

Artigo de revisão

# Diabetes Mellitus: Perspectivas para diagnóstico e terapêutica a partir de edição genética por CRISPR-CAS9

*Diabetes Mellitus: Perspectives for diagnosis and therapy based on CRISPR-CAS9 genetic editing*

Alexia Polo Siqueira<sup>1</sup>, Patrícia da Silva Antunes<sup>1</sup>, Kamila Thayssa Tortoza Deleprani<sup>1</sup>, Beatriz Cetalle Schiavo<sup>1</sup>, Mariela Soldá Ferrari<sup>1</sup>, Mateus Jorge Mendes dos Santos<sup>1</sup>, Lílian Louise Souza Figueiredo<sup>1</sup>, Lucas Souza de Bem<sup>1</sup>, Raquel Scanavachi Bonani<sup>1</sup>, Marina M Carneiro<sup>1</sup>, Angel Maurício Castro Gameiro<sup>1</sup> e Pollyanna Francielli de Oliveira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, Minas Gerais – MG, Brasil

E-mail: pollyanna.oliveira@unifal-mg.edu.br

Recebido: 22 junho 2020; Aceito: 04 novembro 2020; Publicado: Maio 2021

## Resumo

**Objetivo:** abordar as diferentes aplicações da ferramenta de edição gênica “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats” (CRISPR) e “crispr associated protein-9” (Cas9) na caracterização, prevenção, susceptibilidade genética, diagnóstico e terapêutica da diabetes mellitus (DM). **Fonte de dados:** foi realizado um levantamento bibliográfico das publicações disponíveis nas bases da *National Library of Medicine* (NIH – PubMed), *Scientific Eletronic Library Online* (Scielo) e *Scholar Google* dos últimos 20 anos, priorizando publicações dos últimos 5 anos. **Síntese dos dados:** considerando que a DM é uma doença crônica de caráter metabólico sob influência de variantes genéticas e, muitas vezes, associadas a interações ambientais, com altos índices epidemiológicos de incidência e prevalência no Brasil e no mundo e tendo diversas limitações na prática clínica e diagnóstica, ferramentas inovadoras de edição gênica possuem potencial para contribuir positivamente na problemática da DM como a CRISPR-Cas9. CRISPR é um sistema de manipulação gênica sítio-específico guiado por RNA e inspirado no funcionamento do sistema imune bacteriano que tem apresentado resultados promissores para estudo de diversas doenças. **Conclusão:** o sistema CRISPR-Cas9, apesar de algumas limitações técnicas e éticas, é promissor em virtude de sua sensibilidade e especificidade, sendo uma alternativa aos métodos clássicos para compreensão das bases genéticas e fisiopatológicas da DM e que permite desenvolver e aplicar modelos de estudo aplicados à elucidação de novas e mais eficientes estratégias de diagnóstico e tratamento.

**Palavras-chave:** diabetes mellitus; crispr-cas9; diagnóstico; terapêutica; edição gênica.

## Abstract

**Objective:** Address the different applications of the “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats” (CRISPR) and “crispr associated protein-9” (Cas9) gene editing tool in the characterization, prevention, genetic susceptibility, diagnosis and therapeutic of diabetes mellitus (DM). **Data sources:** A bibliographic survey of the publications available in the databases of the National Library of Medicine (NIH - PubMed), Scientific Eletronic Library Online (Scielo) and Scholar Google for the last 20 years was carried out, prioritizing publications from the last 5 years. **Summary of the data:** Considering that DM is a chronic metabolic disease under the influence of genetic variants and often associated with environmental interactions, with high epidemiological rates of incidence and prevalence in Brazil and in the world and with several limitations in clinical and diagnostic practice, tools Gene editing innovators have the potential to contribute positively to the problem of DM such as CRISPR-Cas9. CRISPR is a site-specific gene manipulation system guided by RNA and inspired by the functioning of the bacterial immune system that has shown promising results for the study of several diseases. **Conclusion:** The CRISPR-Cas9 system, despite some technical and ethical limitations, is promising due to its sensitivity and specificity, being an alternative to classic methods for understanding the genetic and pathophysiological bases of DM and which allows the development and application of study models applied to the elucidation of new and more efficient diagnosis and treatment strategies.

**Keywords:** diabetes mellitus; crispr-cas9; diagnosis; therapeutics; gene editing.

## Introdução

Doenças genéticas compreendem um conjunto de patologias que têm como causa comum alterações no material genético, as quais podem ou não possuir um caráter hereditário.<sup>1</sup> Neste contexto, a diabetes mellitus (DM) apresenta-se como uma doença crônica e metabólica, sob forte influência gênica. Cerca de 9,3% da população adulta global entre 20 e 79 anos já convive com a condição e projeta-se que, entre 2030 e 2045, este número se eleve para 10,2% e 10,9%, respectivamente.<sup>2</sup> O Brasil é o 5º país com maior número de pacientes diagnosticados e o 3º a apresentar maiores despesas em saúde por indivíduo, em virtude da DM.<sup>2,3</sup>

Estratégias adotadas na prática médica buscam melhorar a qualidade de vida do paciente através da independência à insulina exógena e retorno à normalidade dos níveis sanguíneos de hemoglobina glicada.<sup>4</sup> De certo modo é realizado o transplante do pâncreas, das ilhotas pancreáticas, bem como a substituição de células  $\beta$ . Entretanto, essas metodologias são limitantes em razão da possível falta de compatibilidade entre doador-receptor e da necessidade de uma massiva imunossupressão a fim de evitar a rejeição imunológica ao transplante.<sup>4</sup> Por outro lado, a evolução da engenharia genética permitiu o surgimento de diversas modalidades de edição gênica que possibilitam modificações alvo-específicas no genoma e resultam em alterações no produto gênico, em termos de expressão ou natureza, como RNAs de interferência, *zinc finger nucleases*, *TAL effector nucleases* (TALENs) e a “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*” (CRISPR) e “*crispr associated protein-9*” (Cas9) (CRISPR-Cas9).<sup>5-8</sup>

Nesta revisão, abordaremos as diferentes aplicações da ferramenta de edição gênica CRISPR-Cas9 na caracterização, prevenção, susceptibilidade genética, diagnóstico e terapêutica da DM.

## Materiais e Métodos

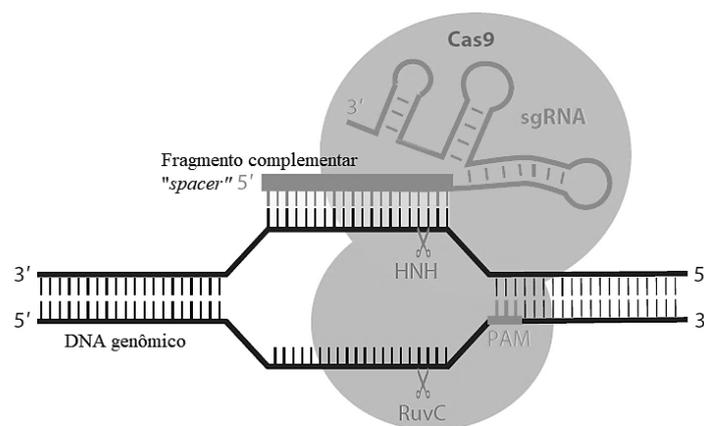
Para esta revisão de cunho qualitativo, foi realizado um levantamento bibliográfico das publicações disponíveis nas bases da *National Library of Medicine* (NIH – PubMed), *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) e *Scholar Google* nos últimos 20 anos. Utilizou-se os descritores: “*genome editing tools*”, “*diabetes mellitus*” e “*study model of diabetes mellitus*”. Em um primeiro momento, foram selecionados 76 trabalhos. Para compor esta revisão, 67 publicações, compreendidas entre 2004 e 2019, foram selecionadas por abordarem o tema específico e estarem atualizadas quanto às técnicas aplicadas. Optou-se pela exclusão dos trabalhos não associados especificamente ao tema ou desatualizados quanto as inovações, dando-se prioridade as publicações dos últimos 5 anos.

## Edição gênica: a CRISPR-Cas9

A ferramenta de edição gênica “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*” (CRISPR) “*crispr associated*” (Cas), CRISPR-Cas, foi inspirada no sistema imune adaptativo de procariotos (*Archaea*) e algumas bactérias, em resposta a invasões plasmidiais e virais.<sup>32,33</sup> Seu mecanismo consiste no reconhecimento de uma sequência específica de DNA exógeno direcionado por curtos fragmentos de RNA transcritos pelo *locus CRISPR*, que atuam como guia, seguidos da ligação da nuclease ao sítio de ação, responsável por gerar corte no material genético.<sup>34,35</sup>

Para a aplicação em edição gênica, foram elucidados os sistemas Tipo I, II e III, sendo que I e III são mais restritos em virtude de necessitarem de mais de uma endonuclease: o sistema Tipo I necessita de uma endonuclease Cas5 ou Cas6 para o pré-processamento do CRISPR-RNA (crRNA), e de uma Cas3 para a clivagem da fita de DNA, enquanto o Tipo III exige que o pré-processamento seja realizado pela Cas6 e a clivagem por um complexo de Cas chamado Csm/Cmr tipo III. Em contrapartida, o tipo II necessita apenas de uma endonuclease, a Cas9, tornando esta ferramenta a de maior aplicabilidade, reprodutibilidade e a mais simples de ser projetada.<sup>7,36</sup> Para este último, embora tenha sido observado em 1987 em cepas de *Escherichia coli*, o sistema de defesa presente em *Streptococcus pyogenes* foi adaptado e empregado como ferramenta por apresentar como endonuclease a proteína Cas9 (SpCas9).<sup>37</sup>

A Figura 1 representa a estrutura do sistema CRISPR Tipo II utilizado como ferramenta de edição gênica. O sistema compreende um complexo formado por uma endonuclease 9 associadas ao CRISPR (Cas9), e o RNA-guia (sgRNA), formado por dois RNAs não-codificantes, o crRNA e o “*trans-activating*” (tracrRNA) responsáveis pelo direcionamento sítio-específico da enzima e interação com o fragmento de DNA de interesse.<sup>6</sup> O chamado RNA-guia apresenta importância crucial na especificidade da ligação sítio-específica da ferramenta CRISPR. O crRNA compreende repetições palindrômicas de bases nitrogenadas na extremidade 3', separada por uma sequência de nucleotídeos formada por 20 pares de bases (pb), denominada “*spacer*”, enquanto, na região 5', complementar a sequência de interesse presente no DNA a ser clivado, temos sequência chamada de “*protospacer*”<sup>36</sup> (Figura 1). A importância funcional do tracrRNA é recrutar a endonuclease Cas9. Estes dois RNAs podem ser substituídos por um único RNA-guia quimérico cujo reconhecimento e interação se mostrou eficiente, como observado em proteínas Cpf1 originárias de *Acidaminococcus sp* (AsCpf1) e *Lachnospiraceae bacterium* (LbCpf1).<sup>6, 37,38</sup>

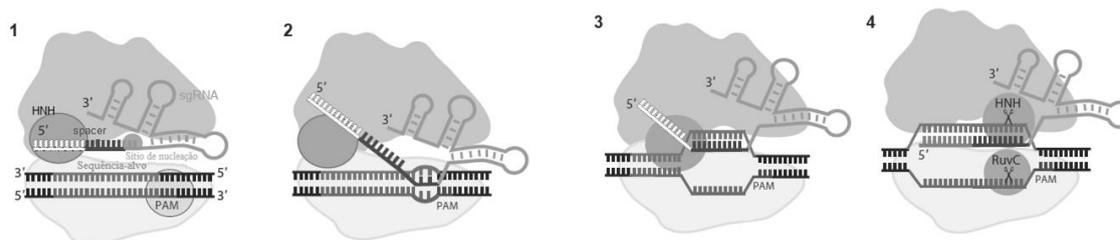


**Figura 1.** Estrutura do sistema CRISPR Tipo II utilizado como ferramenta de edição gênica. A estrutura é composta por uma molécula sintética de RNA-guia que apresenta uma sequência específica responsável pelo direcionamento da ferramenta ao sítio genômico de interesse e pela endonuclease Cas9, composta por dois domínios (HNH-like e RuvC-like) responsáveis pela clivagem das fitas de DNA. Cas9: endonuclease Cas9; sgRNA: fragmento de RNA-guia; HNH: domínio HNH-like da proteína Cas; RuvC: domínio RuvC-like da proteína Cas; PAM: sequência “Protospacer Adjacent Motif. Fonte: adaptado de Jiang e Doudna.<sup>36</sup>

### Mecanismo de edição gênica

A representação do mecanismo de reconhecimento e clivagem mediado pelo sistema CRISPR Tipo II é resumido na Figura 2. Segundo Jiang e Doudna,<sup>36</sup> o complexo efetor CRISPR-Cas9 é ativado a partir da interação entre o RNA-guia da ferramenta e a sequência de DNA em virtude da especificidade da ligação pelo crRNA e o recrutamento da Cas9 feito pelo tracrRNA. Inicia-se a busca pela sequência complementar por meio da localização da sequência “Protospacer Adjacent Motif” (PAM), formada por 2 a 5 pb que flanqueiam a sequência “protospacer” do DNA, crucial para sua identificação.<sup>36,39</sup> A sequência PAM compreende

5'-NGG-3', sendo N qualquer base nitrogenada. Caso não a encontre, a Cas se dissocia do DNA. Em caso de sucesso, é desencadeada a abertura das fitas de DNA, seguida da invasão do RNA por entre as mesmas. Forma-se então a interação dos 20pb DNA-RNA complementares e de uma fita isolada, seguido de um rearranjo da Cas9, que sofre uma mudança conformacional que a ativa para realizar a clivagem do DNA. Assim, o RNA é considerado um regulador da função da Cas9. Cada domínio da endonuclease realiza a clivagem de uma fita de DNA, o que resulta em uma dupla quebra há 3pb de distância da sequência PAM<sup>36,39</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** Mecanismo de reconhecimento e clivagem mediado pelo sistema CRISPR Tipo II. (1) Reconhecimento e interação do sgRNA com a sequência alvo. (2) Abertura da fita de DNA a partir do sítio de nucleação, seguida da invasão do RNA. (3) Expansão da interação por complementariedade de bases. (4) Preparo para a clivagem após finalizada a complementariedade da sequência de interesse. sgRNA: fragmento de RNA-guia; HNH: domínio *HNH-like* da proteína Cas; RuvC: domínio *RuvC-like* da proteína Cas; PAM: sequência “Protospacer Adjacent Motif; spacer: sequência de RNA complementar a de interesse. Adaptado de Jiang e Doudna.<sup>36</sup>

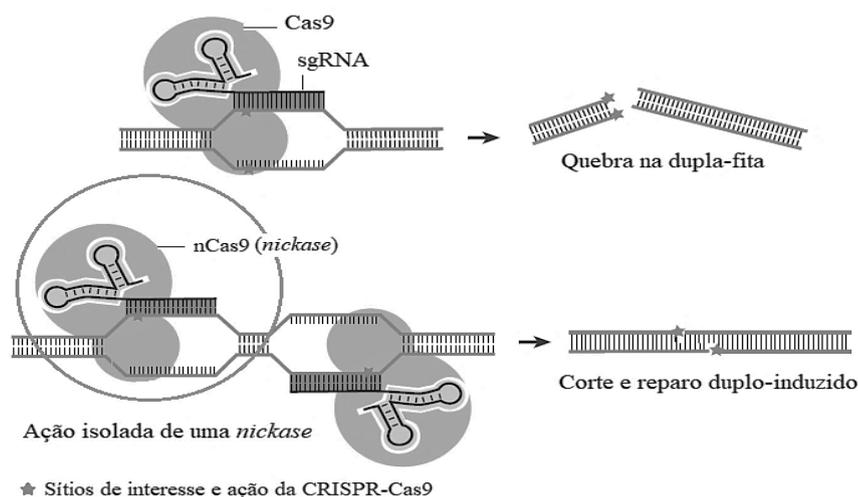
A partir deste momento é possível realizar exclusões, correções e trocas de bases, *knockouts* (silenciamento) e *knockins* (inserções de genes específicos). Na presença de manipulação gênica, o modelo de reparo da quebra da dupla fita apresenta uma sequência de interesse flanqueada por braços homólogos, que ativa a via de reparo dirigido por homologia

(“*homologous directed repair*”, HDR). Na ausência de um modelo, é ativada a via de reparo de junção de extremidade não-homóloga (“*non-homologous end joining*”, NHEJ), que pode causar inserções, deleções, e até mesmo substituições imprevisíveis.<sup>38</sup>

### Variações técnicas da CRISPR-Cas9

Além do método CRISPR de 1ª geração, a ferramenta tem sido aperfeiçoada em ferramentas de 2ª geração, com objetivo de reduzir a probabilidade de eventos em regiões fora do alvo de interesse.<sup>38</sup> Uma variação ortogonal denominada nCas9, também chamada de “nickase”, tornou possível a clivagem do material genético sem necessidade de quebra na dupla fita, mas apenas em uma das complementares,<sup>40</sup> o que pode ser

melhor visualizado na Figura 3. Este fator possibilita a troca, por exemplo, de uma base nitrogenada por outra, reduzindo inserções e deleções aleatórias de bases.<sup>41</sup> É possível trocar uma citosina (C) por timina (T), bem como adenina (A) por guanina (G), como demonstrado experimentalmente por Komor e colaboradores em 2017.<sup>6,38</sup> Outro benefício do uso da nCas9 é que nickases podem se ligar na fita senso e anti-senso, criando um corte duplo induzido, que leva ao aumento da especificidade.<sup>39</sup>



**Figura 3.** Representação da variação ortogonal de CRISPR nCas9. Cas9: endonuclease Cas9; sgRNA: fragmento de RNA-guia; nCas9: variação da endonuclease Cas9 (*nickase*). Adaptado de Wang *et al.*<sup>40</sup>

Entre as demais variações da técnica de CRISPR podemos citar a CRISPR de interferência (CRISPRi), CRISPR de ativação (CRISPRa) e a CRISPR aplicada a *knockouts* (CRISPRko). A CRISPRi utiliza uma versão da proteína Cas9, a “dead” (dCas9) que é incapaz de provocar clivagem ou introdução de mutações de DNA. Isso se deve a mutações pontuais nos domínios RuvC-like e HNH nuclease. Ainda, possui um sgRNA que se liga a sequência complementar e à sequência PAM, onde ocasiona um bloqueio da transcrição e silenciamento do gene alvo. Quando direcionada à região promotora, o complexo dCas9 interfere na transcrição do gene alvo e, direcionada ao corpo do gene, interrompe o alongamento da transcrição.<sup>37</sup> Nesta variação podem ser utilizados diversos sgRNAs simultâneos, a fim de silenciar diversos genes, o que aumenta a eficiência da repressão gênica.<sup>42</sup> Além disso, apresenta alta especificidade e efeitos mínimos fora do alvo de interesse se utilizadas duas sequências distintas de sgRNA.<sup>43</sup> A CRISPRa é considerada uma variante da CRISPRi, que empregam a dCas9 que podem ser fundidas a domínios efetores, permitindo direcionamento com precisão à uma determinada atividade funcional para qualquer *locus* arbitrário dentro do genoma.<sup>44</sup> Já a CRISPRko é aplicada à geração de *knockouts* (KO) onde se utiliza a Cas9 em sua disposição selvagem e não modificada (wtCas9) com o objetivo de clivar o DNA.<sup>45</sup> Apesar da reparação eficiente por NHEJ no silenciamento gênico, causado por quebra de

fita dupla do DNA com uso da wtCas9, a introdução inserções ou deleções torna-se indesejada, pois nem sempre resulta em gene KO, podendo gerar novas funções, além de danos excessivos ao DNA.<sup>46</sup>

### Discussão

#### CRISPR-Cas9 e os modelos de estudo aplicados a DM

Considerando o caráter ainda experimental da CRISPR, modelos de estudo são empregados para mimetizar de maneira celular, fisiológica e até mesmo farmacológica a patogenia, seu desenvolvimento, condições secundárias e outras alterações. São aplicados tanto *in vivo*, em modelos murinos, caninos, felinos, suínos, e primatas não-humanos, como *in vitro* utilizando cultura de células humanas ou animais.<sup>10,31</sup>

Modelos *in vitro* podem empregar células de cultura primária isolada de ilhotas  $\beta$  pancreáticas, células clonais imortalizadas e células tronco humanas pluripotentes para auxiliar no estudo de como genes e mecanismos moleculares contribuem para a etiologia da doença.<sup>31</sup> A vantagem deste tipo de metodologia é que por se tratarem de células humanas, reproduzem melhor o fenótipo de interesse a nível celular se comparados a células animais e modelos animais *in vivo*.<sup>47</sup> No entanto, não permite estender os riscos e as limitações de segurança técnica aplicadas nos modelos *in vivo*. Neste sentido, a aplicação de CRISPR-Cas9 é importante, pois permite compreender a geração de *knockouts*, edição de bases, regulações transcricionais de ativação e silenciamento,

introdução de uma variante genética por recombinação, e até mesmo *screenings* de identificação genômica.<sup>48</sup> No sistema *in vitro*, em células pluripotentes, que podem ser derivadas de pacientes com mutações de gene único, temos, por exemplo, um modelo simples de ser planejado e reproduzido<sup>10</sup> e bem explorado pela literatura.<sup>28,48,51</sup>

O emprego de técnicas de diferenciação direta de células tronco pluripotentes, aliados a TALEN e CRISPRi foi demonstrado por Zhu et al.<sup>51</sup> a fim de investigar o controle de 8 fatores de transcrição relacionados ao desenvolvimento do pâncreas e a DM neonatal. Seus experimentos revelaram diversos mecanismos de desenvolvimento da doença, também relacionados ao DT2, como a ação reguladora do gene *RFX6* em progenitores pancreáticos, a relação entre o gene *PDX1* e diferenciação em células  $\beta$  pancreáticas e diferenças da ação do gene *NGN3* entre humanos e camundongos.<sup>51</sup> Balboa et al.<sup>48</sup> têm apontado o uso de CRISPR para realização de *knockouts* em genes associados ao desenvolvimento de células  $\beta$ , como o *PDX1*, *NEUROG3*, *ARX*, *GLIS3*, *NEUROD1*, de modo a reproduzir o funcionamento anormal.<sup>48</sup> Correções gênicas em lócus de mutações conhecidas para estudos mecanicísticos, como o realizado no gene *INS* também tem sido realizadas<sup>28</sup>. Thomsen et al.<sup>50</sup> empregaram o silenciamento de 75 genes candidatos relacionados a DM2 em células  $\beta$  EndoC- $\beta$ H1 (modelo representativo para estudo da fisiologia e secreção de insulina humana) e revelaram que 45 genes, entre eles *ARL15*, *ZMIZ1*, e *THADA* estão relacionados ao funcionamento deste tipo celular.<sup>50</sup> Em 2019, Grotz et al.<sup>28</sup> elaboraram um modelo bem-sucedido ao empregar a técnica de CRISPRko para silenciar os genes *INS*, *IDE* e *PAM* em células  $\beta$  EndoC- $\beta$ H1, favorecendo o entendimento dos mecanismos moleculares da disfunção de células  $\beta$  e patogenia de DT1 e DT2.<sup>28</sup>

Apesar de não corresponderem fielmente ao sistema *in vivo* por uma série de fatores específicos, ensaios utilizando modelos *in vitro* funcionam como uma base de estudo por fornecem melhor entendimento sobre os genes envolvidos na fisiopatologia da DM enquanto que, a geração de *Knockouts* permite que um gene específico seja desligado possibilitando a observação do que acontece quando um organismo se desenvolve sem esse gene. A ideia é que utilizar um sistema que permite editar genes para entender seu funcionamento possa permitir futuramente que estas células sejam devolvidas ao paciente com DM, na esperança de que tais células possam ajudar a combater a doença.

Em termos práticos, há o risco de a modificação dos genes possam criar efeitos diferentes do esperado. Um ponto de preocupação é que danos genômicos, observados após a edição por CRISPR-Cas9, possam ter consequências como, por exemplo, a formação de genótipos complexos e diferentes do esperado com sequências de RNA que possam ser prejudiciais à saúde trazendo à tona o dilema ético das técnicas de edição

gênica. Neste sentido, os modelos *in vivo*, especialmente os murinos, devem ser aplicados uma vez que sua caracterização fenotípica e genotípica é bem delineada, além do manuseio simples, embora apresentem diferenças estruturais, transcricionais e fisiológicas de células humanas.<sup>28,31,50</sup> Podem ser gerados de forma espontânea, congênita, induzida por dieta ou quimicamente, bem como de modo cirúrgico.<sup>51</sup> São ideais em doenças metabólicas para que se observem interações que envolvem a fisiologia e a regulação metabólica de células e tecidos, que podem definir um fenótipo clínico. Auxilia, então, na caracterização de genes e vias relacionadas.<sup>26,52</sup>

Para estudo da DT1, Lin et al.<sup>53</sup> obtiveram animais com aumento de autoanticorpos para insulina e maior penetrância gênica de DT1, através de alterações por CRISPR-Cas9 em “NOD mouse”, que compartilha com seres humanos diversas vias associadas à doença. Foi adicionada uma variante alélica mutada da proteína fosfatase não-receptora do tipo 22, a *PTPN22*, associada ao aumento do risco de diabetes de 2 a 4 vezes.<sup>53</sup> Em relação à DT2, em 2018, Roh et al.<sup>54</sup> empregaram a ferramenta para geração de *knockout* nos genes da leptina (*LEP*) e de seu receptor (*LEPR*), relacionados a quadros de obesidade. Apesar de ocorrer raramente em humanos, em roedores, mutações nestes genes estão relacionadas à obesidade precoce e resistência à insulina. Este modelo promete ser um promissor para o estudo de diabetes e obesidade.<sup>54</sup>

### **CRISPR-Cas9 e a prática clínica em DM: diagnóstico e terapêutica**

Uma série de métodos diagnósticos para diabetes têm sido desenvolvidos com emprego das propriedades da CRISPR-Cas9, sendo o exemplo mais prático, a localização direta de variantes patogênicas associadas a adaptação da sequência de RNA-guia para reconhecimento sítio-específico.<sup>4</sup> Esse artifício pode ser usado para diagnóstico preditivo e diferencial, e contribuir para melhores estratégias na prática clínica.<sup>16</sup>

No caso da diabetes monogênica, o tratamento pode ser realizado com ou sem a confirmação da mutação a partir da triagem e diagnóstico clínico. Entretanto, a identificação de genes afetados é um artifício para oferecer abordagens terapêuticas mais precisas e diagnóstico diferencial em relação às outras formas da diabetes.<sup>16</sup> Já no caso da DT1, apesar de sua característica poligênica, há predominância de erros associados a haplótipos definidos do sistema HLA e de outros genes específicos que podem contribuir para um diagnóstico precoce de forma a prevenir a perda de células  $\beta$  por autoimunidade e melhorar o prognóstico e estilo de vida do paciente a partir de uma abordagem direcionada de tratamento.<sup>12</sup> Em se tratando de DT2, é primordial que se leve em consideração a interação gene-ambiente para o desenvolvimento da diabetes. Desta maneira, o reconhecimento de regiões associadas a doença de maneira precoce a seu

estabelecimento tem o potencial de beneficiar pacientes com histórico familiar de risco ou pré-diabéticos, favorecendo intervenções em estilo de vida e tratamento farmacológico personalizado.<sup>17,27</sup>

Apesar de ainda serem necessárias otimizações em seu funcionamento, o uso de CRISPR voltada à terapêutica da diabetes tem sido apenas testada em modelos animais para que, no futuro, sejam possíveis estudos clínicos de aplicação em humanos.<sup>55</sup> Em virtude dos genes associados a DT1 afetarem os sistemas imunes inato e adaptativo, estratégias promissoras ao tratamento estão associadas tanto a geração de células  $\beta$  substitutas e a manipulação da tolerância das células  $\beta$  pancreáticas ao ataque autoimune, quanto ao desempenho e efetividade das células de defesa responsáveis por esse ataque, ao reconhecer antígenos específicos. Deste modo, a edição gênica por CRISPR-Cas9 pode interferir no mecanismo de apresentação de antígenos por meio da desestruturação do componente MHC, impedindo a apresentação de antígenos próprios pelas células  $\beta$ , e também no reconhecimento pelo do mecanismo de memória celular.<sup>10,62</sup>

Este cenário de pesquisas para projeção de células  $\beta$  por CRISPR foi citado por Gerace et al.<sup>56</sup> De acordo com os pesquisadores, o direcionamento do CRISPR-Cas9 para ativação de fatores de transcrição pancreática e/ou receptores de quimosinas em células-tronco mesenquimais (MSCs) pode tornar possível a diferenciação de MSCs em células produtoras de insulina (IPCs) substitutas, capazes de manter suas propriedades imunomoduladoras através da expansão *ex vivo* e transplante.<sup>56</sup> Sneddon et al.,<sup>4</sup> também enfatiza a importância de se conseguir gerar células  $\beta$  funcionais a partir de células-tronco para secreção de insulina a fim de que possam substituir ilhotas pancreáticas.<sup>4</sup> Entretanto, tais estudos esbarram na problemática de que células  $\beta$  não existem em isolamento no modelo *in vivo*, mas sim em um microambiente dotado da presença de outras células pancreáticas, em que, inclusive, a organização no modelo humano se difere de roedores tanto em quantidade como em disposição de células  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ .<sup>57,58</sup> O bom funcionamento endócrino de células  $\beta$  dependem da citoarquitetura da ilhota, considerando-se as interações e contatos célula-célula no microambiente. Para resolução destes problemas, tem estado em voga a mimetização deste microambiente, como, por exemplo, por meio de estruturas tridimensionais.<sup>59</sup> Outra problemática é a modulação do sistema imune em resposta à implantação destas células, uma vez que agentes de imunossupressão empregados são efetivos, mas pode ser necessário um tratamento a longo prazo para se evitar rejeição o que pode vulnerabilizar o sistema imune além de serem citotóxicos para as próprias células  $\beta$ .<sup>4</sup> Como essa resposta é, em sua maioria, modulada pelo sistema HLA, Lin et al (2014), com emprego de CRISPR-Cas9 demonstrou o silenciamento da expressão dos componentes de MHC em

células tronco-embrionárias para prevenir a apresentação antigênica e, assim, uma cascata de resposta imunológica, reduzindo-se a probabilidade de uma resposta aloimune e autoimune.<sup>53</sup>

A geração de células secretoras de insulina pode ser aplicada como terapêutica e transplante em pacientes diabéticos. Giménez et al.,<sup>44</sup> demonstraram *in vitro*, ao aplicar CRISPRa fundido a ativadores transcricionais (dCas9-VP160) em células fibroblásticas humanas, a ativação do gene *INS* que comumente é silenciado epigeneticamente com um promotor totalmente metilado neste tipo de célula.<sup>45</sup> *In vivo*, Liao et al.<sup>60</sup> empregou CRISPR-Cas9 para realizar a ativação do gene *PDX1*, um fator de transcrição fundamental para a função e sobrevivência das células  $\beta$  pancreáticas.<sup>60,61</sup> Eles demonstraram a superexpressão do referido gene em células do fígado, ao gerar células secretoras de insulina que posteriormente foram utilizadas no tratamento da DT1 em camundongos.<sup>60</sup> Ma et al.<sup>62</sup> demonstraram que células tronco pluripotentes que continham mutação pontual no gene *INS* foram diferenciadas em células pancreáticas incapazes de sintetizar insulina e, após sofrerem correção genética com o sistema CRISPR-Cas9 iniciaram a síntese do hormônio.<sup>62</sup> A deleção gênica por CRISPR-Cas9 em modelo murino foi aplicada Cho et al.,<sup>63</sup> em 2019, para estudo em DT2 a fim de editar o gene *DPP-4*, associado à regulação da concentração do “peptídeo glucagon-like” (GLP-1) que estimula a secreção de insulina, de forma a ocasionar um aumento da sua expressão/produção (up-regulation). Foi demonstrado que, após a edição gênica, os níveis de insulina em corrente periférica foram aumentados o que leva a crer que mais uma estratégia de tratamento pode ser aplicada em humanos futuramente.<sup>63</sup>

Apesar de promissores, seus padrões de utilização ainda são conflitantes de modo que a maior preocupação se dá com a segurança dos protocolos desenvolvidos. Como descrito por Qomi et al.,<sup>35</sup> os desafios para a adoção de CRISPR consistem desde a identificação do alvo correto para a modificação desempenhada pela ferramenta, até a entrega deste sistema ao núcleo celular.<sup>35</sup> Estes fatos podem levar a diminuição da eficácia da terapia, o que motiva a procura por melhores métodos de reconhecimento e transferência ao núcleo.<sup>64</sup> A resolução de tais limitações técnicas é foco da comunidade científica atualmente, de modo que diversas melhorias já foram realizadas com objetivo de redução de erros aleatórios na identificação do gene alvo, bem como nas diversas estratégias de entrega da ferramenta com emprego ou não de vetores.<sup>51</sup>

Apesar do seu inegável potencial terapêutico, ao permitir edições em alterações genéticas e epigenéticas *in vivo*, e modificações em modelos de linhagens germinativas e somáticas, seu emprego leva ao questionamento bioético referente a riscos clínicos em aplicações terapêuticas e não-terapêuticas, e que, portanto, devem ser discutidos no que se referem a princípios

morais, religiosos, políticos e até mesmo econômicos.<sup>65-67</sup> A Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (Unesco) manifesta que a técnica seja utilizada apenas com finalidades terapêuticas, diagnósticas e preventivas e não para tratamentos que gerem modificações hereditárias. Nas aplicações terapêuticas embrionárias, a controvérsia envolve as implicações, ainda pouco conhecidas, que essas alterações em embriões poderiam trazer para futuras gerações e mesmo se bem-sucedidas, há o risco desses tratamentos se tornarem pouco acessíveis, possibilitando o elitismo genético no qual apenas “alguns” possam gerar linhagens livres de doenças genéticas.<sup>68</sup>

### Conclusão

Embora a DM seja uma condição amplamente estudada, conhecida e descrita na medicina contemporânea, a doença apresenta alta recorrência entre indivíduos de diversas faixas etárias e uma série de comorbidades, além da problemática associada ao diagnóstico quanto à verdadeira etiologia da doença e abordagens terapêuticas melhor aplicáveis a cada caso. Trata-se de um desafio atingir independência à insulina exógena e restauração de glicemia a níveis normais uma vez que as terapias “*gold standard*” já empregadas na clínica possuem aspectos limitantes. Desta forma, é

relevante o papel de ferramentas inovadoras como a edição gênica, a fim de permitir melhor entendimento da fisiopatologia da DM de forma direcionar estratégias que possam contribuir com abordagens de diagnóstico e terapêutica personalizadas.

Desde sua recente descoberta para propósitos terapêuticos até o momento atual, apesar dos desafios metodológicos, o sistema CRISPR-Cas9 apresenta inúmeras vantagens em relação aos possíveis alvos para DM. Essas vantagens, futuramente, podem elevar o potencial clínico da metodologia, no entanto, esbarra em uma série de limites bioéticos que devem ser levados em consideração e discutidos pela comunidade médico-científica de forma a garantir uma aplicação não só eficaz, mas principalmente segura e dentro dos princípios legais da ética.

**Conflito de interesse:** Os autores declararam não haver nenhum conflito de interesse.

**Agradecimentos:** À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e em especial à Pró-reitoria de Extensão (PROEX) pelas bolsas de extensão institucionais concedidas aos alunos da Liga Acadêmica de Genética Humana e Médica (LAGHM/UNIFAL-MG).

### Referências

1. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Hamosh A. Thompson & Thompson: Genética Médica. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.
2. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9<sup>th</sup> edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;157: 107843-107853.
3. Williams R, Karuranga S, Malanda B, Saeedi P, Basit A, Besançon S, et al. Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9<sup>th</sup> edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;108072-10808078.
4. Sneddon JB, Tang Q, Stock P, Bluestone JA, Roy S, Desai T, Hebrok M. Stem Cell therapies for treating diabetes: progress and remaining challenges. *Cell Stem Cell.* 2018;22(6):810–23.
5. Kaufmann KB, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med.* 2013;5(11):1642–61.
6. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun.* 2018; 9(1):1-13.
7. Khan SH. Genome-editing technologies: concept, pros, and cons of various genome-editing techniques and bioethical concerns for clinical application. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019;16:326–34.
8. Li H, Yang Y, Hong W, Huang M, Wu M, Zhao X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):1-23.
9. Koeppen BM, Stanton BA. Berne & Levy: Fisiologia. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2018.
10. Teo AKK, Gupta MK, Doria A, Kulkarni RN. Dissecting diabetes/metabolic disease mechanisms using pluripotent stem cells and genome editing tools. *Mol Metab.* 2015;4(9):593–604.
11. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1(1):1–22.
12. Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, Jacobsen LM, Schatz DA, Lernmark A. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3(1):1–18.
13. Cuschieri S. The genetic side of type 2 diabetes – A review. *Diabetes Metab Syndr.* 2019;13(4):2503 6.
14. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, et al. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes.* 2017;66(2):241–255.
15. Karaa A, Goldstein A. The spectrum of clinical presentation, diagnosis, and management of

- mitochondrial forms of diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2015;16(1):1–9.
16. Misra S, Owen KR. Genetics of monogenic diabetes: present clinical challenges. *Curr Diab Rep*. 2018;18(12):141.
  17. Kleinberger JW, Pollin TI, Medicine G. Personalized medicine in diabetes mellitus: current opportunities and future prospects. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1346(1):45–56.
  18. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38:S8–16.
  19. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014;383(9911):69–82.
  20. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018;391(10138):2449–62.
  21. Care D, Suppl SS. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes - 2019. *Diabetes Care*. 2019;42:S13–28.
  22. Törn C, Hadley D, Lee HS, Hagopian W, Lernmark Å, Simell O, et al. Role of type 1 diabetes associated SNPs on risk of autoantibody positivity in the TEDDY study. *Diabetes*. 2015;64(5):1818–29.
  23. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840–6.
  24. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 2007;445(7130):881–5.
  25. Beer NL, Gloyn AL. Genome-edited human stem cell-derived beta cells: a powerful tool for drilling down on type 2 diabetes GWAS biology. *F1000Res*. 2016;5:1–12.
  26. da Silva Xavier G, Hodson DJ. Mouse models of peripheral metabolic disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2018;32(3):299–315.
  27. Kwak SH, Park KS. Recent progress in genetic and epigenetic research on type 2 diabetes. *Exp Mol Med* 2016;48(3):e220.
  28. Grotz, AK, Abaitua F, Navarro-Guerrero E, Hastoy B, Ebner D, Gloyn AL. A CRISPR/Cas9 genome editing pipeline in the EndoC- $\beta$ H1 cell line to study genes implicated in beta cell function. *Wellcome Open Res*. 2019;4:150.
  29. Bonnefond A, Clément N, Fawcett K, Yengo L, Vaillant E, Guillaume JL, et al. Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2012;44(3):297–301.
  30. Mahajan A, Taliun D, Thurner M, Robertson NR, Torres JM, Rayner NW, et al. Fine-mapping of an expanded set of type 2 diabetes loci to single-variant resolution using high-density imputation and islet-specific epigenome maps. *Nat Genet*. 2018;50(11):1505–13.
  31. Balboa D, Prasad RB, Groop L, Otonkoski T. Genome editing of human pancreatic beta cell models: problems, possibilities and outlook. *Diabetologia*. 2019;62(8):1329–1336.
  32. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(11):722–36.
  33. Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*. 2015;117:119–28.
  34. Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*. 2017;7:67–78.
  35. Qomi, SB, Asghari, A, Mojarrad, M. An Overview of the CRISPR-based genomic and epigenome editing system: function, applications, and challenges. *Adv Biomed Res*. 2019;8:49.
  36. Jiang F, Doudna JA. CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys*. 2017;46:505–29.
  37. Wu X, Kriz AJ, Sharp PA. Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quant Biol*. 2014;2(2):59–70.
  38. Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*. 2017;168(1–2):20–36.
  39. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096.
  40. Wang H, La Russa M, Qi LS. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annu Rev Biochem*. 2016;85(1):227–64.
  41. Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods*. 2014;11(4):399–402.
  42. Larson MH, Gilbert LA, Wang X, Lim WA, Weissman, JS, Qi LS. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat protoc*. 2013;8(11):2180–96.
  43. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 2013;154(2):442–51.
  44. Giménez CA, Ielpi M, Mutto A, Grosebacher L, Argibay P, Pereyra-Bonnet F. CRISPR-on system for the activation of the endogenous human INS gene. *Gene Ther*. 2016;23(6):543–7.
  45. Doench JG. Am i ready for CRISPR? A user’s guide to genetic screens. *Nat Rev Genet*. 2018;19(2):67–80.
  46. Kuscu C, Parlak M, Tufan T, Yang J, Szlachta K, Wei X, Mammadov R, Adli M. CRISPR-STOP: Gene silencing through base-editing-induced nonsense

- mutations. *Nat Methods*. 2017;14(7):710–12.
47. Chen C, Cohrs CM, Stertmann J, Bozsak R, Speier S. Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Mol Metab*. 2017;6(9):943–57.
  48. Balboa D, Saarimäki-Vire J, Borshagovski D, Survila M, Lindholm P, Galli E, et al. Insulin mutations impair beta-cell development in a patient-derived iPSC model of neonatal diabetes. *Elife*. 2018;7:e38519.
  49. Zhu Z, Li QV, Lee K, Rosen BP, González F, Soh CL, et al. Genome Editing of Lineage Determinants in Human Pluripotent Stem Cells Reveals Mechanisms of Pancreatic Development and Diabetes. *Cell Stem Cell*. 2016;18(6):755–68.
  50. Thomsen SK, Ceroni A, Van De Bunt M, Burrows C, Barrett A, Scharfmann R, et al. Systematic functional characterization of candidate causal genes for type 2 diabetes risk variants. *Diabetes*. 2016;65(12):3805–11.
  51. Wang HX, Li M, Lee CM, Chakraborty S, Kim HW, Bao G, et al. CRISPR/Cas9-Based genome editing for disease modeling and therapy: Challenges and opportunities for nonviral Delivery *Chem Ver*. 2017;117(15):9874–06.
  52. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes. *Diabet Med* 2004;22(4):359–70.
  53. Lin X, Pelletier S, Gingras S, Rigaud S, Maine CJ, Marquardt K, et al. CRISPR-Cas9-mediated modification of the NOD mouse genome with Ptpn22R619W mutation increases autoimmune diabetes. *Diabetes*. 2016;65(8):2134–8.
  54. Roh JI, Lee J, Park SU, Kang YS, Lee J, Oh AR, et al. CRISPR-Cas9-mediated generation of obese and diabetic mouse models. *Exp Anim*. 2018;67(2):229–37.
  55. Uppada V, Gokara M, Rasineni GK. Diagnosis and therapy with CRISPR advanced CRISPR based tools for point of care diagnostics and early therapies. *Gene*. 2018;656:22–29
  56. Gerace D, Martiniello-Wilks R, Nassif NT, Lal S, Steptoe R, Simpson AM. CRISPR-targeted genome editing of mesenchymal stem cell-derived therapies for type 1 diabetes: A path to clinical success? *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):62.
  57. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(7):2334–39
  58. Bosco D, Armanet M, Morel P, Niclauss N, Sgroi A, Muller YD, et al. Unique arrangement of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in human islets of Langerhans. *Diabetes*. 2010;59(5):1202–10.
  59. Wojtuszczyk A, Armanet M, Morel P, Berney T, Bosco D. Insulin secretion from human beta cells is heterogeneous and dependent on cell-to-cell contacts. *Diabetologia*. 2008;51(10):1843–52.
  60. Liao HK, Hatanaka F, Araoka T, Reddy P, Wu MZ, Sui Y, et al. In vivo target gene activation via CRISPR/Cas9-Mediated trans-epigenetic modulation. *Cell*. 2017;171(7):1495–507.
  61. Fujimoto K, Polonsky, KS. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic  $\beta$ -cell survival. *Diabetes Obes Metab*. 2009;11:30-7.
  62. Ma S, Viola R, Sui L, Cherubini V, Barbetti F, Egli D.  $\beta$  Cell replacement after gene editing of a neonatal diabetes-causing mutation at the insulin locus. *Stem Cell Rep*. 2018;11(6):1407–15.
  63. Cho EY, Ryu JY, Lee HAR, Hong SH, Park HS, Hong KS, et al. Lecithin nano-liposomal particle as a CRISPR/Cas9 complex delivery system for treating type 2 diabetes. *J Nanobiotechnology*. 2019;17(1):19-31.
  64. Wilbie D, Walther J, Mastrobattista E. Delivery aspects of CRISPR/Cas for in vivo genome editing. *Acc Chem Res*. 2019;52(6):1555–64.
  65. Kang XJ, Caparas CI, Soh BS, Fan Y. Addressing challenges in the clinical applications associated with CRISPR/Cas9 technology and ethical questions to prevent its misuse. *Protein Cell*. 2017;8(11):791–5.
  66. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015;6(5):363–72.
  67. Munsie M, Gyngell C. Ethical issues in genetic modification and why application matters. *Curr Opin Genet Dev*. 2018;52:7–12.
  68. Pluvinage JF, Fonseca O, Velho R. Tecnologia inovadora na edição de genes e desafia limites éticos. *Ciênc Cult*. 2018;70.