

CRISPR/Cas9 como perspectiva de cura para o *Diabetes mellitus* tipo 1

CRISPR / Cas9 as a healing perspective for *Diabetes mellitus* type 1

CRISPR / Cas9 como perspectiva curativa para la *Diabetes mellitus* tipo 1

Recebido: 29/11/2020 | Revisado: 04/12/2020 | Aceito: 11/12/2020 | Publicado: 14/12/2020

Milena Roberta Freire da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0203-4506>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: milena.freire@ufpe.br

Karolayne Silva Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2627-7385>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: karolayne.silvasouza@ufpe.br

Milena Danda Vasconcelos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7838-9018>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: milenadanda@gmail.com

Kaleen Massari Leite

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5755-5419>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: k_massari@hotmail.com

Jaqueline dos Santos Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5189-592X>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: jaquelinnyasilva@hotmail.com

Diego Canuto Bispo da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5990-0757>

Centro Universitário do Rio São Francisco, Brasil

E-mail: canutodiego13@gmail.com

Kleber Ribeiro Fidelis

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2507-1468>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: kleberfidelis0@gmail.com

Rodrigo Reges dos Santos Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0141-5649>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: rodrigoregesufpe@gmail.com

Graziele dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5662-6668>

Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana, Brasil

E-mail: grasantosbio@gmail.com

Renata Pereira Lima da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5784-8959>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: renata_pereira_brasil@outlook.com

Filipe Silva Nunes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5732-9099>

Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana, Brasil

E-mail: fsnunes94@gmail.com

Leandro Paes de Brito

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3440-6431>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: leandropaes02ufpe@gmail.com

Felicson Leonardo Oliveira Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5256-6768>

Colégio Nobre de Feira de Santana, Brasil

E-mail: felicsonleonardo@hotmail.com

Maria Betânia Melo de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5188-3243>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: mbetaniam2008@gmail.com

Resumo

Introdução O Diabetes mellitus do tipo 1 (DM1), é considerado uma doença autoimune, crônica, multifatorial, que envolve a destruição progressiva das células β das ilhotas pancreáticas, sendo estas responsáveis pela produção de insulina, resultando assim na perda

da produção e secreção da mesma. Estima-se que mais de 30 mil brasileiros sofram desta patologia. Três mecanismos são responsáveis pela destruição destas células: suscetibilidade genética, autoimunidade e fatores ambientais. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi realizar um levantamento acerca das principais perspectivas de cura desta doença utilizando o sistema CRISPR/Cas9. Metodologia: Trata-se de uma revisão bibliográfica com buscas nas bases eletrônicas nacionais e internacionais na língua portuguesa e inglesa. Resultados: Visto que esta patologia ainda não possui cura, apenas tratamento, o sistema CRISPR/Cas9 surge como uma terapia promissora, assim como a terapia com células-tronco mesenquimais pluripotentes (MSC), as quais possui a funcionalidade, principalmente, de reparação e sobrevivência de células β das ilhotas pancreáticas, as MSCs possuem a capacidade de modificação do microambiente das áreas de lesão pancreática, anulando a destruição autoimune contra as células β podendo restaurar a normoglicemia do paciente. Conclusão: Tendo em vista que esta é uma patologia de cunho genético, o CRISPR/Cas9 associado a terapia com células mesenquimais pluripotentes vem se mostrando como uma ferramenta versátil e eficaz no tratamento do DM1. No entanto, faz-se necessárias novas pesquisas capazes de induzir estratégias para o melhoramento de alterações genéticas e maior eficiência do efeito terapêutico.

Palavras-chave: CRISPR/Cas9; Imunologia do DM1; Tratamento.

Abstract

Introduction: Diabetes mellitus type 1 (DM1) is considered an autoimmune, chronic, multifactorial disease, which involves the progressive destruction of β cells in pancreatic islets, which are responsible for the production of insulin, thus resulting in the loss of production and secretion of same. It is estimated that more than 30 thousand Brazilians suffer from this pathology. Three mechanisms are responsible for the destruction of these cells: genetic susceptibility, autoimmunity and environmental factors. In this sense, the objective of this study was to carry out a survey about the main perspectives of cure of this disease using the CRISPR / Cas9 system. Methodology: This is a bibliographic review with searches in national and international electronic databases in Portuguese and English. Results: Since this pathology still has no cure, only treatment, the CRISPR / Cas9 system emerges as a promising therapy, as well as therapy with pluripotent menenchymal stem cells (MSC), which have the functionality, mainly, of repair and survival of β cells from pancreatic islets, MSCs have the ability to modify the microenvironment of the areas of pancreatic injury, canceling the autoimmune destruction against β cells and can restore the patient's normoglycemia.

Conclusion: Bearing in mind that this is a pathology of a genetic nature, CRISPR / Cas9 associated with therapy with pluripotent mesenchymal cells has been shown to be a versatile and effective tool in the treatment of DM1. However, there is a need for further research capable of inducing strategies for the improvement of genetic alterations and greater efficiency of the therapeutic effect.

Keywords: CRISPR / Cas9; Immunology of DM1; Treatment.

Resumen

Introducción: La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) se considera una enfermedad autoinmune, crónica, multifactorial, que implica la destrucción progresiva de las células β de los islotes pancreáticos, responsables de la producción de insulina, resultando en la pérdida de producción y secreción de mismo. Se estima que más de 30 mil brasileños padecen esta patología. Tres mecanismos son los responsables de la destrucción de estas células: susceptibilidad genética, autoinmunidad y factores ambientales. En este sentido, el objetivo de este estudio fue realizar una encuesta sobre las principales perspectivas de curación de esta enfermedad utilizando el sistema CRISPR / Cas9. **Metodología:** Se trata de una revisión bibliográfica con búsquedas en bases de datos electrónicas nacionales e internacionales en portugués e inglés. **Resultados:** Dado que esta patología aún no tiene cura, solo tratamiento, el sistema CRISPR / Cas9 emerge como una terapia prometedora, así como una terapia con células madre pluripotentes mesenquimales (MSC), que tienen la funcionalidad, principalmente, de reparación y supervivencia de las células β de los islotes pancreáticos, las CMM tienen la capacidad de modificar el microambiente de las áreas de lesión pancreática, cancelando la destrucción autoinmune contra las células β y pueden restaurar la normogluemia del paciente. **Conclusión:** Teniendo en cuenta que se trata de una patología de carácter genético, CRISPR / Cas9 asociado a la terapia con células mesenquimales pluripotentes ha demostrado ser una herramienta versátil y eficaz en el tratamiento de la DM1. Sin embargo, existe la necesidad de una mayor investigación capaz de inducir estrategias para la mejora de las alteraciones genéticas y una mayor eficacia del efecto terapéutico.

Palabras clave: CRISPR / Cas9; Inmunología de DM1; Tratamiento.

1. Introdução

O diabetes mellitus do tipo 1 (DM1), é considerado uma doença endócrina autoimune, crônica, multifatorial, que envolve a destruição progressiva das células beta das ilhotas

pancreáticas, sendo estas responsáveis pela produção de insulina, resultando assim na perda da produção e secreção da mesma. As manifestações clínicas deste distúrbio metabólico surgem quando cerca de 80% das células beta pancreáticas são destruídas (Chhabra & Brayman, 2013; Sousa, Albernaz & Sobrinho, 2016).

Globalmente, 415 milhões de pessoas apresentam diabetes em todo o mundo, e aproximadamente 5% a 10% delas são portadoras do DM1. Estima-se que mais de 30 mil brasileiros sejam portadores desta forma da doença e que o Brasil ocupe o terceiro lugar em prevalência no mundo. A cada ano, 40.000 novos casos de DM1 são relatados e, em 2050, estima-se que 5 milhões de pessoas sofrerão da doença. Um aumento constante da incidência deste distúrbio metabólico foi relatado nos Estados Unidos, sendo este responsável por movimentar 14 bilhões de dólares em custos anuais com a saúde, considerando que esta é uma doença que pode apenas ser tratada, mas não curada, o que conduz a complicações de saúde perigosas e conseqüentemente a morte (Brandstetter, 2017; Oliveira et al., 2018).

O DM1 era anteriormente conhecido como Diabetes mellitus insulino dependente (DMID), diabetes juvenil ou com tendência à cetose. Esta forma da doença surge em geral até os 30 anos, sendo mais frequente antes dos 20 anos de idade, atingindo preferencialmente crianças, no entanto, pode afetar pessoas de qualquer idade. Caracteriza-se pela deficiência absoluta de insulina no pâncreas, provocando assim dificuldades ao fígado de compor e manter os depósitos de glicogênio que é vital para o organismo, provocando subsequentemente o acúmulo de açúcar no sangue, levando ao quadro de hiperglicemia. O DM1 foi considerado letal até que o papel e importância da insulina em relação à regulação do nível de glicose no sangue fossem descobertos, consecutivo a isto a terapia com insulina exógena foi desenvolvida. Nesta patologia pode observar-se mais comumente o início abrupto da doença, com um quadro clínico exuberante; em geral os indivíduos são magros ou de peso normal, todavia, este peso pode mostrar-se instável; sendo difícil o controle metabólico da doença, podendo ocorrer quadros de cetoacidose diabética (Lucena, 2007; Sesterheim, Saitovitch & Staub, 2007).

Etiologicamente, o DM1 pode ser classificado em 4 tipos: diabetes autoimune, sendo denominado DM1A, diabetes tipo 1 idiopático, também nomeado de DM1B, diabetes tipo 1 fulminante e diabetes duplo (LADY). Três mecanismos interligados são responsáveis pela destruição das células das ilhotas: suscetibilidade genética, autoimunidade e fatores ambientais. O principal desencadeador para o surgimento do DM1 é a suscetibilidade genética, estando relacionado ao complexo de histocompatibilidade, especificamente no cromossomo 6p21.3 (locus IDDM1), sendo este responsável por 40% ou mais da ocorrência

familiar dessa doença. Na autoimunidade do diabetes pode ser observado infiltrado linfocitário, em geral nas ilhotas em casos de início recente; sendo encontradas células T CD4⁺ e T CD8⁺. Por fim, os fatores ambientais também desempenham papel adicional na evocação da doença, como é o caso de infecções provocadas por vírus (Lucena, 2007; Gregory, Moore & Simmons, 2013; Sousa, Albernaz & Sobrinho, 2016).

O sistema CRISPR/Cas9, utiliza do pareamento de bases de um RNA guia (gRNA) para identificar sequências de DNA alvo e atividade catalítica da Cas9. O uso desta ferramenta permite executar modificações genéticas precisas e específicas por meio da indução de quebras duplas (DBSs, do inglês double-strand breaks) nas cadeias de DNA que estimulam os mecanismos celulares de reparo podendo gerar rearranjos genômicos, sendo considerada uma tecnologia versátil e que tem proporcionado abordagens promissoras. Sendo assim, considera-se que o sistema CRISPR/Cas9 é altamente promissor para a resolução de muitas doenças genéticas, como o caso do DM1, que não apresenta cura, sendo uma patologia que necessita de tratamento durante toda a vida (Vasconcelos & Figueiredo, 2015).

Diante da necessidade de uma melhor compreensão dos mecanismos que são responsáveis por desencadear o surgimento do DM1, faz-se necessário buscar novas informações a respeito desta patologia, assim como, entender as abordagens atuais utilizadas nos tratamentos, visto que a incidência desta desordem metabólica na população é crescente e o risco de levar a um quadro de morbimortalidade é alto.

Neste sentido, o objetivo deste estudo é realizar uma revisão bibliográfica fazendo um levantamento acerca das principais perspectivas que são abordadas atualmente sobre a cura desta doença utilizando o sistema CRISPR/Cas9, bem como uma análise da etiopatogênese e das novas estratégias de tratamento.

2. Metodologia

Trata-se de uma revisão bibliográfica de abordagem qualitativa do tipo exploratória narrativa. Foram realizadas buscas nas principais bases eletrônicas nacionais e internacionais: Pubmed, Eletronic Library On-line (SCIELO) Biblioteca virtual de saúde (Bvs), Science, Nature e Scholar Google (Google Acadêmico), selecionando artigos científicos sobre o tema, utilizando as palavras – chave: diabetes mellitus tipo 1, sistema CRISPR/Cas9, imunologia do DM1 e perspectivas de cura do DM1, no período de 2007 a 2020. Consideraram-se elegíveis os estudos da língua inglesa, portuguesa e espanhola, além de teses e dissertações.

3. Resultados e Discussão

3.1 Patogênese do *diabetes mellitus* tipo 1

O DM1 tem como característica níveis elevados de glicose no sangue (hiperglicemia), o que pode causar inúmeras complicações à saúde, incluindo cetoacidose, insuficiência renal, doença cardíaca, acidente vascular cerebral e cegueira. A DM1 geralmente acomete pessoas com idade inferior a 30 anos, sendo denominado também de diabetes juvenil, independente da idade do acometido. Este é um distúrbio autoimune crônico que acomete indivíduos geneticamente suscetíveis, tendo influência de gatilhos ambientais e autoimunidade. O próprio sistema imunológico do corpo ataca as células betas das ilhotas de Langerhans do pâncreas, destruindo ou danificando-as o suficiente para reduzir e, eventualmente eliminar a produção de insulina. Esse processo é marcado pelo desenvolvimento de autoanticorpos reativos de ilhotas, indicando o desenvolvimento de células T auto-reativas capazes de destruir as células beta, resultando assim em uma perda progressiva da função secretora de insulina. Clinicamente, o DM1 não se manifesta até que 80% - 90% das células beta tenham sido afetadas e conseqüentemente destruídas (Belle, Coppieters & Herrath, 2011; Atkison, 2012).

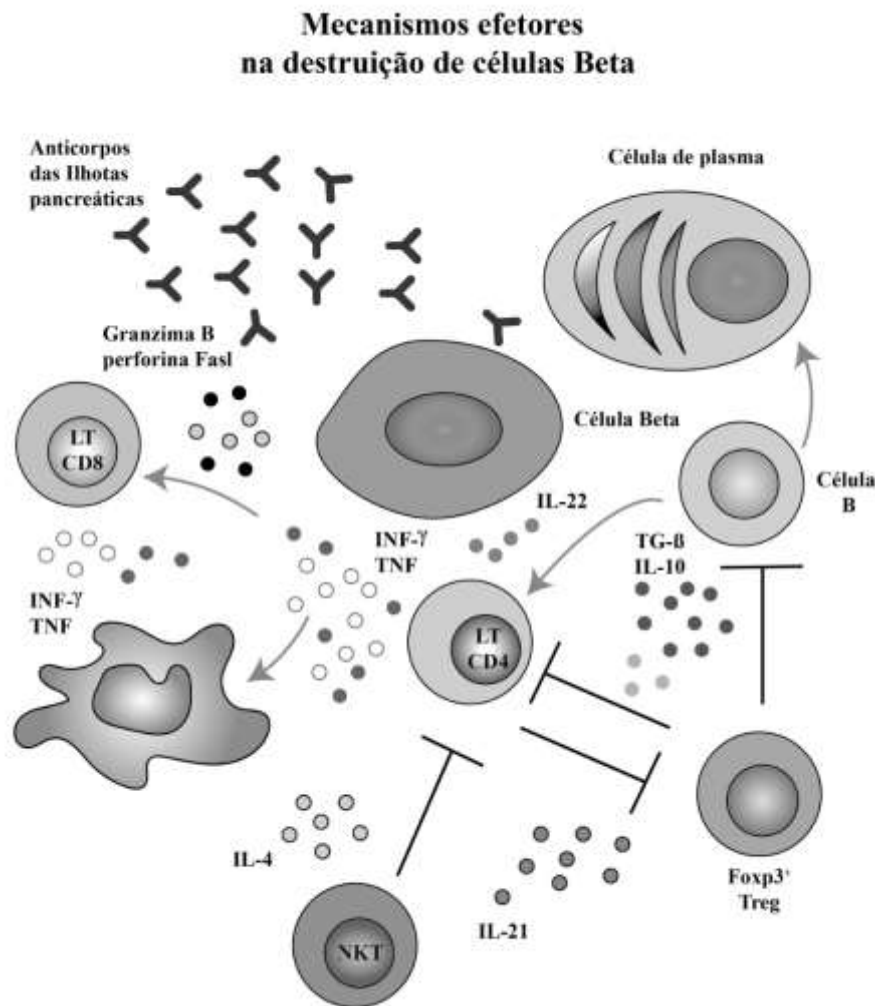
A evolução da doença não é aguda, apresentando-se como um processo de autoagressão, de evolução lenta, e que possivelmente desenvolve-se durante anos numa fase pré-clínica. A manifestação da doença acontece com a presença de hiperglicemia e cetose, onde as células secretoras de insulina já se encontram em número muito diminuído ou ausente (Lucena, 2007).

Uma combinação de fatores ambientais, predisposição genética e processos mediados por autoimunidade contribuem para a etiologia do DM1. Autoanticorpos contra antígenos das ilhotas são uma característica do desenvolvimento da doença. As Células Apresentadoras de Antígenos (APC's), como macrófagos são as primeiras a infiltrar as ilhotas, seguidas pelos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, células natural killer (NK) e linfócitos B, sendo estes importantes para a geração de uma resposta autoimune. A apresentação de autoantígenos das células beta pancreáticas pelos macrófagos e/ou células dendríticas para os linfócitos T CD4⁺, é o principal evento no processo de autoimunidade, visto neste distúrbio metabólico. Quando os macrófagos são ativados secretam citocinas que induzem a migração celular e estimulam vários tipos de células a secretarem radicais livres que são altamente tóxicos as células beta pancreáticas. Os linfócitos T CD8⁺ estão mais presentes no processo de insulite, que parece

ocorrer com mais intensidade em ilhotas onde existem células beta metabolicamente ativas. Após o reconhecimento dos autoantígenos pancreáticos, os linfócitos efetuam a destruição das células beta através do processo de citólise, provocando a liberação de perforinas e granzimas que também ajudam na indução da apoptose. Dessa forma, os macrófagos, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ agem sinergicamente na destruição destas células, como ilustrado na figura 1 (Sesterheim, Saitovitch & Staub, 2007; Chhabra & Brayman, 2013).

O linfócito T CD4⁺ quando ativado secreta várias citocinas, cuja função é promover a proliferação e diferenciação de linfócitos T e de outras células, como linfócitos B e macrófagos. A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon-gama (INF- γ) e interleucina 1 (IL-1) por células apresentadoras de antígenos e células T favorecem a iniciação e propagação da resposta inflamatória e autoimune no DM1. Os linfócitos B também participam da patogenia do DM1, seja apresentando autoantígenos, preferencialmente a ácido glutâmico descarboxilase ou, ainda, como plasmócitos secretores de autoanticorpos. Ao longo do tempo, as células betas vão diminuindo em número, assim como a intensidade do processo inflamatório (Sesterheim, Saitovitch & Staub, 2007).

Figura 1. Esquema representando os mecanismos imunes envolvidos na destruição de células beta no DM1.



Fonte: Adaptado Brandstette, (2017).

Sabe-se que a DM1 desenvolve mais em indivíduos com predisposição genética. Entretanto, a forma para herança dos genes de susceptibilidade para esta forma da doença ainda não está totalmente esclarecida. Os polimorfismos em cinco genes são conhecidos por influenciarem o risco de desenvolvimento da mesma, o *HLA-DQ α* , *HLA-DQ β* , *HLA-DR*, pré pró-insulina e o gene *PTN22*. Entre esses, os principais marcadores genéticos envolvidos na apresentação de antígenos das ilhotas e no controle da resposta imune ao DM1 são os loci *HLA-DQ/DR*. O locus de susceptibilidade mais crítico é a região do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) localizado no cromossomo 6, sendo que este fornece a maior contribuição com 60% dos casos para a susceptibilidade genética total. Os genes HLA da classe II

codificam moléculas que participam ativamente da apresentação de antígenos; acredita-se que diferentes apresentações de antígenos às células beta possam promover a auto reatividade. Os alelos DR e DQ da HLA classe II são os que estão associados mais fortemente à doença, em contrapartida, os alelos de classe I também tem sido interligado ao desenvolvimento do DM1, sendo os genes HLA-B e HLA-A os mais proeminentes (Brandstette, 2017).

A contribuição ambiental na etiologia do DM1 esta intimamente relacinada a numerosos agentes virais e bacterianos, produtos alimentares, fatores antropométricos, neurais e hormonais, assim como a contribuição deles para o desenvolvimento da autoimunidade e manifestações clínicas do DM1. Todavia, os vírus são os agentes mais relacionados ao surgimento desta doença, como é o caso dos enterovirus e os rotavirus, os quais possivelmente apresentam tropismo pancreático, conduzindo assim a uma lise direta ou imunomediada das células beta pancreáticas. A infecção viral leva a liberação de citocinas pró-inflamatórias, consituindo desta forma um fator central na perda de tolerância aos auto-antígenos e na ativação de linfócitos autorreativos, uma vez que, a auto-imunidade tem sido amplamente ligada à ação de citocinas pró-inflamatórias liberadas no local da lesão. O acontecimento imunológico inicial no desenvolvimento da doença decorrente da infecção viral, caracteriza-se pela produção de IFN- γ pelas células beta produtoras de insulina. A secreção da citocina está associada à expressão das moléculas de HLA de classe I e de classe II na superfície das células beta; por conseguinte a estes eventos ocorre à apresentação de autoantígenos pelas células beta pancreáticas aos linfócitos T auto reativos, dando início a cascata de processos inflamatórios, culminando na insulite (Sesterheim, Saitovitch & Staub, 2007; Atkinson, 2012; Silva, 2013).

3.2 Diagnóstico e Tratamento do DM1

Visto que o DM1 ocorre somente após grande parte das células beta terem sido destruídas, um pré-diabético é livre de sintomas. Os testes mais comumente indicados para determinar o nível de açúcar no sangue são a hemoglobina glicada (A1C) e a glicemia de jejum. No entanto, o teste da A1C é mais preciso quando relacionado ao critério de rastreio se avaliando os últimos meses. De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes 2015-2016 é necessário levar em consideração os valores da glicose plasmática também quando está se investigando esta patologia, como mostrado no Quadro 1. Assim como também deve se realizar uma triagem genética e pesquisa de autoanticorpos para que possa se estabelecer o

diagnóstico de DM1 com precisão (Brandstetter, 2017; Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019-2020).

Quadro 1. Valores de glicose plasmática (mg/dL) para diagnóstico de diabetes mellitus e suas estágios pré-clínicos.

	Glicose em jejum (mg/dL)	Glicose 2 horas após sobrecarga com 75g de glicose (mg/dL)	Glicose ao acaso (mg/dL)
Normoglicemia	< 100	< 140	
Pré-diabetes ou risco aumentado para DM	≥ 100 e < 126*	≥ 140 e < 200 [#]	
Diabetes estabelecido	≥ 126	≥ 200	≥ 200 com sintomas inequívocos de hiperglicemia

* Categoria também conhecida como glicemia de jejum alterada.

Categoria também conhecida como intolerância oral à glicose.

Fonte: ADAPTADO Sociedade Brasileira de Diabetes, (2019-2020).

Uma vez estabelecido o diagnóstico do DM1, os cuidados iniciais concentram-se em restaurar a euglicemia, na qual a terapia mais comum é a administração de insulina exógena, por seringas ou por uma bomba de insulina, uma vez que as células beta produtoras de insulina são destruídas e não conseguem produzi-la, se faz necessário injetá-la. Atualmente já existem formas de tratamento com métodos mais invasivos, como é o caso dos transplantes de pâncreas e de ilhotas. O transplante de pâncreas tornou-se um dos procedimentos mais comuns, no entanto, as taxas de aceitação do enxerto e a sobrevida do paciente são bastante baixas. Já o transplante de ilhotas surge como uma melhor opção de tratamento, pois ajuda a restaurar o controle glicêmico e a proteção contra eventos hipoglicêmicos graves. Entretanto, seu uso tem sido limitado devido à insuficiência dos recursos dos doadores, à rejeição de transplantes e a necessidade de imunossupressão vitalícia, uma vez que, também pode desencadear resposta inflamatória (Zhu et al, 2017; Brandstetter, 2017)

3.3 O Sistema CRISPR/Cas 9 e sua aplicabilidade no tratamento do DM1

O sistema CRISPR/Cas9 é uma das técnicas metodológicas de edição gênica, na qual é originada da imunidade adaptativa de procariontes. O mecanismo de sistema CRISPR/Cas9

possibilita a edição genética por meio do knockout (nocauteamento) e knock-in (integração de sequências gênicas exógenas), como também a substituição alélica do DNA alvo, tendo ação principalmente da endonuclease Cas9, em que possui a função de clivagem do DNA de dupla fita da célula alvo; um RNA guia, na qual é projetado para o reconhecimento de sequência-alvo do DNA em que quer ser modificado; e o DNA alvo em que se quer gerar modificações para corrigir mutações, gerando o funcionamento de proteínas inativas (Marraffin et al., 2010, Jinek et al., 2012, Cong et al., 2013, Vieira et al., 2016, Gonçalves & Paiva, 2017).

Este sistema é uma ferramenta ágil e tem como o primeiro passo de funcionamento a partir de uma molécula de RNA guia, na qual é introduzida numa célula em que se hibridiza com o DNA alvo nessa célula. O RNA guia realiza o reconhecimento do local da sequência específica do DNA em que se quer editar, servindo assim como um guia de localização se ligando a sequência do gene do DNA, formando assim um complexo. Em seguida, a endonuclease Cas9 tem seu papel de clivagem da sequência do DNA específico, a partir do reconhecimento desse complexo, e com o DNA clivado é ativado o sistema de reparo celular para reparar a fita dupla, tendo assim o resultado de processo podendo ser, por exemplo, o knock-in ou knockout do gene do DNA (Nodari et al., 2016; Gonçalves; Paiva, 2017).

A edição genômica com CRISPR/Cas9 pode melhorar terapias de tratamento do DM1, como por exemplo a terapia com células-tronco mesenquimais pluripotentes (MSC) (Geraldo et al., 2017; Gerace et al., 2017). Essa terapia possui a funcionalidade principalmente pela reparação e sobrevivência de células β das ilhotas pancreáticas de Langerhans, assim as MSCs possuem a capacidade de modificação do microambiente das áreas de lesão pancreática, anulando assim a destruição autoimune contra as células β e podendo restaurar a normoglicemia do paciente com DM1 (Gerace et al., 2017).

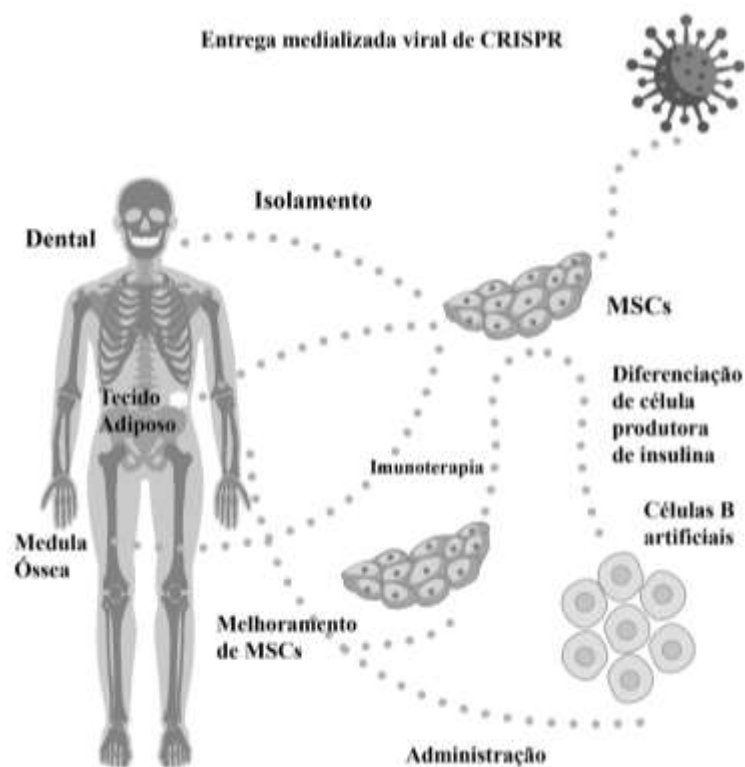
A utilização do sistema CRISPR/Cas9 pode mediar a diferenciação das células tronco mesenquimais pluripotentes e assim obter uma eficácia no tratamento da doença, junto com a ativação de genes envolvidos na produção de insulina (*PDX-1*, *NEUROD-1*, *MafA*) (Geraldo et al., 2017; Gerace et al., 2017).

Para o melhoramento da terapia com MSCs pelo sistema CRISPR/Cas9, precisa-se da inatividade da atividade catalítica da Cas9, e assim transformá-la em Cas9 deficiente (dCas9) para este ser manipulado. Sendo assim, essa dCas9 é fundido a um transativador (VP64 ou p300), na qual será dirigido pelo RNA guia ao local promotor dos genes *PDX-1*, *NEUROD-1*, *MafA*, etc., das MSCs e assim ser possível direcionar a ativação dos fatores de transcrição do pâncreas, assim como a diferenciação das MSCs em células produtoras de insulina. Os

isolados de células para aplicação do sistema CRISPR/Cas9 é obtido por fontes de tecido adulto, medula óssea etc., para cultura ex vivo (fora do organismo) (Gerace et al., 2017).

Assim com a modificação genética das MSCs pelo CRISPR/Cas9 consegue-se gerar células produtoras de insulina que é administrada sistematicamente ou por via subcutânea no paciente participante da terapia. (Gerace et al., 2017). De acordo com alguns estudos, a eficiência da utilização do CRISPR/Cas9 no direcionamento de MSCs no tratamento da DM1, representa uma taxa de melhora de 2% a 4% (Mali et al., 2013), sendo aumentada em 51% a 79%, quando utilizado de marcadores fluorescentes para a seleção de células com expressão da endonuclease Cas9 (Ding et al., 2013).

Figura 2. Isolamento das células mesenquimais pluripotentes.



Fonte: Adaptado Gerace et al., (2017).

4. Conclusão

A incidência de DM1 vem aumentando rapidamente e o tempo de início regredindo para idade mais jovem, devido a combinação de fatores genéticos, autoimunidade e fatores ambientais, com o principal mecanismo efetor desencadeado por uma reação autoimune. Embora as estratégias de tratamento corrijam a insulino dependência, como é o caso do

transplante de pâncreas e de ilhotas, recentemente tem surgido novas técnicas terapêuticas que possibilitam uma melhor forma de tratamento e um menor grau de rejeição do transplante, bem como viabiliza uma melhor sobrevida ao paciente portador desta patologia, como é o caso da utilização do sistema CRISPR/Cas9.

A terapia com sistema CRISPR/Cas9 associada à terapia com células tronco mesenquimais pluripotentes vem se mostrando promissoras e potenciais no tratamento da DM1. A técnica com o sistema CRISPR/Cas9 viabilizou o desenvolvimento de novas terapias e perspectivas de tratamentos para a doença, devido este sistema apresentar alta versatilidade, eficácia, especificidade e facilidade de uso.

A terapia de MSCs já vinha se demonstrando uma técnica de sucesso para o tratamento da DM1, com isso o sistema CRISPR/Cas9 proporcionou uma melhora na modulação dessa terapia. No entanto, faz-se necessárias novas pesquisas capazes de induzir estratégias para o melhoramento de alterações genéticas e maior eficiência do efeito terapêutico.

Referências

Atkinson, M. A. (2012). The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(11), a007641.

Van Belle, T. L., Coppieters, K. T., & Von Herrath, M. G. (2011). Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiological reviews*, 91(1), 79-118.

Brandstetter, T. Dissecting the Role of the IFIH1 Locus in Type 1 Diabetes using Genome Editing.

Chhabra, P., & Brayman, K. L. (2013). Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: from hype to hope. *Stem cells translational medicine*, 2(5), 328-336.

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.

Geraldo, G. R., & Silva, S. C. C. D. (2017). SISTEMA CRISPR-Cas COMO FERRAMENTA PARA PESQUISAS EM DIABETES: UMA REVISÃO.

Gregory J. M., Moore D. J., Simmons J. H. Type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Rev.* 2013 May;34(5):203-15. doi: 10.1542/pir.34-5-203.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, 337(6096), 816-821.

Lehuen, A., Diana, J., Zaccane, P., & Cooke, A. (2010). Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 501-513.

Lucena, J. B. S. (2007). Diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2. *Monografia]. São Paulo (SP): Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas.*

Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 181-190.

Nodari, R. O., Guerra, M. P., de Mesquita Dantas, A. C., Stefenon, V. M., & Klabunde, G. H. F. (2016). FIT 5806-BIOTECNOLOGIA.

Oliveira, J. E. P. D., & Vencio, S. (2017). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. *São Paulo: Editora Clannad*, 91.

Sociedade Brasileira de Diabetes. (2019). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020.

Sesterheim, P. A. T. R. Í. C. I. A., Saitovitch, D. A. V. I. D., & Staub, H. L. (2007). Diabetes mellitus tipo 1: multifatores que conferem suscetibilidade à patogênica auto-imune. *Scientia medica*, 17(4), 212-217.

Silva, H. P. V. D. (2013). *Estudo dos genes do complexo do antígeno leucocitário humano (hla) associados à susceptibilidade ao diabetes mellitus tipo 1* (Master's thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte).

de Sousa, A. A., Albernaz, A. C., & Sobrinho, H. M. R. (2016). Diabetes Melito tipo 1 autoimune: aspectos imunológicos. *Universitas: Ciências da Saúde*, 14(1), 53-65.

Vasconcelos, M. J. V., & Figueiredo, J. E. F. (2015). Tecnologia CRISPR-Cas para edição genômica. *Embrapa Milho e Sorgo-Docmentos (INFOTECA-E)*.

Vieira, G. V., Cecílio, N. T., Arruda, L. M., & Sales, K. U. (2016). Visão geral do mecanismo básico de ação. *Introdução à técnica de CRISPR. 1ª edição. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética*, 39-50.

Zhu, Y., Liu, Q., Zhou, Z., & Ikeda, Y. (2017). PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem cell research & therapy*, 8(1), 1-7.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Milena Roberta Freire da Silva – 25%

Karolayne Silva Souza – 5%

Milena Danda Vasconcelos Santos – 5%

Kaleen Massari Leite – 5%

Jaqueline dos Santos Silva – 5%

Diego Canuto Bispo da Silva – 5%

Kleber Ribeiro Fidelis – 5%

Rodrigo Reges dos Santos Silva – 5%

Graziele dos Santos – 5%

Renata Pereira Lima da Silva – 5%

Filipe Silva Nunes – 5%

Leandro Paes de Brito – 5%

Felicson Leonardo Oliveira Lima – 5%

Maria Betânia Melo de Oliveira – 15%