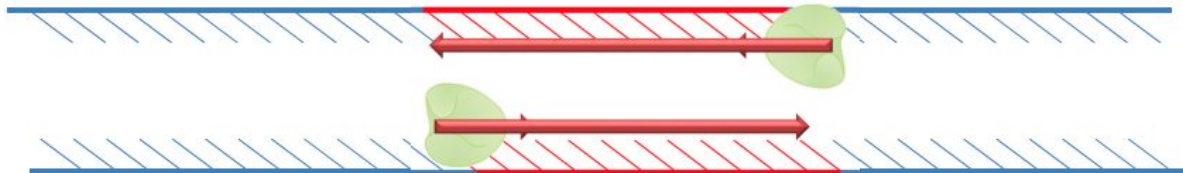
Desnaturação



Hibridização dos iniciadores



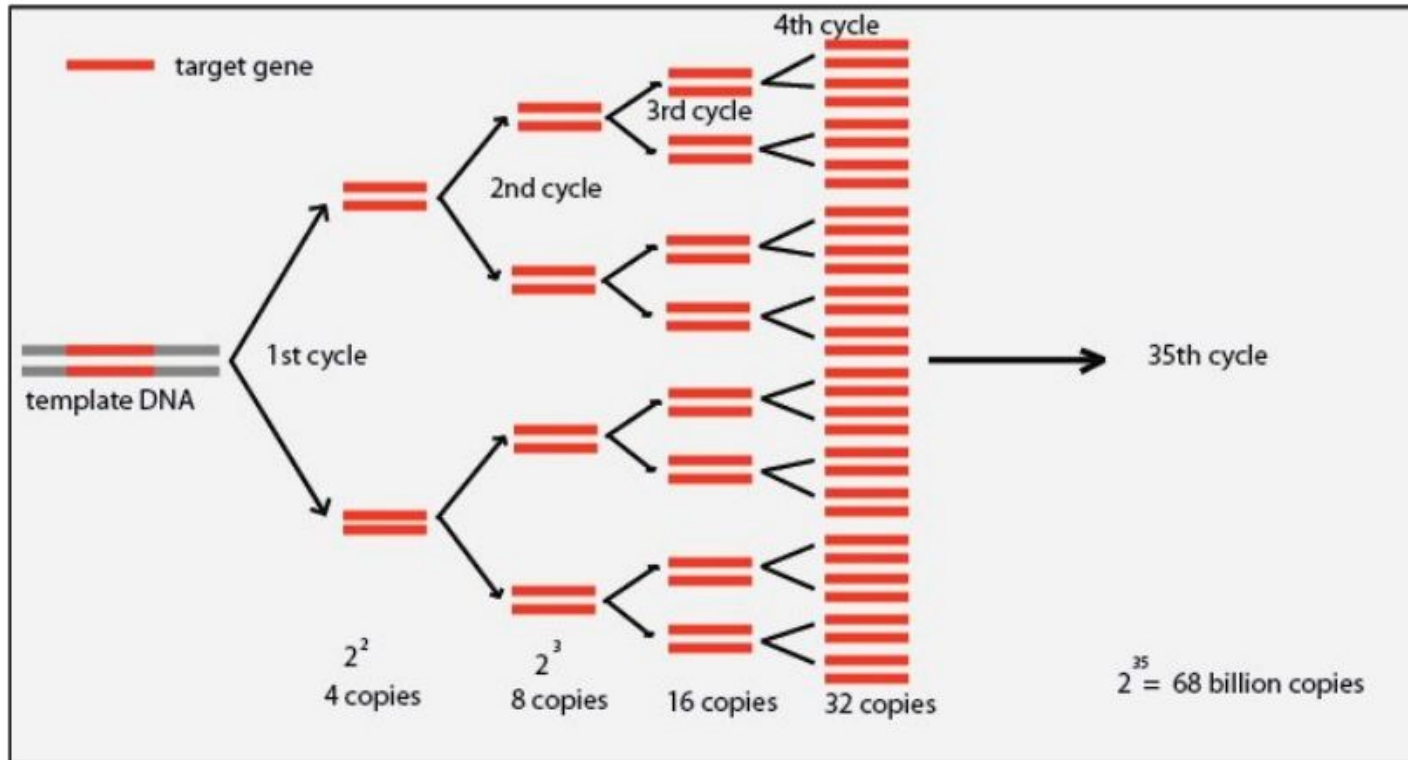
Amplificação



Amplificação Cíclica



Amplificação Cíclica



Aplicações da PCR

- Obtenção de segmentos de DNA de interesse para clonagem molecular (obtenção de proteínas recombinantes).
- Detecção de infecção/contaminação por bactérias, fungos ou vírus em amostras biológicas, água, solo e alimentos.
- Determinação da quantidade de material genético (Expressão Gênica, e.g. Carga viral).

Terapia Gênica

Terapia Gênica

Procedimento destinado a introduzir em um organismo, com o uso de técnicas de DNA recombinante, genes sadios (denominados “genes terapêuticos”) para substituir, manipular ou suplementar genes inativos ou disfuncionais.

Utilização de material genético para inserção em células de um indivíduo com fins terapêuticos

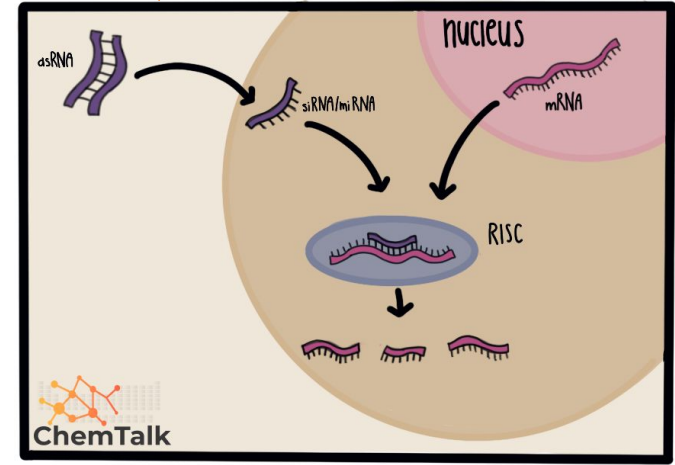
Técnicas

- Uso de genes (DNA) específicos e funcionais para substituição de genes defeituosos
- Utiliza RNA de interferência para silenciar algum gene, geralmente defeituoso

Técnicas

RNA Interferência (Silenciamento Gênico)

- Naturalmente os RNA de interferência são usados pelos organismos para ligar/desligar genes.
- Existe uma sinalização natural para degradar toda estrutura de dsRNA (vírus).
- Insetos é o principal sistema de combate a infecções virais.
- Biotecnologia -> construção de RNA que interfira em um RNA mensageiro, inibindo a sua ação

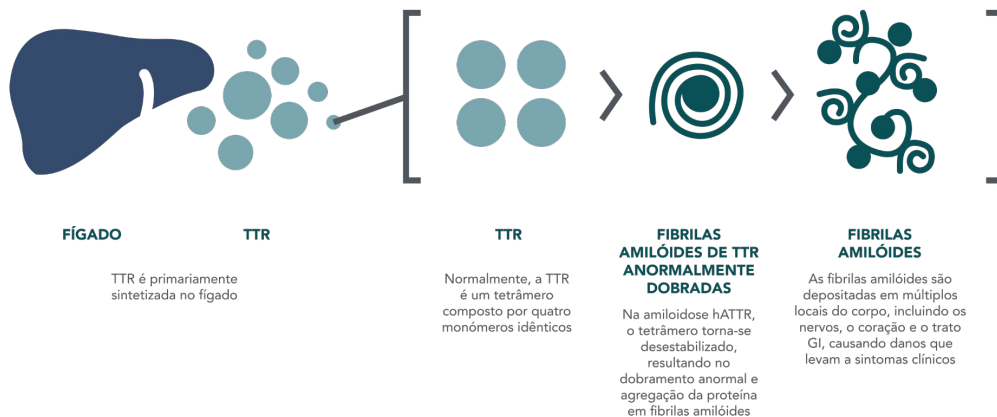


Ex: tomate transgênicas resistente ao vírus do tabaco; Inibição de um gene defeituoso; inibição de um gene indesejado (plantas) -> batata com silenciamento da **Solanina (subst. tóxica)**

RNA Interferência (Silenciamento Gênico)

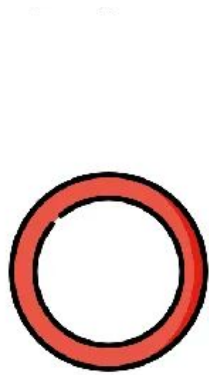
Em 2020, a ANVISA aprovou o primeiro medicamento baseado na tecnologia de RNAi

onpattro
(patisirana sódica)

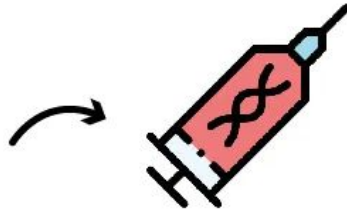


Vetores

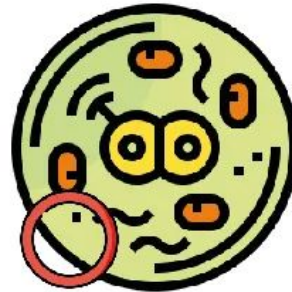
- Plasmídeo



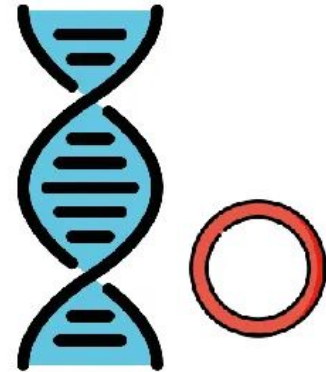
1. É usado um DNA circular (plasmídeo) contendo o gene que o paciente precisa



2. A terapia gênica é aplicada no paciente



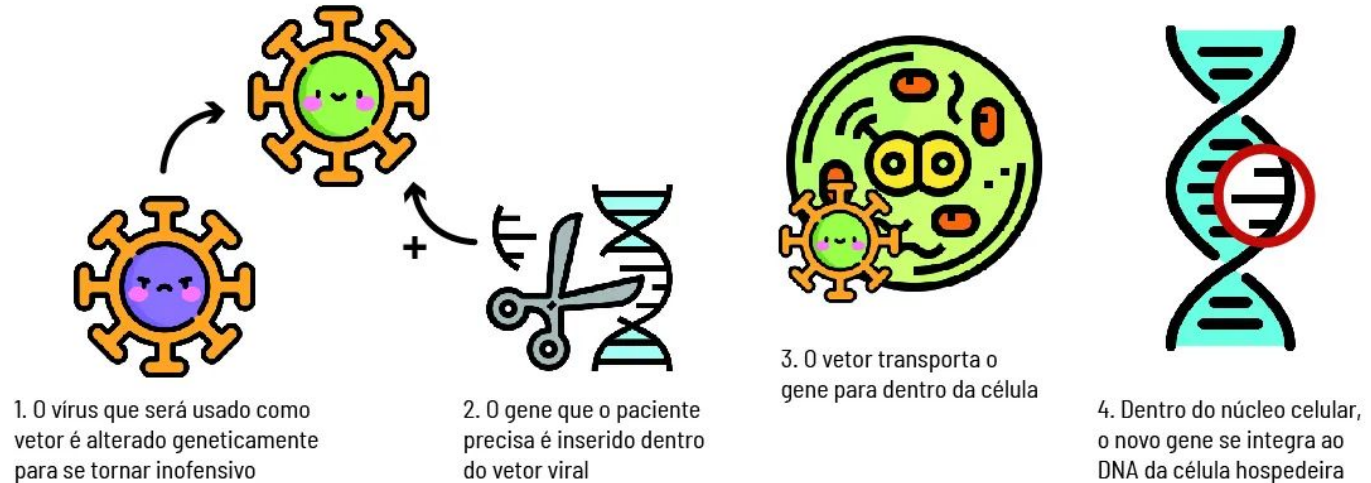
3. O vetor transporta o gene para dentro da célula



4. Dentro do núcleo celular, o novo gene **não** se integra ao DNA da célula hospedeira

Vetores

- Viral



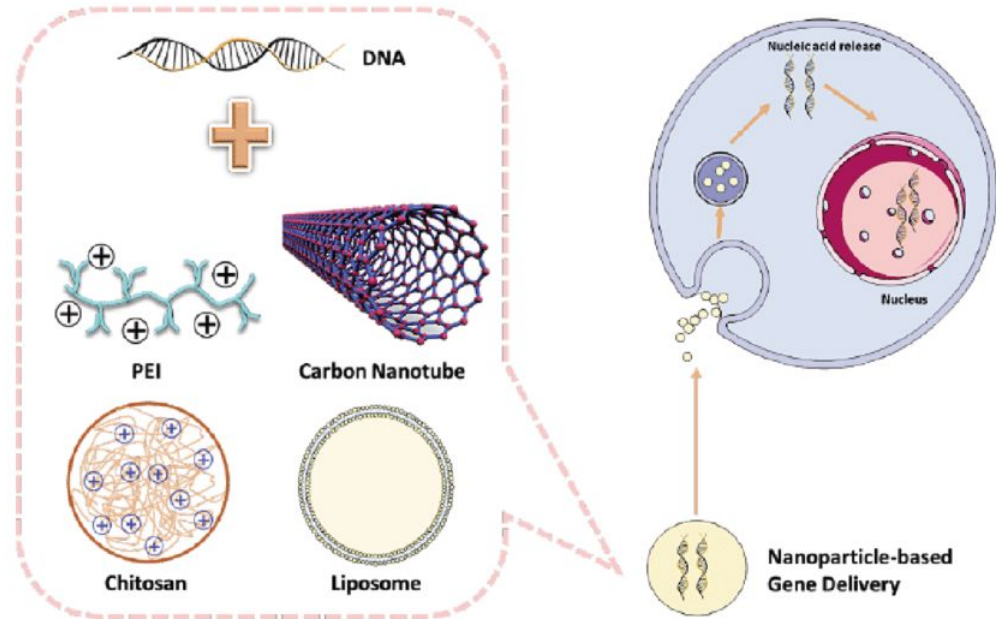
- Adenovírus (aprox 50 tipos distintos - ex: vírus que causam faringites ou conjuntivites).
- Retrovírus (ex: HTLV - causador de um tipo de leucemia e HIV)
- Adenovírus-associado

Vetores

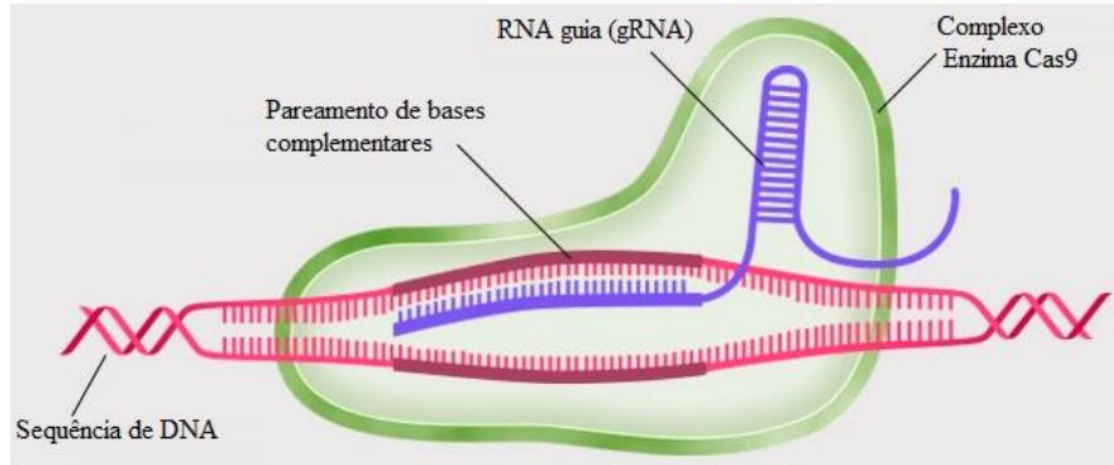
- Nanoestruturados

- Polímeros que formam redes que prendem um gene e soltam sua carga quando penetram nas cells;

- Vesículas de lipídios contendo DNA, capazes de fundir com a membrana das cells, liberando seu conteúdo no interior destas.



CRISPR/Cas9



Aplicações CRISPR/Cas9

CNN Brasil

Reino Unido é primeiro país a aprovar tratamento que usa edição genética

O Reino Unido tornou-se o primeiro país a conceder aprovação regulamentar a um tratamento médico envolvendo uma ferramenta de edição...

17 de nov. de 2023



O Globo

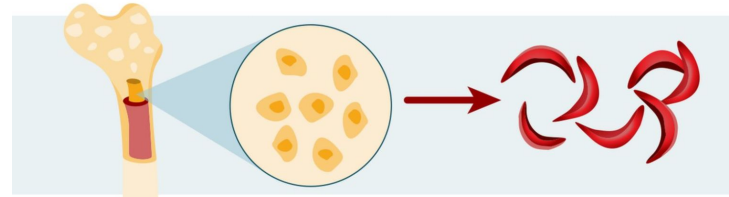
'Nova era na medicina': EUA aprovam 1º terapia com edição genética; entenda

Técnica que permite realizar 'recortes' no DNA, CRISPR rendeu o Nobel de Química a uma dupla de cientistas em 2020.

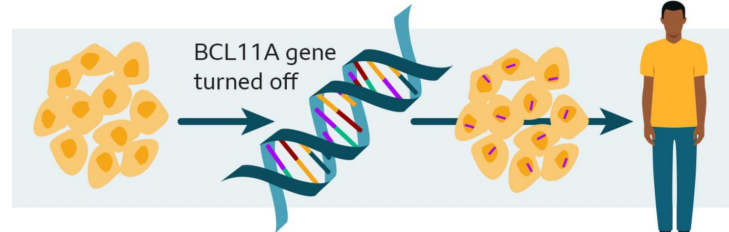
8 de dez. de 2023



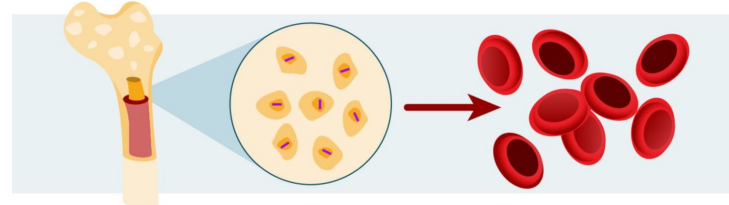
How the treatment works



- 1 Jimi's stem cells in his bone marrow make diseased haemoglobin that can make red blood cells sickle-shaped



- 2 Stem cells extracted 3 Stem cells genetically modified 4 Genetically engineered stem cells given to Jimi



- 5 Engineered stem cells make healthy fetal haemoglobin and normal red blood cells

Terapias Gênicas (terapias avançadas) aprovadas no Brasil (ANVISA)

Terapia (Ano aprovação)	Descrição
Luxturna (2020)	Tratamento decorrente de distrofia hereditária da retina devido falha no gene RPE65. Ao entrar em contato com as células degeneradas, o vírus adeno-associado (AAV) libera seu material de DNA que é incorporado ao organismo, onde substitui a parte que está doente pelo gene sadio e melhora o funcionamento celular.
Zolgensma (2020)	Pacientes pediátricos abaixo de 2 anos com atrofia muscular espinhal (AME), com mutações bialélicas do gene SMN1. consiste em capsídeos do vírus AAV9 que contém uma transgene SMN1 junto com promotores sintéticos. Após a administração, o vetor viral AAV9 entrega o transgene SMN1 aos neurônios motores afetados, onde leva a um aumento na proteína SMN.
Carvykti (2022)	Pacientes que vivem com mieloma múltiplo utilizando terapia CAR-T. Linfócitos T do indivíduo são coletados e com uso de lentivírus (HIV) modificados um novo gene que contém uma proteína (receptor antígeno quimérico - CAR) é inserido e direciona as células T a matarem as células do câncer.

Terapias Gênicas (terapias avançadas) aprovadas no Brasil (ANVISA)

Kymriah (2022)	Paciente com leucemia linfoblástica aguda (LLA). O Kymriah® (CTL019) é uma tecnologia de CAR-T que tem como alvo as células que expressam CD19.
Yescarta (2022)	Paciente com linfoma de grandes células B ou linfoma folicular, dois tipos de linfoma não-Hodgkin. O Yescarta é uma tecnologia de CAR-T que tem como alvo as células que expressam CD19.
Tecartus (2023)	Paciente com linfoma de células do manto. Também baseado na tecnologia de CAR-T.
Roctavian (2024)	Pacientes adultos com hemofilia A grave. O produto consiste em um vetor viral seguro (Adenovirus-associado 5) que transporta um gene funcional para o Fator VIII de coagulação.