



© Arquivo pessoal

Insubiota: um tratamento alternativo para diabetes

APRESENTAÇÃO EM BOSTON É PREMIADA COM MEDALHA DE OURO

As injeções de insulina para o tratamento da diabetes têm salvado incontáveis vidas desde que foram usadas pela primeira vez, na década de 1920. Desde então, o processo de produção passou por enormes avanços, com melhoras no rendimento e grau de pureza do produto, além da geração de análogos de insulina que ampliaram as opções de tratamento. Porém, a forma de administração continua inalterada. Neste contexto, o projeto Insubiota propõe uma abordagem completamente inovadora para a administração da insulina, fazendo uso de bactérias probióticas que naturalmente povoam o intestino humano.

Na última década, aumentou o interesse pelo papel desempenhado pelo microbioma humano, tanto na saúde como na doença. A relação comensal que desenvolvemos com nossa microbiota ao longo da evolução parece

ir além da digestão e proteção contra agentes patogênicos. Estudos recentes mostraram que a microbiota intestinal desempenha um papel ativo nos processos imunológicos, de resistência à insulina, deposição de gordura, inflamação, na pressão arterial e até na depressão[1; 3].

Microrganismos probióticos são, há muito tempo, reconhecidos por fornecer benefícios à saúde, e um número crescente de estudos tem mostrado quais espécies influenciam positivamente a saúde humana. Mas, agora, os cientistas estão começando a modificar geneticamente bactérias probióticas para exibirem um comportamento desejado e ajudarem a tratar doenças específicas. Essas bactérias são chamadas de Probióticos 2.0 ou *Designer Probiotics*[4]. Por exemplo, Steidler e colaboradores criaram uma cepa de *Lactococcus lactis*, a partir da bactéria comumente usada para

batidas com bactérias geneticamente modificadas. Dentre estas, a diabetes se mostra uma forte candidata ao desenvolvimento de um tratamento alternativo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, de 1980 a 2014, o número de indivíduos com diabetes quadruplicou, atingindo cerca de 422 milhões de pessoas[7]. A diabetes mellitus tipo 1, uma forma crônica e mais grave da doença, é caracterizada por deficiência na produção de insulina devido à destruição autoimune de células β -pancreáticas. Neste caso, o paciente produz pouca ou nenhuma insulina, e acaba sendo totalmente dependente do hormônio exógeno para sobreviver. Outros tipos de complicações como neuropatias, retinopatias e doenças cardíacas podem ser desenvolvidos ao longo dos anos como resultado da doença [7; 8]. O tratamento convencional para diabetes consiste em injeções intravenosas periódicas da insulina. No entanto, um grande número de pacientes

Ao lado, foto do time completo, composto por alunos de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e em Farmácia Bioquímica, alunos de pós-graduação do programa Biociências e Biotecnologia aplicadas a Farmácia, e professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp.

OS PROBIÓTICOS GENETICAMENTE MODIFICADOS APRESENTAM UM ENORME POTENCIAL PARA COMBATER DOENÇAS CRÔNICAS

fermentar produtos lácteos, capaz de produzir interleucina-10, uma citocina anti-inflamatória humana. As bactérias modificadas secretam continuamente a interleucina-10 enquanto habitarem o trato intestinal. Quando usada na alimentação dos ratos, *L. lactis* modificada curou ou preveniu a enterocolite experimental[5]. Já Hwang e colaboradores criaram uma *Escherichia coli* probiótica capaz de eliminar a infecção intestinal por *Pseudomonas aeruginosa* em modelos animais e ainda prevenir uma nova infecção[6].

Os probióticos geneticamente modificados apresentam um enorme potencial para combater doenças crônicas, atuando como pequenas fábricas, sintetizando terapêuticos dentro do intestino humano. Colite, diabetes mellitus e intolerância à lactose são alguns exemplos de doenças que poderiam ser com-

expressa rejeição ao método devido à sua natureza invasiva, que causa efeitos colaterais indesejáveis. Assim, estudos de tratamentos alternativos menos invasivos são desejados.

Com essas informações em mãos, o grupo de pesquisa SynBio Unesp aceitou o desafio de construir um probiótico, geneticamente modificado, para a produção de insulina diretamente no intestino do paciente diabético. Foi concebido assim o projeto Insubiota, inscrito na edição de 2017 da Competição Internacional de Máquinas Geneticamente Modificadas – iGEM pelo time iGEM Unesp AQA.

Vários obstáculos precisavam ser transpostos já na concepção do projeto: I) A variante natural da insulina sofre processamento pós-síntese, algo impossível de ser realizado por bactérias probióticas; II) A insulina produzida precisa ser secretada pela bactéria; III) A



Acima, apresentação em Boston. No palco, da esquerda para a direita, Rafael Brull Tuma, Patrick Neves Squizzato e Nathan Vinicius Ribeiro, todos alunos de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Ao lado, placa de petri contendo as bactérias probióticas geneticamente modificadas crescendo em meio de cultura.



capacidade de penetração da insulina através do epitélio intestinal é baixa; IV) A produção de insulina deve ser controlada de acordo com a necessidade do paciente; V) O probiótico geneticamente modificado precisa ser capaz de se instalar, mesmo que temporariamente, na microbiota intestinal da pessoa diabética.


Para dispensar a necessidade de processamento pós-síntese e, assim, possibilitar o uso de bactérias probióticas para a produção de moléculas ativas de insulina, o grupo utiliza um análogo de cadeia única da insulina, desenvolvido por Hwang e colaboradores[9]. Esta variante é sintetizada já em sua forma final ativa, sendo ainda mais estável que a variante natural.

Para a secreção da insulina pela bactéria probiótica, foi adicionado um sinal peptídico à cadeia única da insulina, que serve como um endereçamento, indicando à bactéria como destino final da insulina o ambiente externo. O sinal é removido durante o processo de transporte. Assim, apenas a insulina é liberada pelo probiótico.

A administração de insulina por via oral tem sido intensamente estudada, mas apresenta algumas barreiras que inviabilizam seu uso, como a degradação no trato digestivo superior e a baixa permeabilidade da insulina através do epitélio intestinal. Por se tratar da possível administração da bactéria probiótica e não da insulina diretamente, a degradação deixa de ser uma barreira, já que probióticos são capazes de sobreviver às condições impostas pelo trato digestivo. Para resolver o problema relacionado à absorção, foi adicionado à cadeia da insulina um peptídeo de penetração celular, cuja capacidade de carrear outros peptídeos através de membranas tem sido relatada[10].

O controle da produção de insulina foi planejado para funcionar durante a síntese da insulina. Um sensor molecular de glicose foi projetado para apenas permitir a síntese de insulina, dentro do probiótico, quando o açúcar oriundo da alimentação for detectado.

Por fim, a capacidade de colonização do probiótico geneticamente modificado foi testada, com auxílio de um simulador, na microbiota intestinal de uma pessoa portadora de diabetes tipo I. Sabe-se que nem todo probiótico persiste na microbiota intestinal após ingestão. Também é sabido que bactérias geneticamente modificadas podem apresentar capacidade reduzida de competir com outros microrganismos não modificados. Assim, verificar que o probiótico modificado era capaz de permanecer por pelo menos 24 h na microbiota intestinal de uma pessoa portadora de diabetes tipo I (em ambiente simulado) foi um resultado bastante encorajador.

Esta foi a concepção apresentada pelo time iGEM Unesp AQA na cidade de Boston (USA), em novembro de 2017, e que foi premiada com a medalha de ouro. O trabalho ainda se encontra em fase inicial de desenvolvimento. Por possuir um caráter extremamente inovador, o projeto ainda necessita de muitas provas de funcionamento e otimizações. Mas é exatamente esta capacidade de inovar que é reconhecida pela competição. 

REFERÊNCIAS

- [1] Marques FZ, Mackay CR, Kaye DM. Beyond gut feelings: how the gut microbiota regulates blood pressure. *Nat Rev Cardiol.* 2017.
- [2] Lima-Ojeda JM, Rupprecht R, Baghai TC. "I Am I and My Bacterial Circumstances": Linking Gut Microbiome, Neurodevelopment, and Depression. *Front Psychiatry.* 2017; 8:153.
- [3] Torres-Fuentes C, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. The microbiota-gut-brain axis in obesity. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017; 2(10):747-56.
- [4] Maxmen A. Living therapeutics: Scientists genetically modify bacteria to deliver drugs. *Nat Med.* 2017; 23(1):5-7.
- [5] Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science.* 2000; 289(5483):1352-5.
- [6] Hwang JY, Koh E, Wong A, March JC, Bentley WE, Lee YS, et al. Engineered probiotic *Escherichia coli* can eliminate and prevent *Pseudomonas aeruginosa* gut infection in animal models. *Nat Commun.* 2017; 8:15028.
- [7] Organization WH. Global report on diabetes. France: WHO Press; 2016.
- [8] Ng DT, Sarkar CA. Nisin-inducible secretion of a biologically active single-chain insulin analog by *Lactococcus lactis* NZ9000. *Biotechnol Bioeng.* 2011; 108(8):1987-96.
- [9] Hua QX, Nakagawa SH, Jia W, Huang K, Phillips NB, Hu SQ, et al. Design of an active ultrastable single-chain insulin analog: synthesis, structure, and therapeutic implications. *J Biol Chem.* 2008; 283(21):14703-16.
- [10] Kamei N, Nielsen EJ, Khafagy el S, Takeda-Morishita M. Noninvasive insulin delivery: the great potential of cell-penetrating peptides. *Ther Deliv.* 2013; 4(3):315-26.



Nathan Vinicius Ribeiro, graduando em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.



Danielle Biscaro Pedrolli, professora do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia.