



O USO DA TERAPIA GÊNICA PARA O TRATAMENTO DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1

Ketlyn Miranda Marques¹, Leonardo Starling Albuquerque Cerqueira², Livia Maria Goldner Massariol³, Philipe Azevedo Dornelas⁴, Thaís Oliveira Freitas⁵, Victhória Giovanna D. Lacerda⁶

¹Graduando Medicina, UNIFACIG, Manhuaçu-MG, ketmiranda02@gmail.com;

²Graduando Medicina, UNIFACIG, Manhuaçu-MG, leo.sac@hotmail.com;

³Graduando Medicina, UNESC, Colatina-MG, liviagoldner17@gmail.com;

⁴Graduando Medicina, UNIFACIG, Manhuaçu-MG, philipeadornelas@gmail.com;

⁵Graduando Medicina, UNIFACIG, Manhuaçu-MG, thaisoliveirafreitas3@gmail.com;

⁶Graduando Medicina, UNIFACIG, Manhuaçu-MG, lacerdavicthoria@gmail.com;

Resumo: O sistema procariótico tipo II CRISPR-Cas9 permite uma edição gênica principalmente em patologias monogênicas, como diabetes tipo I. O principal objetivo consiste em entender o uso da terapia para o tratamento de pacientes de diabetes mellitus tipo I. Esse trabalho trata-se de uma revisão bibliográfica qualitativa, utilizando como base quinze (15) artigos pesquisados na plataforma de busca. Uma das principais vantagens da terapia é proporcionar cura para doenças que anteriormente não poderiam ser curadas, no entanto, apresenta desvantagens (falta de compreensão completa da doença) e, pode-se dizer que no tratamento para o diabetes a desvantagem é a escassez de tecido primário e a dificuldade de reproduzir as funções das células β . Essa terapia pode ser voltada para linhagem germinativa ou para células somáticas, terapia com células T, terapia gênica e células-tronco hematopoiética, terapia celular, terapia nanoestruturada e a CRISPR-Cas9. A CRISPR-Cas9 resume-se numa edição na sequência de DNA alvo-específico e pretende contribuir através da edição de genes a estimulação de uma produção de insulina que fará com que as células β produzam insulina novamente. Conclui-se então, que a terapia gênica para pacientes com diabetes tipo I pode contribuir para a cura e esse tratamento possui grandes expectativas, pois torna a vida do paciente um pouco mais normal e elimina os prejuízos que a insulina exógena provoca no indivíduo.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus 1; CRISPR; Terapia gênica; Autoimune; CRISPR-Cas 9;

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde.

THE USE OF GENE THERAPY FOR THE TREATMENT OF PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 1

Abstract: The prokaryotic system type II CRISPR-Cas9 allows gene editing predominantly in monogenic pathologies, such as diabetes I. The main objective is to understand the use of therapy for the treatment of patients with diabetes mellitus. This project was done through a qualitative bibliographic review using as a research base fifteen (15) articles in the main search platforms. One of the main advantages of therapy is to provide a cure for diseases that previously could not be cured, however, it has disadvantages (insufficient knowledge about the disease). When dealing with diabetes the disadvantage is a shortage of primary tissue and the difficulty of reproducing the functions of β cells. This therapy can be aimed at germline or somatic cells, T cell therapy, gene therapy and hematopoietic stem cells, cell therapy, nanostructured therapy and a CRISPR-Cas9. CRISPR-Cas9 resumes in an edition in the sequence of target-specific DNA and aims to contribute by editing genes to stimulate an insulin production that will make the β cells needed insulin again. It is concluded that a gene therapy for patients with type 1 diabetes can contribute to the cure and it has high expectations, as it makes the patient's life a little more normal and eliminates the damage that an exogenous insulin causes in the individual.

Keywords: Diabetes Mellitus 1; CRISPR; Gene therapy; Autoimmune; CRISPR-Cas9;

INTRODUÇÃO

Desde o século XVII, através da Revolução Científica, o homem vem explorando de maneira incansável, novas possibilidades para o tratamento de doenças e para o desenvolvimento de novas tecnologias que possam mudar a forma de promoção e manutenção da saúde (PAIM, et al, 2011). Atualmente, a pesquisa em terapia gênica tem mostrado alto potencial resolutivo uma vez que, trabalha com a possibilidade de uso de genes como fármaco complementar e atuante na falha patológica (LINDEN, 2010). Durante a busca por material, foi encontrado um maior enfoque nos artigos que relatam o tratamento da diabetes. Atualmente, não há cura para pessoas portadoras de diabetes tipo 1, sendo uma doença auto-imune, específica de um órgão, de células β receptores de insulina no pâncreas. Além disso, o único tratamento existente hoje no sistema único de saúde é o uso de insulina exógena e o transplante de pâncreas por completo (GROSS, et al, 2001).

No entanto, como foi abordado por SOUZA e ZANETTI (2000) o uso contínuo de insulina trás consequências como infecções cutâneas, por inúmeras perfurações diárias no mesmo local e lipohipertrofia, que é outra alteração, caracterizada pela presença de massas subcutâneas, discretamente hipoestésicas, com absorção inadequada de insulina, formadas por gordura e tecido fibroso, nos locais de aplicação de insulina.

A terapia gênica é uma oportunidade de fazer modificações no genoma humano, a fim de corrigir mutações no gene ou modificações sítio-específico, entre os diversos tipos de terapias, descritos na Tabela 1, a principal terapia estudada para solucionar a falha na produção de insulina é a CRISPR-Cas-9, que consiste numa edição na sequência de DNA alvo-específica, sendo o Cas-9, responsável por clivar o DNA dupla fita, um RNA guia que guia o complexo até o alvo, e o DNA alvo (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Tabela 1- Tipos de Terapia Gênicas

Terapia Gênica	Principais Pontos	Funcionalidade
Terapia gênica de linhagem germinativa	São modificadas pela introdução de genes funcionais, os quais são integrados ao genoma. São hereditárias e passam para gerações subsequentes.	Eficaz na luta contra doenças genéticas e hereditárias.
Terapia gênica de células somáticas	Quando genes terapêuticos são transferidos para células somáticas de algum paciente. Qualquer modificação e quaisquer efeitos são restritos somente ao paciente e não são herdadas pelas futuras gerações. Modificações/Efeitos restritos aos pacientes e não são herdados pelas futuras gerações.	Doenças com desordens graves
Terapia com células T	O receptor de antígenos quiméricos é uma imunoterapia que envolve manipulação/reprogramação das células imunes (Linfócitos T) dos próprios pacientes, a fim de reconhecer e atacar as células tumorais.	Tratamento imunológico que utiliza o sistema imunitário para lutar contra doenças

Terapia gênica e células-tronco hematopoiética	Geração de vetores de transferência gênica para a criação de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS), a fim de gerar a diferenciação das iPS e proporcionar um fenótipo adicional a partir desta célula derivada diferenciada.	Essenciais em casos que as todas as células precisam ser substituídas.
Plasmídeos	Sequências de DNA eficazes para expressão de genes, nas quais é possível inserir um gene terapêutico por técnicas de DNA recombinante.	Permite a expressão e a tradução da proteína de interesse em células-alvo.
Vírus	Os vetores mais eficientes devido ao seu mecanismo de replicação, entretanto diferem entre si no grau de resposta inflamatória que podem desencadear, ocasionando efeitos adversos graves.	Remover os genes envolvidos dos mecanismos patogênicos e de proliferação viral mantendo apenas o necessário para a invasão das células sem multiplicação, seguida da inserção de um gene terapêutico do que resta do DNA viral.
Nanoestruturados	Construídos por técnicas avançadas de nanotecnologias e estão incluídos polímeros que formam redes que prendem um gene e soltam a sua carga quando penetram nas células, como microinjeções de DNA, polímeros catiônicos, lipossomos catiônicos e bombardeamento de partículas	Esta última técnica é importante, pois facilitará a terapia gênica cerebral sem a necessidade de uma neurocirurgia para introduzir o vetor, bastando injeções endovenosas.
Total	07	

Fonte: Baseado em GONÇALVES e PAIVA, 2017.

O sistema procariótico tipo II CRISPR – Cas9 (repetições palindrômicas curtas, regularmente espaçadas entre si - associado ao CRISPR 9) está revolucionando rapidamente o campo da engenharia genética, permitindo que os pesquisadores alterem os genomas de uma grande variedade de organismos com relativa facilidade (SÁNCHEZ-RIVERA; JACKS, 2015). Entre as doenças alvo do tratamento genético está a diabetes mellitus tipo 1, doença autoimune metabólica crônica caracterizada por uma deficiência de insulina, a qual é determinada pela destruição das células produtoras de insulina do pâncreas, onde as células β -pancreáticas são destruídas tornando baixa a presença de insulina no organismo (BALDA; PACHECO-SILVA, 1999). Tal tratamento, técnica de CRISPR-Cas9, tem como finalidade alterar o genoma humano para corrigir essa deficiência de insulina no indivíduo (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

O CRISPR-Cas9 é extremamente eficiente, com rápida aplicação e baixo custo, e é utilizado na edição de genes, incluindo a modificação do genoma (GONÇALVES; PAIVA, 2017). A tecnologia em referência está sendo empregada majoritariamente em patologias monogênicas que, apesar de

serem raras, podem atingir diversas patologias, inclusive a Diabetes Tipo 1 (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Sendo assim, a presente revisão busca analisar a funcionalidade da terapia gênica no tratamento da diabetes mellitus tipo 1 tendo como base as pesquisas realizadas em artigos científicos e dissertações a respeito do uso do CRISPR Cas-9.

METODOLOGIA

O trabalho trata-se de uma revisão bibliográfica do tipo qualitativa. Sendo assim, a coleta de dados para elaboração da pesquisa foi feita por meio da busca de artigos científicos e dissertações que estivessem disponíveis desde o ano de 2015. A questão norteadora do presente estudo foi buscar na literatura o uso da terapia gênica para o tratamento de pacientes com Diabetes Mellitus 1. A seleção tanto dos artigos científicos quanto das dissertações foi feita por meio do acesso à plataforma de busca Scholar Google e às bibliotecas eletrônicas Scielo e Pubmed, utilizando como estratégia de busca os seguintes descritores contidos no DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) de forma isolada ou combinada: "Diabetes Mellitus 1", "CRISPR", "terapia gênica" e "autoimune" e adicionado "CRISPR-Cas 9". Foi utilizado como critério de inclusão, ainda, apenas as publicações disponibilizadas gratuitamente. Após as buscas, foi disponibilizado um total de 20 páginas contendo teses, dissertações, artigos científicos e até livros. Deles foram selecionados apenas as dissertações e artigos científicos que mais se adequassem à questão norteadora por meio da leitura dos títulos, resumos e discussões/resultados conforme é mostrado na figura 1. Com isso, uma leitura minuciosa foi efetuada, buscando selecionar os temas prioritários que seriam a composição deste estudo.

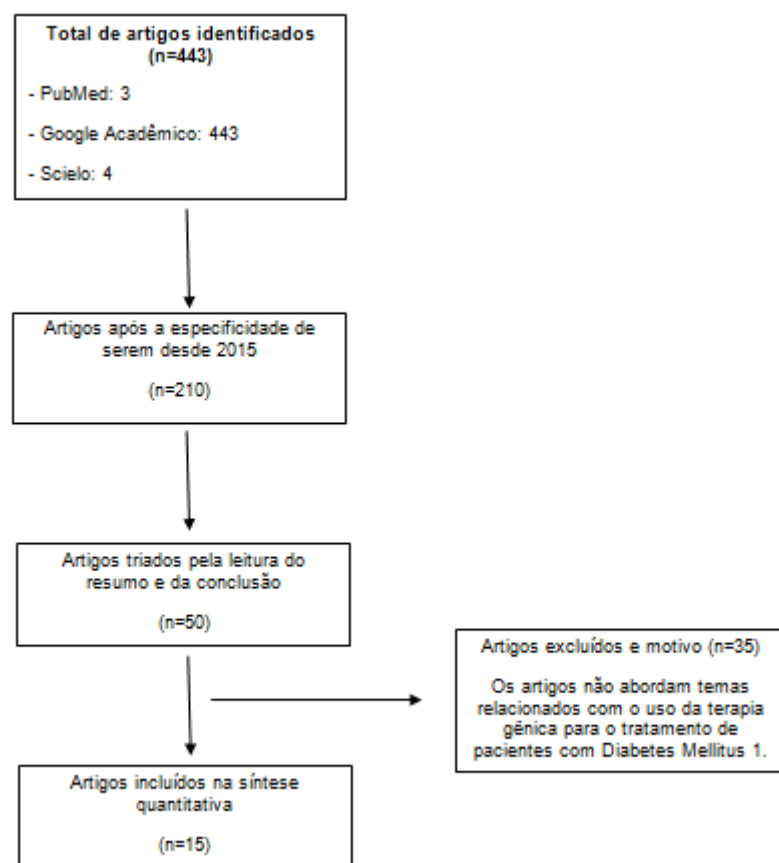


Figura 1 - Fluxograma de seleção das publicações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 foram apresentados os autores e os títulos dos principais trabalhos encontrados e também descritos os seus respectivos objetivos e as informações mais relevantes encontradas neles.

Tabela 2: Resultados das buscas em bases eletrônicas de 2015 a 2019.

Referência	Título	Objetivo	Principais Achados
Pelletier, Gingras, Green (2015)	Engenharia de genoma de camundongo via CRISPR-Cas9 para estudo da função imunológica.	Discutir as vantagens práticas do sistema CRISPR-Cas9 sobre as tecnologias de direcionamento convencionais e fornecer sugestões para o uso dessa tecnologia para tratar questões imunológicas.	O benefício da técnica é que ela pode atingir vários locais simultaneamente. “A fusão do Cas9 inativo por endonuclease (dCas9) com o DNA guiado por RNA, histona e enzimas modificadoras de cromátídeos pode ser útil para o estudo da epigenética e seu papel no câncer, distúrbios neurológicos e doenças autoimunes.” (Portela e Esteller, 2010)
Gonçalves, Paiva (2017)	Terapia Gênica: avanços, desafios e perspectivas.	Abordar sobre terapia gênica, as diferentes metodologias de engenharia genéticas empregadas, limitações e aplicações e perspectivas.	A técnica CRISPR é uma das técnicas na tecnologia do DNA recombinante, na qual o gene de interesse ou saudável é inserido. É muito utilizada no vetor nanoestrutural ou em um vírus.
Demeterco, Levine (2001)	Terapia gênica para o Diabetes.	Revisar como a terapia gênica pode ser empregada para obter células produtoras de insulina e discutir os últimos avanços em relação ao crescimento e diferenciação das células B.	A terapia gênica é utilizada para geração de fontes ilimitadas de células que apresentem secreção normal de insulina em resposta ao estímulo da glicose, capazes de serem transplantada sem a necessidade de

			imunossupressão sistêmica.
Silva e de Souza,	Estudo da Relação entre o conhecimento, a adesão e o sucesso na terapia de diabetes no município de Matozinhos-MG.	Investigar a relação entre o conhecimento e a adesão ao tratamento de diabetes mellitus, e como essa relação pode impactar no sucesso da terapia.	Observou-se que o conhecimento dos pacientes portadores de DM sobre a doença e o tratamento apresenta uma fraca correlação com a adesão do sucesso da terapia.
Gonçalves (2007).	Imunogenética da Diabetes Mellitus tipo 1.	Conduzir a uma melhor compreensão da fisiopatologia da DT1 e à identificação de genótipos que controlam mecanismos moleculares e celulares passíveis de constituir alvos de intervenções terapêuticas e preventivas.	A Diabetes mellitus tipo 1 é a 3ª doença crônica infantil mais prevalente. Tendo como principal causa um processo autoimune que conduz à destruição das células β do pâncreas, influenciado por múltiplos fatores genéticos e ambientais.
Araújo, Farias (2019)	CRISPR-CAS/9 e sua atuação terapêutica: uma revisão.	Demonstrar a atuação terapêutica do CRISPR-Cas-9.	[...]utiliza de pequenos RNA's guias associados a enzima Cas9, o que facilita o seu acesso a determinada sequência gênica. Diante disso, o CRISPR-Cas9, representa uma visão de futuro no campo biológico.
Linden (2010)	Terapia gênica: o que é, o que não é	Discorrer sobre os principais achados da terapia gênica e	“A ideia de usar as técnicas de DNA recombinante para

	e o que será	como a indústria vai se portar a esse tipo de tratamento.	corrigir o genoma foi inspirada nas doenças causadas por mutação em um único gene (ditas doenças monogênicas). Nesse caso, a ideia é substituir ou suplementar a expressão do gene disfuncional, mediante a inserção de uma ou mais cópias do gene terapêutico (Porteus et al., 2006; O'Connor & Crystal, 2006; Brinkman et al., 2006)".
Millman, Xie, Dervort et al. (2016)	Generation of stem cell-derived β -cells from patients with type 1 diabetes	Demonstrar estudos que comprovem a evolução do estudo com células b na sua produção a partir de células tronco e discorrer sobre a apoptose de células b em pacientes com diabetes tipo 1.	"O transplante de células β exógenas para substituir as células β endógenas mortas ou disfuncionais é uma estratégia potencial para o controle dos níveis de glicose no sangue em pacientes diabéticos."
Total		08	

Analisando os diferentes conteúdos expostos nos artigos citados, tabela 2, o grupo pôde verificar como o método discutido contribui para a terapêutica de algumas doenças sem cura ou com tratamento ineficiente, focando no âmbito dos pacientes portadores de diabetes tipo 1. Por se tratar de uma técnica em desenvolvimento, a terapia gênica pode encontrar alguns empecilhos a serem resolvidos para que haja um avanço nas suas pesquisas.

Entre esses impasses, pode ser citado a questão ética dos experimentos, já que em 1999, um paciente morreu logo após a injeção de um vetor viral durante um ensaio clínico de terapia gênica, vitimado por uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica causada pelo vetor adenoviral de primeira geração (RAPER et al., 1998, 2003). Ou seja, a terapia gênica pode ocasionar uma mutação produzida pela intromissão do vetor no DNA, atrapalhando a sequência gênica e até mesmo ocasionando assim uma patologia (LINDEN, 2010).

Dessa forma, embora vários protocolos sejam bem-sucedidos, o processo de terapia gênica permanece complexo, e muitas técnicas necessitam de novos desenvolvimentos (GONÇALVES; PAIVA, 2017). Sendo assim, a bioética serve como uma avaliação de riscos e implicações morais envolvidas quando uma nova técnica surge.

Em termos de desenvolvimento da técnica é visto que a escassez de tecido primário ainda representa um importante obstáculo que deve ser superado, tornando-se um dos maiores alvos para a terapia gênica nesta área. A dificuldade em se reproduzir as complexas funções da célula β torna o desenvolvimento de células secretoras de insulina a partir de células extra-pancreáticas uma tarefa extremamente árdua (DEMETERCO; LEVINE, 2001). O tratamento atual é feito com a aplicação de insulina periodicamente, no entanto, o uso contínuo de insulina exógena trás consequências como infecções cutâneas, por inúmeras perfurações diárias no mesmo local e lipohipertrofia, que é outra alteração, caracterizada pela presença de massas subcutâneas, discretamente hipoestésicas, com absorção inadequada de insulina, formadas de gordura e de tecido fibroso, nos locais de aplicação de insulina (SOUZA; ZANETTI, 2000).

CONCLUSÃO

Diante desse cenário e buscando a melhoria da qualidade de vida o CRISPR-Cas9 pretende editar genes e modificar o genoma a fim de contribuir com pacientes que possuam doenças genéticas, no caso do diabetes mellitus tipo I essa técnica tem a intenção de estimular uma nova produção de insulina pelo pâncreas, fazendo com que as células β passem a produzir insulina novamente e se diferencie em novas células, consequentemente, aumentando a produção de insulina no corpo humano (MALAJOVICH, 2016).

REFERÊNCIAS

BALDA, C.A., PACHECO-SILVA, A. **Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1**. Rev. Assoc. Med. Bras. vol.45 n.2 São Paulo Apr./June 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42301999000200015>>. Acesso em: 19 nov 2019.

CLANCHY, F. I., WILLIAMS, R. O. **Plasmid DNA as a safe gene delivery vehicle for treatment of chronic inflammatory disease**. Expert Opin. Biol. Ther., v.8, n.10, p.1507- 19, 2008.

DEMERTECO, C., LEVINE, F. **Terapia gênica para diabetes**. v 45, n 1, São Paulo, fev 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302001000100013>>. Acesso em: 20 nov 2019.

FISCHER, M.R., GARCIA, C.F., NOGUEIRA, A.L., et al; **Biossíntese e caracterização de nanocelulose bacteriana para engenharia de tecidos**. Santa Catarina, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s1517-707620170005.0270>>. Acesso em: 20 nov 2019.

GILL, D.R. et al. **Progress and prospects: the design and production of plasmid vectors**. Gene Ther., v.16, n.2, p.165-71, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19129858>>. Acesso em: 21 nov 2019.

GONÇALVES, G.A.R., PAIVA, R.M.A. **Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas**. v 15, n 3, São Paulo, set 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s1679-45082017rb4024>>. Acesso em: 20 nov 2019.

IGARASHI, W., IGARASHI, D.C.C., VIEIRA, E.M.F., et al; **Investigação no contexto brasileiro sobre gestão do conhecimento/aprendizagem/tecnologia de informação: pesquisa realizada na Scientific Electronic Library Online**. v 6, n 2, Rio de Janeiro, jun 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1679-39512008000200010>>. Acesso em: 23 nov 2019.

INSTITUTO ONCOGUIA - **Terapia com Células T CAR**, 2018. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/terapia-com-celulas-t-car/7960/922/>>. Acesso em: 23 nov 2019.

LINDEN, R. **Terapia gênica: o que é, o que não é o que será**. v 24, n 70,2010. São Paulo. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142010000300004>. Acesso em: 20 nov 2019.

MACHIDA, C.A. (Ed.) **Viral vectors for gene therapy: methods and protocols**. S. I.: Humana Press, 2002. 608p.

MALAJOVICH, M. A; **Biotecnologia**. BTeduc, 2016, 2º ed. Disponível em: https://bteduc.com/livros/Biotecnologia_2016.pdf. Acesso em: 03 dez 2019.

MILLMAN, J.R.; XIE, C.; VAN DERVORT, A., et al. **Generation of stem cell-derived β -cells from patients with type 1 diabetes**. 10 mai,2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms11463>. Acesso em: 23 nov 2019.

PAIM, J. et al. **O sistema de saúde brasileiro: história, avanços e desafios**. Saúde no Brasil. Disponível em: 10.1016/S0140- 6736(11)60054-8. Acesso em: 26 nov 2019.

PARDRIDGE, W. M. **Tyrosine hydroxylase replacement in experimental Parkinson's disease with transvascular gene therapy**. NeuroRx., v.2, n.1, p.129-38, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC539333/>. Acesso em: 24 nov 2019.

PARDRIDGE, W. M. **Blood-brain barrier delivery of protein and non-viral gene therapeutics with molecular Trojan horses**. J. Control. Release, v.122, n.3, p.345-8, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512078>. Acesso em: 24 nov 2019.

RAPER, S. E. et al. **Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer**. Mol. Genet. Metab., v.80, n.1-2, p.148-58, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14567964>. Acesso em: 24 nov 2019.

RAPER, S. E. et al. **Developing adenoviral-mediated in vivo gene therapy for ornithine transcarbamylase deficiency**. J. Inherit Metab. Dis., v.21, Suppl. 1, p.119-37, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9686350>. Acesso em: 24 nov 2019.

SÁNCHEZ-RIVERA, F.J., JACKS, T.; **Applications of the CRISPR–Cas9 system in cancer biology**. Jun, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc3950>. Acesso em: 23 nov 2019.

SILVA, A.P., BALDA, A. **Aspectos imunológicos melito tipo 1 C**. v 45, n 2, São Paulo, jun 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42301999000200015>. Acesso em: 23 nov 2019.

SOUZA,C.R., ZANETTI, M.L; **Administração de insulina: uma abordagem fundamental na educação em diabetes**. v 34, n 3, p. 264-70, set. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v34n3/v34n3a07.pdf>. Acesso em: 20 nov 2019.

VOSS, C. **Production of plasmid DNA for pharmaceutical use**. Biotechnol. Annu. Rev., v.13, p.201-22, 2007. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(07\)13008-8](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(07)13008-8). Acesso em: 21 nov. 2019.