

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Daniela Sayuri Rodrigues Eto
Giovanna Casali Mendes

**O USO DO SISTEMA CRISPR-CAS9 PARA EDIÇÃO DOS CO
RECEPTORES CXCR4 E CCR5 NA TERAPIA DO HIV**

São Paulo
2022

Daniela Sayuri Rodrigues Eto
Giovanna Casali Mendes

**O Uso do sistema CRISPR-CAS9 para edição dos receptores CXCR4 e
CCR5 na terapia do HIV**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Biomedicina
do Centro Universitário São Camilo,
orientado pela Profa.Dra. Marjorie
Mendes Marini e Souza, como
requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo
2022

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Eto, Daniela Sayuri Rodrigues

O uso do sistema CRISPR-CAS9 para edição dos receptores CXCR4 e CCR5 na terapia do HIV / Daniela Sayuri Rodrigues Eto, Giovanna Casali Mendes. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2022.

56 p.

Orientação de Marjorie Mendes Marini e Souza.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2022.

1. HIV 2. Proteína 9 associada à CRISPR 3. Receptores CCR5 4. Receptores CXCR4 5. Terapia antirretroviral de alta velocidade I. Mendes, Giovanna Casali II. Souza, Marjorie Mendes Marini e III. Centro Universitário São Camilo IV. Título

CDD: 573.21

**Daniela Sayuri Rodrigues Eto
Giovanna Casali Mendes**

**O Uso do sistema CRISPR-CAS9 para edição dos receptores CXCR4 e CCR5
na terapia do HIV**

São Paulo, 17 de maio de 2022

Professora Orientadora Dra. Marjorie Mendes Marini e Souza

Professor Examinador Dr. Fábio Mitsuo Lima

Professora Examinadora Dra. Fernanda Sycko Uliana Marchiano

**São Paulo
2022**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter iluminado meu caminho e pela força e sabedoria durante todo esse tempo, fazendo com que eu chegasse até aqui, superando minhas dificuldades.

Aos meus pais Marisa Casali e Nelson Mendes por todo o incentivo, amor e por não terem medido esforços para fazer com que eu concluísse a faculdade e que eu realizasse meus sonhos. A vocês, todo meu amor e gratidão;

Ao meu namorado Luiz Henrique por estar ao meu lado nessa última etapa da graduação, sempre me apoiando, me encorajando e acreditando no meu potencial.

A minha companheira de TCC Daniela Eto, pela amizade e por todo o tempo que dedicamos juntas para chegar até aqui.

E por fim aos professores que estiveram presentes em nossa trajetória no Centro Universitário São Camilo, especialmente à nossa orientadora, professora Dra. Marjorie Mendes Marini e Souza, por ter aceitado o convite e nos acompanhado na elaboração do trabalho.

Giovanna Casali Mendes

Gostaria de agradecer a Deus por ter me ajudado e dado forças nas horas mais difíceis, e ter conseguido chegar até aqui apesar de todas as dificuldades ao longo desses quatro anos de graduação.

Não menos importante, queria agradecer meus pais Claudia Eto e Mario Eto, por terem me apoiado incondicionalmente desde sempre, me ajudado e guiado até aqui, minha gratidão e amor eterno por tudo que já fizeram por mim.

A minha amiga e companheira de TCC, Giovanna Casali, agradeço a nossa amizade e por estar ao meu lado, durante toda essa trajetória da graduação e realização do nosso trabalho.

Aos professores do Centro Universitário São Camilo presentes no decorrer da nossa graduação, meus sinceros agradecimentos por todo conhecimento e experiências compartilhadas conosco, especialmente à nossa orientadora, professora Dra. Marjorie Mendes Marini e Souza, por ter nos acompanhado e orientado com toda a sua paciência na elaboração do trabalho.

Daniela Sayuri Rodrigues Eto

RESUMO

O vírus da imunodeficiência humana surgiu na década de 1980 com uma alta taxa de mortalidade causando uma epidemia global, e em 1983 foi descoberto e identificado como o patógeno da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Os tratamentos contra o HIV estão se tornando cada vez mais eficazes, por isso, a epidemia do vírus é considerada controlada no Brasil, com uma taxa de cerca de 39 mil novos casos ao ano. Apesar da terapia antirretroviral (TARV), reduzir a viremia a níveis extremamente baixos, e prolongar a vida de indivíduos infectados pelo HIV-1, ela possui muitas limitações, como alto custo e efeitos colaterais, mas principalmente, não ser capaz de curar completamente a doença. Portanto, nas últimas décadas, vem sendo muito estudado outras alternativas para erradicar completamente esse vírus do organismo humano, e uma das ferramentas mais utilizadas é a edição gênica. Uma tecnologia encontrada é a utilização do sistema CRISPR-Cas9, que é capaz de editar os genes de interesse, de forma rápida e relativamente fácil. As estratégias anti-HIV desenvolvidas a partir do sistema CRISPR-Cas9 incluem a inativação do genoma pró-viral, excisão do genoma pró-viral, inibição da replicação e alteração da expressão dos co receptores CCR5 e CXCR4. Nessa revisão serão destacados os resultados obtidos com o sistema CRISPR-Cas9 na edição dos genes relacionados à expressão dos co receptores CXCR4 e CCR5, abordando limitações e perspectivas a respeito da aplicação dessa ferramenta como terapia no combate ao HIV.

Palavras chaves: HIV, AIDS, terapia antirretroviral, CRISPR-cas9, terapia gênica, CXCR4, CCR5.

ABSTRACT

The human immunodeficiency virus emerged in 1980 with a high mortality rate causing a global epidemic, and in 1983 it was discovered and identified as the pathogen of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Treatments against HIV are becoming more and more effective, therefore, the epidemic of the virus is considered controlled in Brazil, with a rate of about 39 thousand new cases per year. Despite antiretroviral therapy (TARV), reducing viremia to extremely low levels, and prolonging the life of HIV-1 infected individuals, it has many limitations, such as high cost and side effects, but mainly, not being able to cure the disease completely. Therefore, in the last decades, other alternatives to completely eradicate this virus from the human organism have been studied, and one of the most used tools is gene editing. One technology found is the use of the CRISPR-Cas9 system, which is able to quickly and relatively easily edit the genes of interest. Anti-HIV strategies developed from the CRISPR-Cas9 system include inactivation of the proviral genome, excision of the proviral genome, inhibition of replication and alteration of the expression of CCR5 and CXCR4 co-receptors. In this review, the results obtained with the CRISPR/Cas9 system in editing genes related to the expression of CXCR4 and CCR5 co-receptors will be highlighted, addressing limitations and perspectives regarding the application of this tool as a therapy in the fight against HIV.

Keywords: HIV, AIDS, antiretroviral therapy, CRISPR-cas9, gene therapy, CXCR4, CCR5.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Classificação do HIV

Figura 2- Estrutura do HIV

Figura 3 - Genes do HIV

Figura 4 - Principais proteínas do HIV

Figura 5- Ciclo replicativo do HIV

Figura 6 - Fases da infecção pelo HIV

Figura 7 - Visão geral do sistema imunológico bacteriano CRISPR-Cas9

Figura 8- Complexo cRNA-tracrRNA

Figura 9 - Esquema de clivagem de DNA mediada por CRISPR-Cas9

Figura 10 - Mecanismos de reparo da clivagem de DNA

Figura 11 - Esquema de gRNAs visando o locus CRISPR

Figura 12 - Esquema dos gRNAs para localização do gene CXCR4

Figura 13 - Ensaio T7EN1 em células TCD4+ humanas

Figura 14 - Ensaio de ELISA para detecção de p24

Figura 15 - Análise das mutações fora do alvo

Figura 16 - Localização genômica de CCR5 e as sequências de sgRNA projetadas

Figura 17 - Diagrama esquemático do gRNAs dos alvos CXCR4 e CCR5 e construção do vetor

LISTA DE SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente
Inter Espaçadas	
Cas9	Endonuclease Associada ao CRISPR
crRNAs	RNA CRISPR
CXCR4	C-X-C Receptor de Quimiocina Tipo 4
CCR5	C-C Receptor de Quimiocina Tipo 5
CD4+	Grupamento de Diferenciação 4
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSB	Clivagem da Dupla Cadeia
GFP	Proteína Verde Fluorescente
gRNA	RNA guia
HAART	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
HDR	Recombinação Homóloga
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
ITRN	Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo
ITRNN	Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogos de Nucleosídeo-Nucleotídeo
IP	Inibidores de protease
LTR	Repetição Terminal Longa
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NHEJ	Recombinação Não Homóloga
tracrRNA	Trans-Activating CRISPR RNA
TALEN	Ativadores de transcrição como nucleases efetoras
TARV	Terapia Antirretroviral
T CD4+	Linfócito TCD4+
T7EN1	T7 Endonuclease 1
PAM	Motivos Adjacentes ao Protoespaçador
PCR	Reação da Cadeia da Polimerase
PVHA	Pessoas Vivendo com HIV

RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RT	Transcriptase reversa
R5X4	Vírus trópico para CCR5 e CXCR4
SINAN	Sistema de Informações de Agravos de Notificação
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
X4-Tropic	Vírus trópico para CXCR4
ZFNs	Nucleases Dedo de Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos gerais.....	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. METODOLOGIA	4
4. DESENVOLVIMENTO.....	5
4.1. Dados epidemiológicos	5
4.2 Classificação do HIV.....	6
4.3 Biologia estrutural do HIV.....	7
4.4 Ciclo replicativo.....	10
4.5 Fases da infecção pelo HIV.....	13
4.6 Terapia antirretroviral (TARV).....	15
4.7 Terapia Gênica	18
4.8 Sistema CRISPR Cas-9	19
4.9 Genes de interesse para a terapia gênica.....	25
4.9.1 Gene CCR5	25
4.9.2 Gene CXCR4	25
5.0 Edição dos co receptores CXCR4 e CCR5	26
5.0.1 Edição do co receptor CXCR4	26
5.0.2 Edição do co receptor CCR5	31
5.0.3 Edição simultânea dos co receptores CXCR4 e CCR5	33
6.0 Questões éticas	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) pertence ao gênero dos Lentivírus (*Lentiviridae*) e a família dos Retrovírus (*Retroviridae*), ele causou uma epidemia global desde que foi descoberto e confirmado como o patógeno da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) em 1983. Esse vírus pode causar imunodeficiência progressiva e distúrbios neurocognitivos graves e, eventualmente, levar à AIDS. Embora a terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) possa reduzir a viremia a níveis clinicamente indetectáveis e prolongar a vida de indivíduos infectados pelo HIV-1, ela tem muitas limitações, como alto custo e efeitos colaterais, como resistência a drogas e toxicidade. Além disso, o reservatório de infecção latente pelo HIV-1 pode causar um rebote do vírus uma vez que a terapia antirretroviral (TARV) seja interrompida, portanto, há uma necessidade urgente de desenvolver abordagens terapêuticas alternativas (SANTOS., 2015).

A entrada do HIV-1 é mediada por sua glicoproteína do envelope de superfície por ligação sequencial ao receptor primário celular CD4 e, em seguida, a um receptor de quimiocina CCR5 ou CXCR4. O CCR5, que é expresso em linfócitos, células mielóides ou subconjuntos de células T CD4⁺, é responsável pelo estabelecimento de novas infecções e é dominante na fase crônica da infecção. Os raros indivíduos da mutação homozigótica de CCR5-Δ32 de ocorrência natural são altamente resistentes à infecção por HIV-1 e não têm alterações fenotípicas óbvias, exceto para aumentar a suscetibilidade a alguns patógenos. Uma vez que a infecção esteja estabelecida, o HIV-1 pode usar o CXCR4 como um receptor alternativo para entrada. As cepas de HIV-1 com tropismo X4 estão presentes em metade das infecções em estágio avançado e estão associadas a uma progressão mais rápida da doença. Com base em descobertas anteriores, tanto o CCR5 quanto o CXCR4 podem servir como alvos terapêuticos por tecnologias de engenharia de genoma (HOU *et al.*, 2015).

Foi demonstrado que a interrupção do co receptor CCR5 de células T CD4⁺ autólogas por nucleases de dedo de zinco (ZFNs) pode inibir eficientemente a infecção por HIV-1 em células T CD4⁺. A modificação genética de ambos CCR5 e CXCR4 em células T CD4⁺ humanas primárias por

ZFN protege as células da infecção de cepas de HIV-1 trópicas de CCR5 e CXCR4. (HOU *et al.*, 2015).

Recentemente, a edição genética mediada pela repetição palindrômica curta regularmente interespaçada (CRISPR) fornece uma abordagem alternativa para a interrupção do gene (HOU *et al.*, 2015).

O sistema CRISPR-cas9 foi originalmente identificado em bactérias e arqueias como parte de um sistema imune adaptativo, consistindo em RNAs (crRNAs) e proteínas associadas a CRISPR para reconhecer e degradar sequências complementares de vírus e plasmídeos invasores. Este sistema demonstrou ter um enorme potencial para edição de genes em uma variedade de hospedeiros, como plantas, peixe-zebra, drosófila, camundongos, rhesus e também em células humanas. A ferramenta de edição de genoma de última geração do sistema CRISPR-Cas9 tipo II induz quebras de fita dupla de DNA (DSB). A clivagem da cadeia pode estimular mecanismos de reparo celular, incluindo recombinação não homóloga (NHEJ) e a recombinação homóloga (HDR), mas na maioria das circunstâncias, NHEJ é o mecanismo predominante para reparar DSB. Essa via de reparo é acompanhada por inserções, deleções ou mutações de frame-shift de nucleotídeos, consequentemente levando à ruptura ou modificações gênicas (XIAO *et al.*, 2019).

Recentemente, o CCR5 foi direcionado com sucesso usando ativadores de transcrição como nucleases efetoras (TALEN) e CRISPR-Cas9 em células-tronco pluripotentes e células-tronco hematopoiéticas. No entanto, o direcionamento de CXCR4 por CRISPR-Cas9 ainda precisa ser desenvolvido (XIAO *et al.*, 2019). No estudo de HOU *et al.*, 2015 foi utilizado o sistema CRISPR-Cas9 para introduzir mutações de perda de função CXCR4 em células Ghost-CXCR4, células Jurkat e células T CD4⁺ humanas primárias. A inativação bialélica de CXCR4 pela entrega mediada por lentivírus de CRISPR-cas9 tornou as células modificadas resistentes à infecção por HIV-1. A análise de sequência de locais fora do alvo previstos revelou direcionamento específico de CXCR4 e mutagênese fora do alvo desprezível. Portanto, a interrupção CRISPR-Cas9 de CXCR4 fornece uma excelente ferramenta de modificação de gene para aplicação terapêutica no futuro (HOU *et al.*, 2015).

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Discutir por meio de uma revisão bibliográfica o uso do sistema CRISPR-cas9 para a edição dos co receptores CXCR4 e CCR5 com intuito de apontar uma possível terapia gênica capaz de impedir a entrada do HIV no linfócito T CD4 +.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Compreender o mecanismo de ação do HIV;
- Obter conhecimento do funcionamento do mecanismo do sistema CRISPR-Cas9;
- Entender como o sistema CRISPR-Cas9 vem sendo estudado para ser utilizado na edição de co receptores, sendo uma possível tratamento para o HIV;
- Analisar os benefícios da terapia gênica e suas limitações, além de colocar em pauta questões éticas.

3. METODOLOGIA

O estudo foi desenvolvido através de uma revisão bibliográfica, em que se utilizou como critério estudos publicados nos anos de 2000 a 2021 nas bases de dados Scielo, PubMed, Google Acadêmico, Science Direct e arquivos de órgãos governamentais. Foi reunido e comparado os diferentes dados encontrados nas fontes de consulta, listando os principais artigos.

Para o levantamento das informações foram utilizados os seguintes descritores: HIV, AIDS, terapia antirretroviral, CRISPR-cas9, terapia gênica, CXCR4, CCR5.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

O vírus da imunodeficiência humana surgiu na década de 1980 com uma alta taxa de mortalidade. Os tratamentos são eficazes, por isso, a epidemia é considerada controlada no Brasil, com uma taxa de cerca de 39 mil novos casos ao ano. Pelo menos um terço, aproximadamente 150 mil pessoas, não sabe de sua condição, segundo estimativa do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2020).

Em contrapartida à taxa constante de novos casos, a taxa de soropositividade em jovens está aumentando, mais de 50% em seis anos, isso indica uma necessidade de mais campanhas voltadas para o público jovem, em relação ao uso do preservativo e da testagem frequente, tendo em vista que um dos principais motivos de mortalidade pela AIDS é o diagnóstico tardio (MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2020).

A taxa de mortalidade padronizada sofreu decréscimo de 30,6% entre 2014 e 2020, por conta do tratamento oferecido gratuitamente pelo SUS. (MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2020). A recomendação da ONU é que o tratamento deve ser iniciado assim que o diagnóstico é feito, independente da carga viral ou do estado de saúde da pessoa, para evitar o desenvolvimento da doença mais grave e reduzir o risco de transmissão. O Brasil é considerado pioneiro no tratamento do HIV, foi o primeiro país a oferecer gratuitamente a terapia antirretroviral combinada (GRANGEIRO *et al.*, 2009).

A doença era originalmente associada à população homossexual masculina, devido à transmissão sexual do vírus ser mais eficiente pela forma anal (JUNIOR., 2002). O maior número de casos novos corresponde a heterossexuais (67,5% em 2012, 58% dos quais eram mulheres), dessa forma, não se fala mais em grupo de risco, mas sim em comportamento de risco, como a relação sexual sem preservativo. Um terço dos jovens admitiu não usar o preservativo nunca ou quase nunca, e poucos tinham conhecimento da profilaxia pós-exposição, que já se encontra disponível no Brasil, e pode ser administrada até 72 horas após uma situação de alto risco para contrair o HIV (PECHANSKY., 2001).

Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), de 2007 até junho de 2020, foram notificados 342.459 casos de infecção pelo HIV no Brasil, sendo 152.029 (44,4%) na região Sudeste, 68.385 (20,0%) na região Sul, 65.106 (19,0%) na região Nordeste, 30.943 (9,0%) na região Norte e 25.966 (7,6%) na região Centro-Oeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2021).

Um grande problema associado ao HIV é a transmissão vertical, de mãe para o filho, seja na gestação, parto ou amamentação, que ainda é uma importante fonte de contaminação. Desde 2000, a faixa etária entre 20 e 24 anos é a que apresenta o maior número de casos de gestantes infectadas pelo HIV (27,6%), notificadas no SINAN entre 2000 e junho de 2020. Segundo a escolaridade, observa-se que o maior percentual das gestantes infectadas com HIV estudou da 5ª à 8ª série incompleta, representando 28,3% do acumulado de casos notificados no período (MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2021).

De acordo com o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS), até 2020, 37,6 milhões de pessoas estavam vivendo com HIV no mundo, 1,5 milhões de pessoas foram infectadas recentemente por HIV, 690 mil pessoas morreram de doenças relacionadas à AIDS, 27,4 milhões de pessoas tiveram acesso à terapia antirretroviral, 77,5 milhões de pessoas morreram de doenças relacionadas à AIDS desde o início da epidemia até o final de 2020 (UNAIDS., 2021).

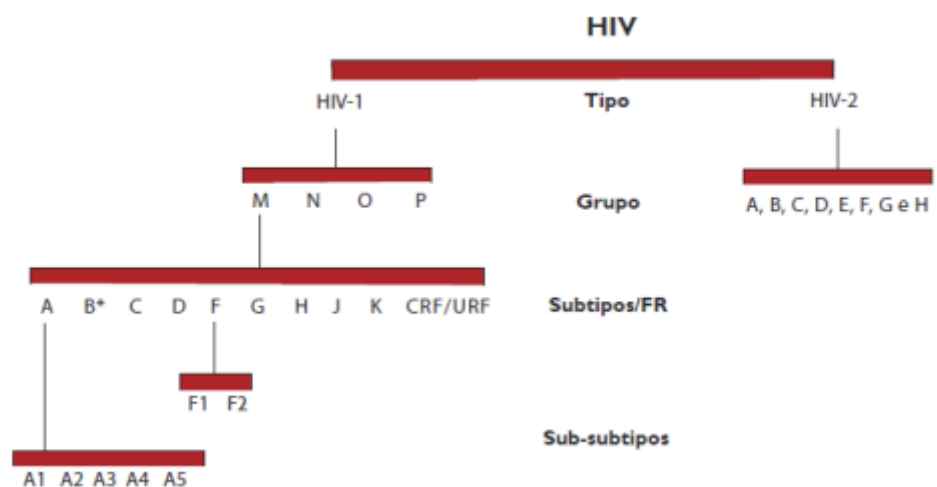
4.2 CLASSIFICAÇÃO DO HIV

Existem dois tipos de HIV, o HIV-1 causa a maioria das infecções na maioria dos países, exceto na África Ocidental, onde o HIV-2 provoca a maioria dos casos. Em determinadas áreas da África Ocidental, ambos os microrganismos são prevalentes e podem co infectar os pacientes. Segundo estudos, o HIV-2 parece ser menos virulento do que o HIV-1 (FANALES-BELASIO *et al.*, 2010).

A classificação do HIV é feita por meio da análise filogenética de sequências nucleotídicas, como podemos ver na figura 1, o HIV-1 é subdividido em 4 grupos: M, que é o grupo com maior importância, pelo fato de ser ele o responsável pela pandemia global, N (new), grupo O que consiste de um *pool* altamente divergente, com cepas geneticamente relacionadas sem um

clado definido e P, que foi recentemente identificado. O grupo M envolve nove subtipos genéticos puros destinados pelas letras: A, B, C, D, F, G, H, J e K. Alguns subtipos do grupo M dividem-se em subtipos, devido a uma identificação mais específica de suas estruturas filogenéticas. As variantes dos subtipos A e F são ainda segregadas como subtipos A1, A2, A3, A4 e A5 e F1 ou F2 respectivamente (ROSA, SILVA, HORA., 2015).

Figura 1- Classificação do HIV



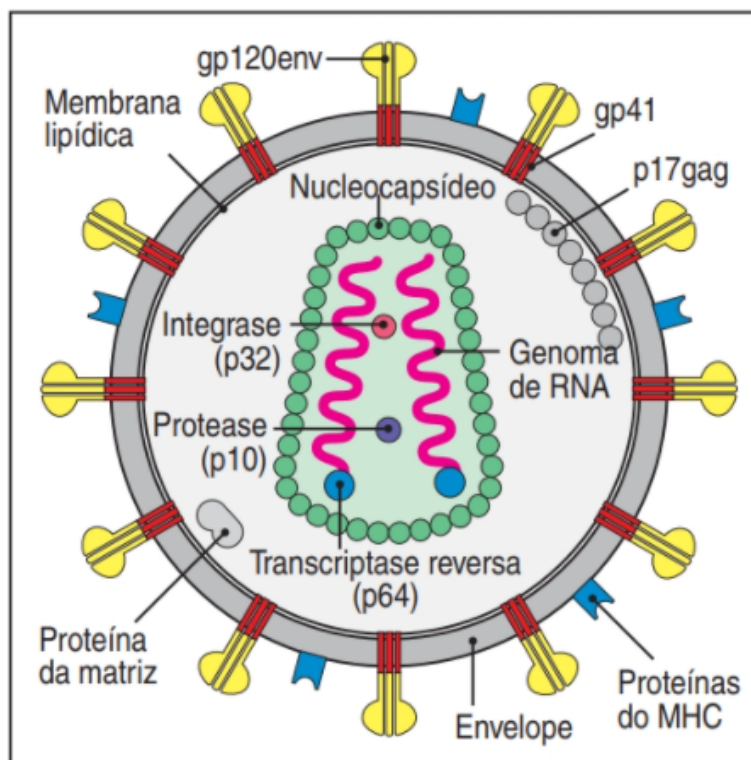
Legenda: A imagem mostra as várias classificações do HIV conforme análise filogenética.

Fonte: Adaptado de Brasil, 2018

4.3 BIOLOGIA ESTRUTURAL DO HIV

O vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) pertence ao gênero dos Lentivírus (*Lentiviridae*) e a família dos Retrovírus (*Retroviridae*), ele causou uma epidemia global desde que foi descoberto e confirmado como o patógeno da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) em 1983 (SANTOS., 2015).

Figura 2 - Estrutura do HIV.



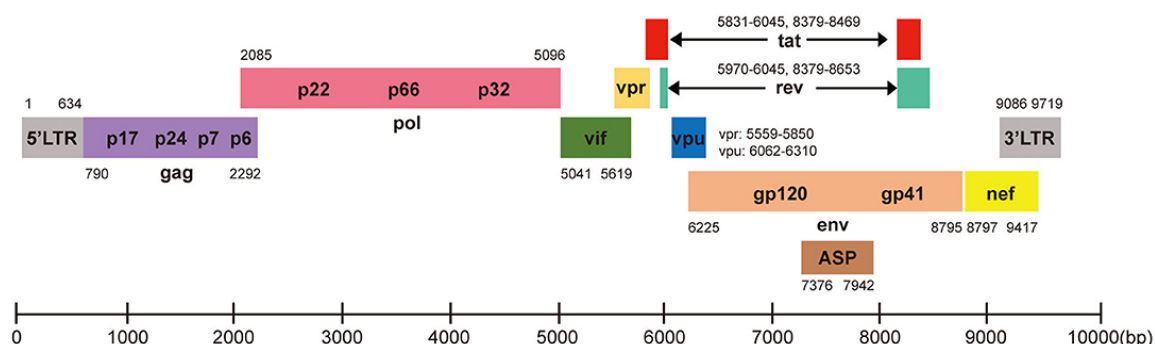
Legenda: A imagem detalha a estrutura do vírus, apresentando as diversas glicoproteínas encontradas no envelope viral.

Fonte: MURPHY; TRAVERS; WALPORT., 2014.

Quanto às características estruturais do vírus, o HIV-1 possui uma forma esférica, com cerca de 100 nm de diâmetro, estando envolvido por uma bicamada lipídica, chamada de envelope, originária da membrana celular da célula hospedeira, como mostra a figura 2. (ROSA, SILVA, HORA., 2015). Seu material genético é composto por RNA, ele é transcrito reversamente para DNA viral pela enzima transcriptase reversa viral (RT) ao entrar em uma nova célula hospedeira (FANALES-BELASIO *et al.*, 2010).

O HIV possui três genes estruturais sendo eles gag, env e pol, descritos na figura 3, são eles comuns aos retrovírus, e ainda, os genes regulatórios tat, rev e nef, e os genes acessórios vif, vpr e vpu (no HIV-1) ou vpx (no HIV-2) (FERREIRA, RIFFEL, SANT'ANA., 2010).

Figura 3 - Genes do HIV



Legenda: Estrutura do genoma do HIV-1 mostrando os importantes genes estruturais env, gag e pol, além dos genes regulatórios e acessórios.

Fonte: (XIAO, GUO, CHEN., 2019)

A proteína vif está associada à infectividade viral e ao controle da produção das partículas virais infecciosas, a vpr contribui para o transporte do DNA pró-viral para o núcleo da célula infectada e a nef ajuda a diminuir os níveis celulares de CD4, MHC classe I e MHC classe II. As proteínas tat e rev estão envolvidas com a regulação da expressão gênica, e a proteína transmembrana vpu diminui a expressão de CD4, MHC classe II e promove a liberação dos novos vírions (FANALES-BELASIO *et al.*, 2010).

O gene gag codifica a p55 que é precursora das seguintes proteínas, p17 que se encontra na matriz proteica, p24 que forma o capsídeo que circunda o ácido nucléico viral, p6 e p7 que fazem parte do nucleocapsídeo (FERREIRA, RIFFEL, SANT'ANA., 2010).

O gene env codifica as proteínas gp160, gp120, e gp41, que são encontradas no envelope viral. A gp160 é uma proteína precursora, que é clivada para formar a gp120 e gp41. A gp120 se projeta na superfície viral na forma trimérica, enquanto a gp41 é uma glicoproteína transmembrana e se associa à gp120. Ambas gp120 e gp41 estão envolvidas na fusão e ligação aos receptores de HIV nas células do hospedeiro (FANALES-BELASIO *et al.*, 2010).

O terceiro gene estrutural, pol, codifica as proteínas p66, p51, p32 e p10, relacionadas com enzimas virais. As proteínas p66 e p51 são subunidades da transcriptase reversa, a p32, ou integrase medeia a integração do DNA viral no genoma das células do hospedeiro, e a p10 é uma protease

que cliva precursores proteicos em unidades ativas menores. A proteína p66 também está envolvida na degradação do RNA original do HIV. Essas proteínas estão localizadas no núcleo, e na figura 4 podemos observar de forma resumida o que cada gene codifica (FERREIRA, RIFFEL, SANT'ANA., 2010).

Figura 4 - Principais proteínas do HIV

Genes do HIV	Produtos do HIV	Peso molecular das proteínas e glicoproteínas virais
ENV	Precursor Glicoproteína externa Glicoproteína transmembrana	gp160 gp120 gp41
POL	Transcriptase reversa Transcriptase reversa Integrase Protease	p66 p51 p32 p10
GAG	Precursor Capsídeo Matriz Nucleocapsídeo Nucleocapsídeo	p55 p24 p17 p6 p7

Legenda: Tabela mostrando os genes do HIV e as proteínas e glicoproteínas que são codificadas.

Fonte: Adaptado de Brasil, 2018.

4.4 CICLO REPLICATIVO

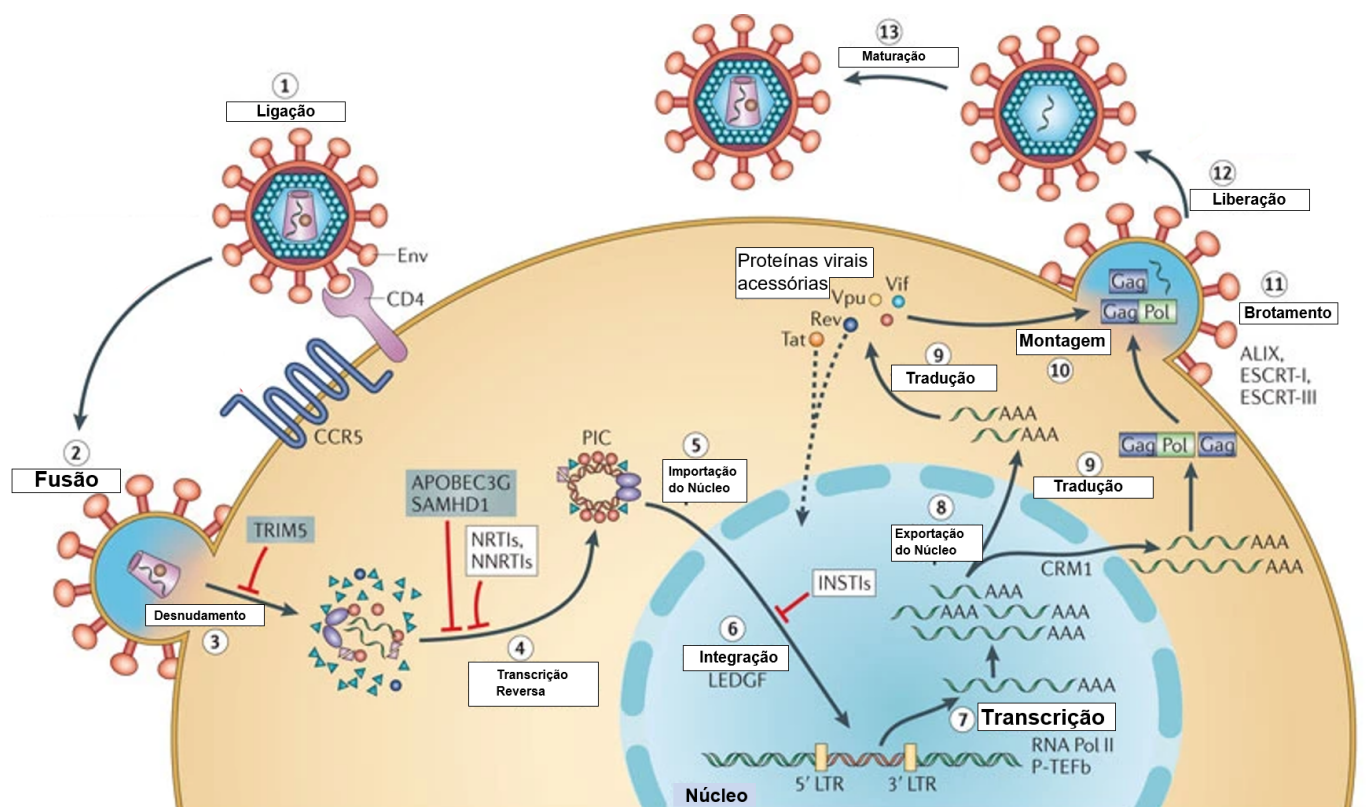
O HIV-1 tem como células alvo principalmente os linfócitos T, monócitos e células dendríticas, além de células microgлияis, astrócitos e macrófagos perivasculares no sistema nervoso central (XIAO *et al.*, 2019).

Para entender o ciclo replicativo é necessário saber que diferentes variantes do HIV-1 utilizam os co receptores de quimiocina para a entrada na célula hospedeira, algumas usam apenas o CXCR4, são chamadas de X4, outras utilizam apenas o CCR5, sendo chamadas de R5 e algumas podem usar qualquer um dos dois co receptores, os vírus que usam esses co receptores para entrada são chamados de vírus R5X4 (DEEKS, OVERBAUGH, PHILIPS *et al.*, 2015).

A infecção pelo HIV, ilustrada na figura 5, começa com a etapa de adsorção, que compreende a ligação do vírion à superfície da célula alvo. Esta é mediada por uma interação de alta afinidade entre o domínio extracelular da glicoproteína viral gp120 e receptores celulares específicos, sendo o CD4 o principal receptor para HIV-1 e HIV-2. Entretanto, apenas a interação gp120-CD4 não é suficiente para a entrada do HIV na célula. Um grupo de receptores de quimiocinas, CCR5 e CXCR4, têm sido identificados como os principais co receptores para o HIV-1. Assim, após a ligação da gp120 ao receptor celular CD4, ocorrem alterações conformacionais que facilitam a ligação ao co receptor e a entrada viral na célula. Este evento é decorrente da fusão do envelope viral com a membrana celular, um processo facilitado pela glicoproteína gp41 (FERREIRA,RIFFEL, SANT'ANA., 2010).

Uma vez no citoplasma, o genoma viral RNA é transcrito para uma fita dupla de DNA pró-viral, pela transcriptase reversa viral. Após a transcrição reversa, o DNA pró-viral é associado com proteínas virais e celulares em um grande complexo nucleoproteico, que é transportado para o núcleo celular através do poro nuclear (FERREIRA,RIFFEL, SANT'ANA., 2010).

Figura 5 - Ciclo de replicação do HIV



Nature Reviews | Microbiology

Legenda: A imagem mostra as etapas do mecanismo de infecção do HIV nas células, sendo elas: adsorção ou ligação, quando as glicoproteínas do envelope viral se conectam com o receptor CD4 e o co receptor CCR5 ocorrendo fusão das membranas levando a entrada da partícula viral na célula, após ocorre a remoção do capsídeo e a transcrição reversa, em seguida acontece a integração do RNA no núcleo e a tradução, onde as proteínas necessárias para o novo virion são produzidas, ocorrendo assim a montagem das partículas virais que são liberadas para maturação para criar uma partícula viral infecciosa.

Fonte: Adaptado de ENGELMAN., CHEREPANOV., 2012.

A dupla fita de DNA é inserida no cromossomo do hospedeiro pela integrase viral. Após a integração, ocorrem as primeiras transcrições do DNA pró-viral pela RNA polimerase II celular, produzindo RNAs virais (genômico e mensageiro) que são transportados através da membrana do núcleo. No citoplasma, as fitas de RNAm viral são traduzidas produzindo as poliproteínas que darão origem às proteínas virais (FERREIRA, RIFFEL, SANT'ANA., 2010).

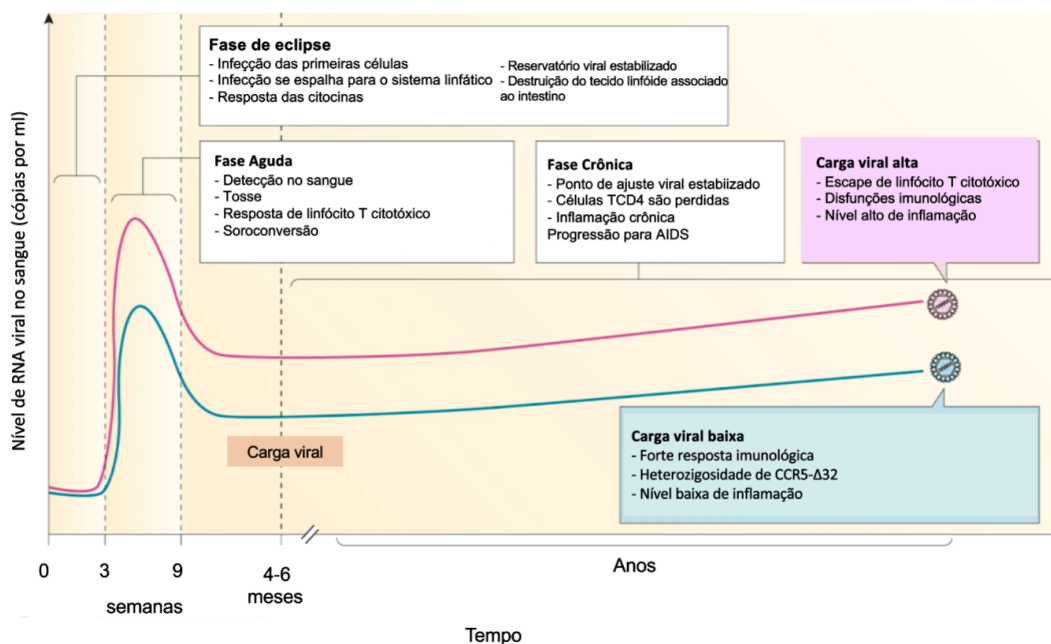
A montagem do vírion é a fase final da replicação do HIV, é direcionada pela proteína Gag que se move para a membrana celular, outras enzimas virais, RNA genômico e compostos celulares se associam no nucleocapsídeo, a enzima protease cliva as poliproteínas Gag e Gag-Pol, assim, formando os vírions imaturos que são liberados através da membrana celular e sofrerão o processo de maturação (FERREIRA, RIFFEL, SANT'ANA., 2010).

4.5 FASES DA INFECÇÃO PELO HIV

Os pacientes infectados com HIV-1 passam por alguns estágios de infecção: fase de eclipse, infecção aguda ou primária, infecção crônica (latência clínica), progredindo para doença clínica (AIDS), ilustrados na figura 6 (SHARP, HANH., 2011).

Durante a infecção do HIV, o vírus transmitido infecta primeiro as células alvo nos tecidos da mucosa e depois se espalha pelo sistema linfóide, caracterizando a fase de eclipse. Os níveis de RNA do HIV se tornam detectáveis após vários dias e, em seguida, aumentam exponencialmente, atingindo um pico algumas semanas depois, ponto no qual a resposta imune adaptativa resulta em controle parcial. As respostas de anticorpos do HIV são amplamente ineficazes devido ao rápido escape viral. Um nível de estado estacionário (ponto de ajuste), refletindo complexas interações vírus-hospedeiro, é então estabelecido. A destruição das células T CD4 + mediada pelo HIV leva à imunodeficiência e à inflamação crônica (DEEKS, OVERBAUGH, PHILIPS *et al.*, 2015).

Figura 6 - Infecção pelo HIV e AIDS



Legenda: A imagem mostra os estágios da infecção do HIV, sendo elas, a fase de eclipse, aguda, crônica (latência clínica) e doença clínica. O gráfico relaciona o aumento dos níveis de RNA viral no plasma ao longo do tempo.

Fonte: Adaptado de DEEKS, OVERBAUGH, PHILLIPS *et al.*, 2015.

Na infecção primária ou aguda a detecção de vírus no sangue, normalmente medido como níveis de RNA viral, está frequentemente associada a uma curta fase sintomática marcada por febre, linfadenopatia generalizada, erupção cutânea inespecífica, mialgias e mal-estar. Durante este período os níveis plasmáticos de RNA do HIV são caracterizados tipicamente pelo seu pico. A gravidade dos sintomas está fortemente correlacionada com o pico de carga viral durante esta fase da infecção. Uma vez que a resposta imune se desenvolve, os níveis de RNA viral diminuem cerca de 100 vezes para um nível de estado estacionário que é frequentemente referido como o ponto de ajuste viral (DEEKS, OVERBAUGH, PHILIPS *et al.*, 2015).

É importante ressaltar que o nível do ponto de ajuste está correlacionado com o resultado clínico: indivíduos com ponto de ajuste de carga viral alta geralmente progridem mais rapidamente para AIDS e morte do que aqueles com níveis de ponto de ajuste viral mais baixos. Esses poucos indivíduos com

pontos de ajuste de carga viral muito baixos são referidos como controladores de elite do HIV e são de grande interesse (DEEKS, OVERBAUGH, PHILIPS *et al.*, 2015).

4.6 TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (TARV)

A terapia antirretroviral (TARV) está disponível para tratar a infecção pelo HIV há quase duas décadas. Quando usada apropriadamente, é altamente eficaz suprimindo completamente ou quase completamente a replicação do HIV, melhorando a função imunológica e reduzindo significativamente o risco de desenvolver AIDS. No entanto, o tratamento não é curativo; se os medicamentos forem interrompidos, o vírus se recupera em 13 semanas (DEEKS, OVERBAUGH, PHILIPS *et al.*, 2015). Em dezembro de 2013 o Brasil tornou-se o primeiro país em desenvolvimento e o terceiro do mundo a recomendar o início imediato da TARV para todas PVHA, independentemente da contagem de CD4 e carga viral. (CARVALHO, BARROSO, COELHO *et al.*, 2019).

Historicamente, em 1986, a Agência Norte Americana Reguladora de Remédios e Alimentos aprovou a Zidovudina para o tratamento da AIDS. No Brasil esse medicamento passou a ser distribuído em 1991. Nesse período a TARV baseava-se no uso de apenas um tipo de medicação. Com a evolução nas pesquisas surgiram novas drogas, ampliando as opções de tratamento. Entre 1993 e 1994 desenvolveram-se os primeiros estudos sobre a combinação de medicamentos, a TARV dupla e depois a TARV tríplice, que se tornou padrão mundial em 1969 (CARVALHO, BARROSO, COELHO *et al.*, 2019).

O objetivo inicial da TARV é manter os níveis de carga viral indetectáveis. Polejack, Seidl, 2010, salientam que, entre as estratégias para combater a epidemia mundialmente, destaca-se o programa brasileiro de distribuição universal e gratuita dos medicamentos antirretrovirais aos portadores do HIV, que passou a existir desde 1996, com a lei 9.113/968 (CARVALHO, BARROSO, COELHO *et al.*, 2019).

A TARV é composta por cinco classes de medicamentos, que são separadas conforme a sua ação, sendo elas: inibidores de transcriptase

reversa análogos de nucleosídeo-nucleotídeo (ITRN); inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN); inibidores de protease (IP); inibidores da fusão e inibidores de integrase (CARVALHO, BARROSO, COELHO *et al.*, 2019).

A entrada na célula hospedeira é essencial para que o vírus estabeleça uma infecção, para isso todo vírus possui tropismo por determinado tipo celular, que varia de acordo com sua afinidade pelo receptor da célula-alvo (ABBAS *et al.*, 2008). A glicoproteína gp120 e gp41 do vírus se ligam, respectivamente, ao receptor CD4 e aos co receptores CCR5 e CXCR4. Os inibidores da fusão agem bloqueando a etapa de ligação entre o vírus HIV e os co receptores CCR5 e CXCR4, impedindo que o material genético do vírus entre no interior da célula do hospedeiro e inibindo o ciclo viral (MS., 2008).

Os inibidores da enzima viral protease surgiram como um avanço na terapia antirretroviral anti-HIV. A enzima protease é responsável pela clivagem das poliproteínas funcionais recém-sintetizadas (produtos dos genes gag, p55 e gag-pol, p160) em proteínas estruturais e funcionais conhecidas como p7, p9, p17, p24, transcriptase reversa, integrase e a própria enzima protease (SOUZA, ALMEIDA., 2003). Os inibidores de protease do HIV agem interferindo na última etapa da replicação viral, com a ausência desta clivagem crucial ocorre a produção de vírus imaturos que são incapazes de gerar novas infecções. A protease do HIV pertence à família das aspartil proteases, ou seja, possui dois grupos β -carboxi aspartil no sítio ativo. Substâncias químicas que mimetizam este intermediário tetraédrico impedem a hidrólise do substrato e, conseqüentemente, o ciclo do vírus HIV é interrompido (DORSEY *et al*, 2001).

Já os inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeo (ITRNN) se baseiam no mecanismo de bloqueio da enzima transcriptase reversa, através de sua interação com um sítio de ligação alostérico localizado a aproximadamente 10 nanômetros de distância do sítio catalítico da enzima, o que promove mudanças conformacionais levando a sua inativação (ARAÚJO, DIAS., 2021).

A enzima integrase é a responsável pela incorporação do DNA viral ao cromossomo da célula do hospedeiro, atuando em reações altamente

específicas e necessárias ao processo de integração permitindo assim a continuação do ciclo da replicação viral. A enzima integrase possui 288 aminoácidos codificados pelo gene *pol* do HIV-1, sendo composta por três domínios funcionais: N-terminal, catalítico e C-terminal (NEAMATI, 2011). A atuação da integrase pode ser dividida em três etapas: processamento do DNA viral por clivagem do nucleotídeo do terminal-3, formação do complexo de pré-integração e transferência de cadeia, quando o DNA viral é inserido no DNA da célula do hospedeiro, portanto os medicamentos de inibidores de integrase podem atuar em uma dessas etapas para conter a ação do vírus (BLANCO, MARTINEZ-PICADO., 2012).

Uma vez ocorrida a fusão do envelope viral, alguns componentes internos do vírus são absorvidos e todo o processo de replicação viral no interior da célula se inicia, a enzima transcriptase reversa viral recodifica o RNA viral convertendo-o em DNA. Os inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeo-nucleotídeo impedem a produção da cópia de DNA a partir do RNA, através da inibição competitiva do desoxinucleotídeo trifosfato fisiológico, impedindo, assim, a extensão da fita de DNA (MANENTI., 2008).

No entanto, há limitações para o uso da TARV, por ser um tratamento de longo prazo, por ter um alto custo e por ter a possibilidade de causar lesão crônica do sistema cardiovascular ou hepático, inevitavelmente podemos observar a necessidade do desenvolvimento de terapias alternativas e mais eficazes contra a infecção por HIV-1 (LIU, CHEN, JIN *et al.*, 2017). Além disso, há problemas de toxicidade com regimes multiagentes, especialmente para aqueles que contêm inibidores de transcriptase reversa nucleosídeo-nucleotídeo ou inibidores da protease (IP) (HENEGAR, FUSCO, VANNAPPAGARI *et al.*, 2019).

Aproximadamente 25 medicamentos antirretrovirais exclusivos foram aprovados para uso em adultos pelas agências reguladoras dos Estados Unidos e da Europa. Essas drogas abrangem cinco classes terapêuticas, cada uma visando uma etapa única no ciclo de vida do vírus. Embora a indústria continue a desenvolver novas abordagens terapêuticas, a falta de grandes necessidades não atendidas com as opções existentes levou a um declínio dramático no ritmo de investimento nos últimos anos. Consequentemente, as

abordagens de combinação disponíveis provavelmente não mudarão drasticamente nos próximos anos (DEEKS, OVERBAUGH, PHILLIPS *et al.*, 2015).

Há alguns anos houve um grande crescimento ao redor do mundo, no número de medicamentos antirretrovirais para o tratamento de pacientes infectados pelo HIV (KATZUNG, 2006). Todas as etapas da replicação do HIV são alvos em potencial para uma droga antiviral (STROHL *et al.*, 2004).

4.7 TERAPIA GÊNICA

A habilidade de fazer modificações pontuais no genoma humano tem sido o objetivo da Medicina desde o conhecimento do DNA como unidade básica da hereditariedade. Entende-se por terapia gênica a capacidade do melhoramento genético por meio da correção de genes alterados (mutados) ou modificações sítio-específicas, que tenham como alvo o tratamento terapêutico. Atualmente, a terapia gênica é uma área predominantemente existente em laboratórios de pesquisa, e sua aplicação ainda é experimental. A maioria dos ensaios são conduzidos nos Estados Unidos, Europa, Austrália e China. O âmbito desta abordagem é amplo, com potencial tratamento de doenças causadas por desordens em genes recessivos (fibrose cística, hemofilia, distrofia muscular e anemia falciforme), doenças genéticas adquiridas como câncer, e determinadas infecções virais, como a AIDS (GONÇALVES, PAIVA., 2017).

De acordo com Linden (2010), para que as modificações no genoma humano sejam possíveis é necessário um carreador que facilite a entrada do DNA nas células. Esses carreadores são os chamados vetores, há três principais classes: plasmídeos, vetores virais e vetores nanoestruturados. Os plasmídeos são vetores não virais, consistem em sequências de DNA, eficazes para expressão de genes, nas quais é possível inserir um gene terapêutico por técnicas de DNA recombinante (LINDEN., 2010).

Os vetores virais são produzidos a partir de vírus com genomas de DNA ou RNA. Eles são microrganismos especializados exatamente em invadir células e nelas introduzir material genético, essa propriedade é explorada para introduzir genes terapêuticos nas células, por meio de tecnologias de DNA

recombinante (MORAIS, PAIVA, NASSER., 2019). Para construí-los, é preciso identificar as sequências virais necessárias para replicação e empacotamento do genoma viral, sendo também importante conhecer os mecanismos possíveis para entrega do gene de interesse (transgene) à célula-alvo (OLIVEIRA, FRANÇA *et al.*, 2018). Os vírus precisam ser purificados antes de serem usados para inserção de genes em células, isto é, consiste na remoção dos genes envolvidos nos processos patogênicos, multiplicação e de proliferação viral, mantendo apenas os genes responsáveis pela invasão celular sem multiplicação, a partir disso, o próximo passo é a inserção do gene terapêutico no que sobrou do DNA viral. A retirada de genes patogênicos e da multiplicação permite que seja utilizado um vírus do HIV para ser um vetor útil na terapia gênica sem apresentar risco algum (LINDEN., 2010).

Há também os vetores nanoestruturados, esta forma está sendo desenvolvida para introduzir DNA a partir de técnicas avançadas de nanotecnologia (MORAIS, PAIVA, NASSER., 2019). São utilizados polímeros que formam redes, que prendem um gene e sua carga, e os soltam dentro da célula quando as penetram (OLIVEIRA, FRANÇA *et al.*, 2018).

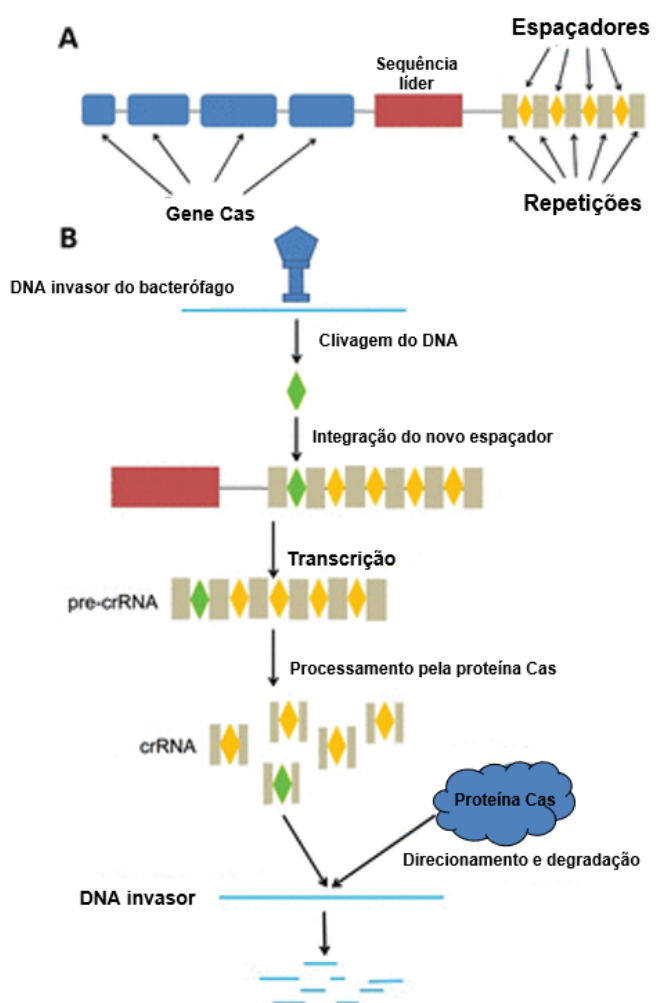
4.8 SISTEMA CRISPR-cas9

O sistema CRISPR-Cas9 (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) é uma tecnologia de edição de genes que torna possível corrigir erros no genoma e ativar ou desativar genes em células e organismos de forma rápida, barata e com relativa facilidade. (REDMAN, KING *et al.*, 2016). O CRISPR foi desenvolvido a partir de mecanismos moleculares do sistema imunológico bacteriano, como visto na figura 7, essa memória imunitária surge após o DNA ser cortado em pequenos fragmentos e incorporado no locus CRISPR, passando a designar-se por protoespaçador, esse sistema possibilita a edição do genoma através de clivagem do DNA por uma endonuclease (Cas9), guiada a partir de uma sequência de RNA, que é capaz de se parear com as bases de uma sequência alvo (AREND, PEREIRA, MARKOSKI., 2016) (DOUDNA, CHARPENTIER., 2014).

O sucesso dessa ferramenta de edição de genoma é alimentado pelo princípio de design fácil do RNA guia que direciona a Cas9 para o locus de

DNA desejado e pela alta especificidade e eficiência de quebras de DNA geradas. Vários estudos usaram recentemente essa ferramenta para modular alelos causadores de doenças *in vivo* em modelos animais e *ex vivo* em células-tronco pluripotentes somáticas e induzidas, aumentando a esperança de edição terapêutica do genoma nas clínicas (SAVIC, SCHWANK., 2016).

Figura 7 - Visão geral do sistema imunológico bacteriano CRISPR-Cas



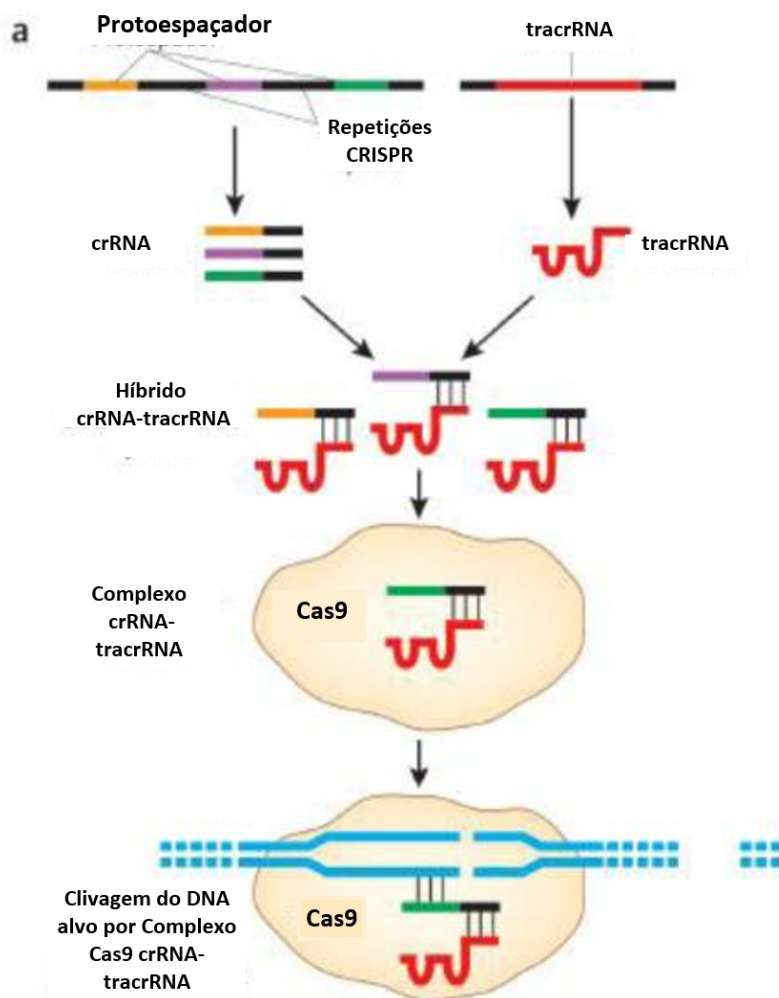
Legenda: Na imagem A é representado o locus CRISPR e na B a adição de um novo espaçador e a clivagem do DNA invasor.

Fonte: Adaptado de ZHANG, WEN, GUO., 2014.

Para entender o sistema CRISPR-Cas9 é necessário saber que o locus é transcrito numa cadeia precursora de RNA não codificante (pre-crRNA), as cadeias repetidas do pre-crRNA sofrem hibridação com um segundo RNA não codificante, o trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA), formando uma cadeia dupla de RNA que é clivada e processada pela RNase III (CONG *et al.*, 2013; MALI *et al.*, 2013)

A forma duplex de crRNA-tracrRNA se associa com a nuclease Cas9, formando um complexo responsável pelo reconhecimento e destruição do DNA invasor conforme mostrado na figura 8 (CONG *et al.*, 2013; MALI *et al.*, 2013). Essa estrutura denominada RNA guia possui o crRNA como o espaçador e tem especificidade para uma sequência alvo, ligando-se por complementaridade e levando consigo a nuclease Cas9. Ao serem modificados apenas os 20 nucleotídeos da extremidade 5' do gRNA que correspondem à região do protoespaçador do crRNA, a sequência que se liga ao DNA por complementaridade também é modificada (HSU *et al.*, 2014; JINEK *et al.*, 2012; MALI *et al.*, 2013).

Figura 8 - Complexo crRNA-tracrRNA

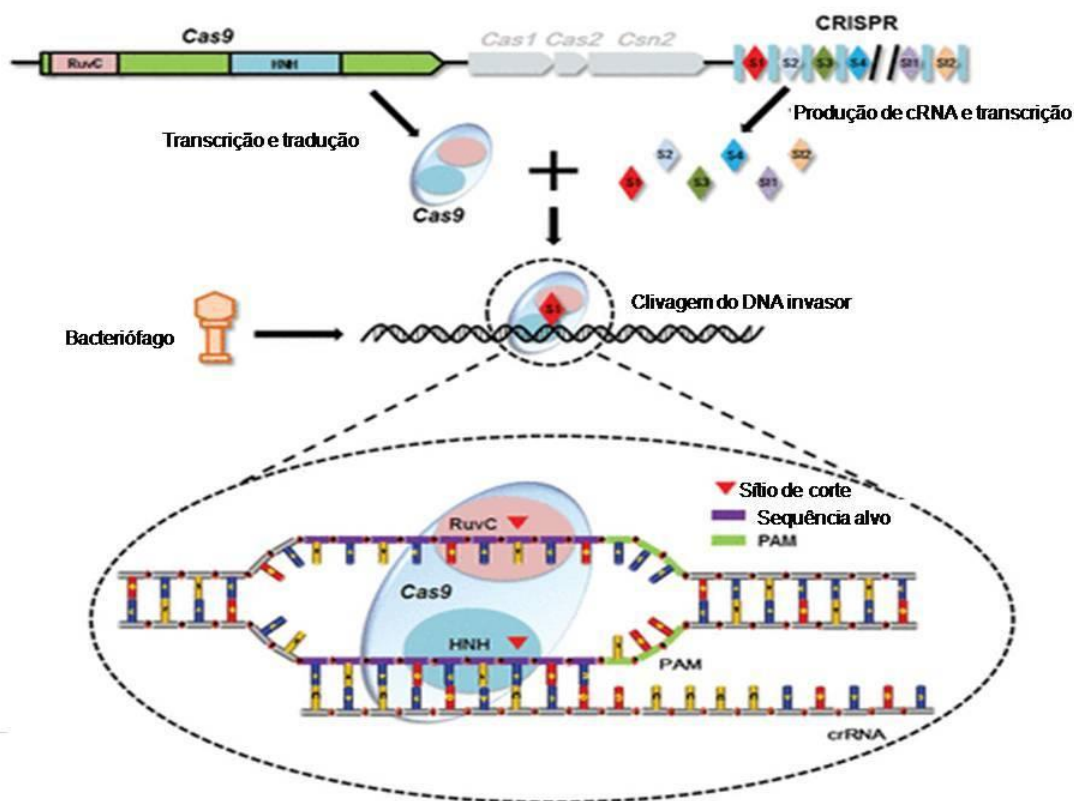


Legenda: O crRNA derivado do protoespaçador hibridiza com o tracrRNA. O híbrido formado complexa com a Cas9, dirigindo-se até ao DNA alvo onde a região referente ao protoespaçador se liga por complementaridade, permitindo a clivagem pela Cas9.

Fonte: Adaptado de SANDER, JOUNG., 2014.

A Cas9 possui dois domínios, o domínio HNH que cliva a cadeia complementar e o domínio RuvC que cliva a cadeia não complementar, provocando um duplo corte na dupla cadeia de DNA (double-strand break), conforme ilustrado na figura 9 (RICHTER *et al.*, 2012).

Figura 9 - Esquema de clivagem de DNA mediada por CRISPR/Cas9



Legenda: O crRNA maduro guia o Cas9 para o local alvo do DNA do fago invasor. O crRNA correspondente da fita simples de DNA e a fita oposta são cortados pelo domínio nuclease HNH e pelo domínio nuclease RuvC da Cas9, gerando uma quebra no sítio alvo. A especificidade da clivagem de DNA mediada por CRISPR-Cas9 requer um crRNA correspondente à sequência alvo e um PAM.

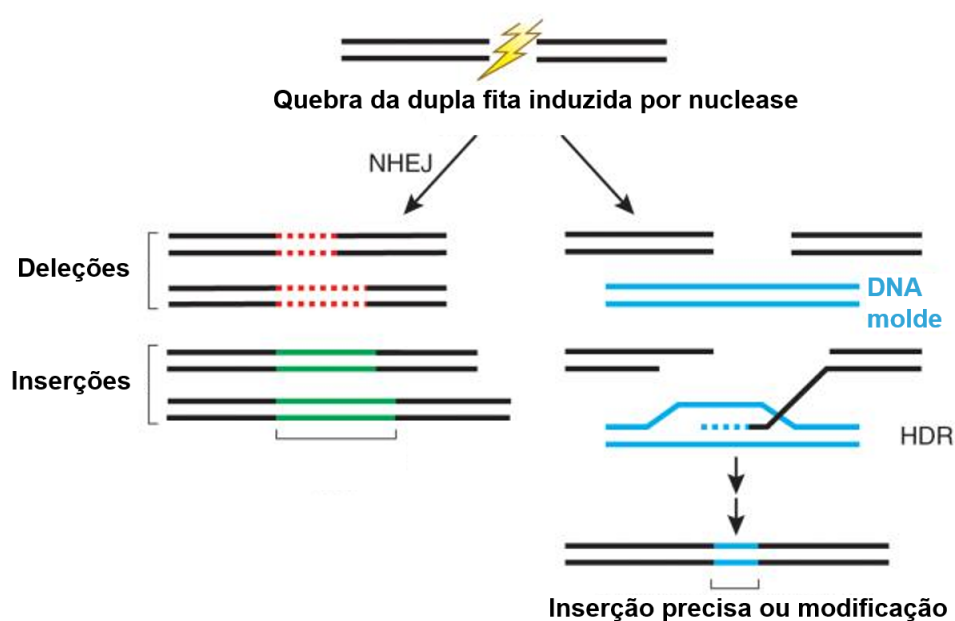
Fonte: Adaptado de ZHANG, WEN, GUO., 2014.

Segundo Doudna e Charpentier (2014) e Jinek e colaboradores (2014), todo esse processo só acontece caso a sequência alvo se encontre na região adjacente a uma pequena sequência conhecida como PAM, é uma sequência nucleotídica existente no DNA alvo, cuja presença é essencial para o desenrolamento do alvo pela Cas9 (SANDER, JOUNG., 2014).

A clivagem no DNA gerada pelo CRISPR-Cas9 poderá ser processada por dois mecanismos de reparo: a recombinação homóloga (HDR) e a recombinação não homóloga (NHEJ), ilustrados na figura 10 (ZHANG, WEN,

GUO., 2014). A recombinação homóloga (HDR) é mais precisa uma vez que necessita da presença de uma sequência molde para proceder à reparação, diminuindo a chance de erro, já a recombinação não homóloga (NHEJ) é mais ativa, pois não necessita de um DNA molde para reparo, porém é mais propensa a erros de inserções e deleções (BIBIKOVA *et al.*, 2002; HEYER *et al.*, 2010; SAVIC, SCHWANK., 2015).

Figura 10 - Mecanismos de reparo da clivagem de DNA



Legenda: Reparo da quebra de dupla fita pelas vias NHEJ ou HDR. O reparo impreciso mediado por NHEJ pode produzir mutações de inserção e deleção no local do DSB. O reparo mediado por HDR pode introduzir mutações pontuais precisas ou inserções de um modelo de doador de DNA de fita simples ou fita dupla.

Fonte: Adaptado de SANDER, JOUNG., 2014.

A técnica de edição CRISPR-Cas 9 possui algumas limitações, há uma grande preocupação em relação ao potencial efeito fora do alvo, que pode induzir importantes mutações genéticas e translocações cromossômicas. A redução dos efeitos fora do alvo é sempre da maior importância na aplicação clínica (KIMBERLAND *et al.*, 2018).

O CRISPR-Cas9 tem potencial para se tornar uma ferramenta de edição

de genoma confiável e fácil, depois de abordar alguns problemas. Beneficiando-se da simplicidade e adaptabilidade do CRISPR-Cas9, ele abre as portas para revelar a função do gene na biologia e corrigir defeitos do gene em doenças. Mais estudos são necessários para explorar a característica e melhorar o desempenho desse sistema, especialmente a especificidade, efeitos fora do alvo e métodos de entrega do CRISPR. Por exemplo, resultados recentes de sequenciamento profundo em todo o genoma serão úteis para selecionar locais-alvo adequados e projetar gRNA altamente específico (ZHANG, WEN, GUO., 2014).

4.9 GENES DE INTERESSE PARA A TERAPIA GÊNICA

4.9.1 GENE CCR5

O gene CCR5 está localizado no cromossomo 3, na região p21 e codifica uma proteína transmembrânica, que é um importante co receptor (LI *et al.*, 2015). No gene CCR5, uma deleção de 32 pares de bases está associada à resistência à entrada do HIV na célula, provocada pela diminuição na expressão de co receptores na superfície celular, como resultado, o CCR5 tem sido um dos principais alvos para intervenções medicamentosas e genéticas contra a infecção pelo HIV-1 (ALKHATIB., 2009).

4.9.2 GENE CXCR4

O gene CXCR4 codifica o co receptor CXCR4, está localizado no cromossomo 2, na região q22.1 que codifica o receptor CXCR4 para a quimiocina CXCL12 e é expresso em vários tecidos e diferentes células, incluindo diversos subconjuntos de leucócitos, células progenitoras hematopoiéticas e células não hematopoiéticas, como células endoteliais e epiteliais. Em 1996, o CXCR4 foi descoberto como um dos co fatores necessários para mediar a infecção por HIV trófico de linfócitos T em células permissivas e, como consequência, muita atenção tem sido dada a esse receptor em termos de fisiopatologia do HIV (MURDOCH., 2000).

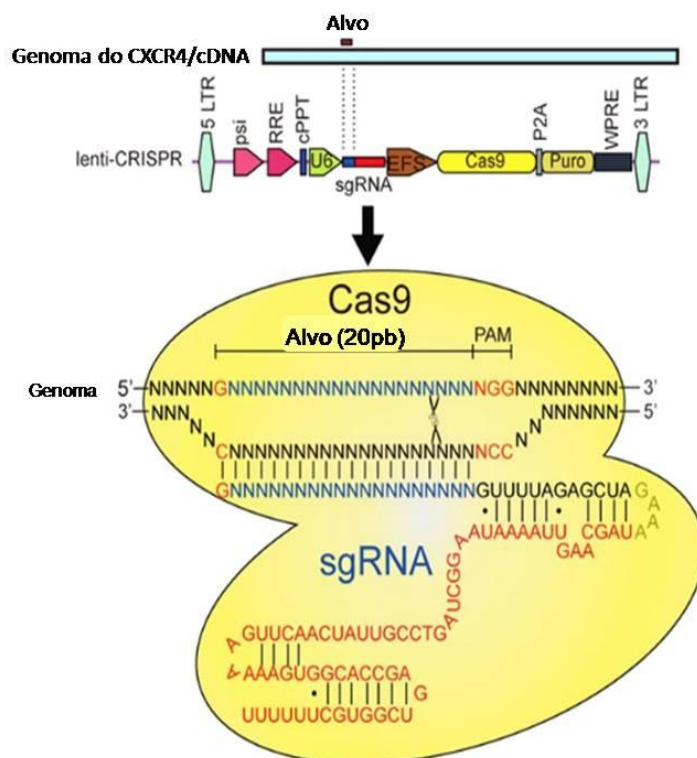
5.0 EDIÇÃO DOS CO RECEPTORES CXCR4 e CCR5

5.0.1 EDIÇÃO DO CXCR4

Os co receptores CXCR4 e CCR5 tornaram-se alvos potenciais para a terapia gênica do HIV, com o intuito de editar esses co receptores, que são essenciais para a entrada do HIV na célula, a tecnologia CRISPR Cas9, que fornece locais alvo apropriados com design simples e construção de plasmídeos, vem sendo estudada para um possível bloqueio da entrada do HIV-1 na célula alvo (XIAO *et al.*, 2019).

Sendo assim, com o intuito de inativar geneticamente o alelo CXCR4, Hou *et al.*, 2015 testou a terapia gênica, utilizando o sistema CRISPR-Cas9, na figura 11 podemos observar o direcionamento da Cas9. Foram projetados 10 gRNAs para direcionar a proteína Cas9 para os locais conservados do gene CXCR4 humano, conforme esquema mostrado na figura 12, assim gerando um vetor lentiviral que irá conduzir o gRNA para entregá-los às células. Nesse estudo foi mostrado que o gene CXCR4 humano é eficientemente interrompido pela edição do genoma mediada por CRISPR-Cas9, levando à resistência ao HIV-1 as células humanas T CD4+ primárias. Também foi observado que a ablação de CXCR4 mediada por Cas9 demonstrou alta especificidade e efeitos fora do alvo insignificantes sem afetar a divisão e propagação celular (HOU *et al.*, 2015).

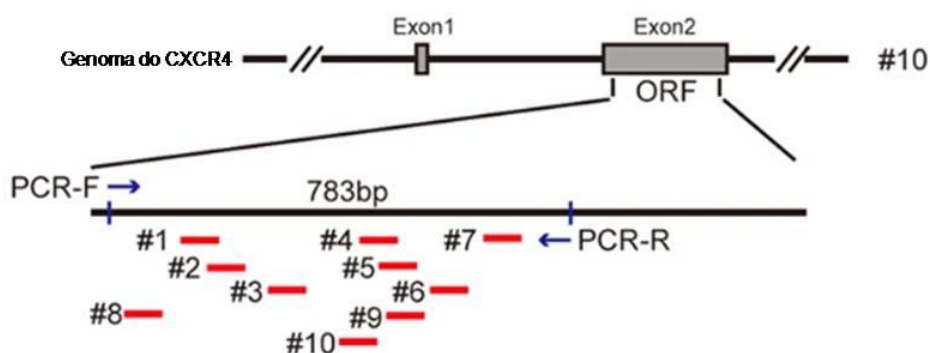
Figura 11 - Esquema de gRNAs visando o locus CRISPR



Legenda: A imagem mostra o direcionamento da Cas9 guiado por gRNA. A Cas9 desenrola o DNA dupla fita e cliva ambas as fitas após o reconhecimento da sequência alvo pelo gRNA quando a extremidade 3' do alvo contém o domínio PAM.

Fonte: Adaptado de HOU *et al.*, 2015.

Figura 12 - Esquema dos gRNAs para localização do gene CXCR4

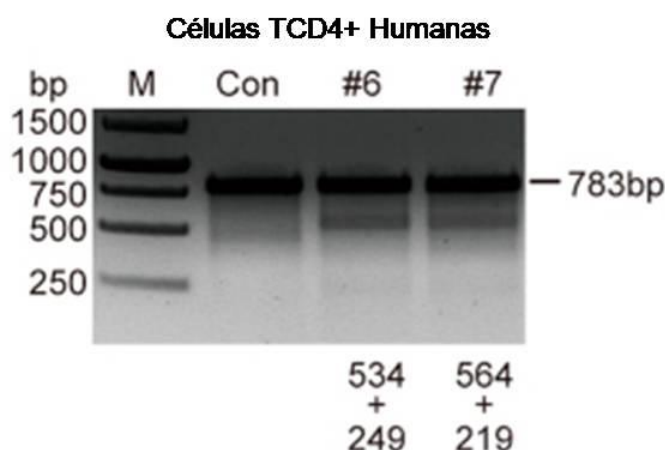


Legenda: A imagem mostra os gRNAs em vermelho e as setas azuis representam o par de primers utilizados para amplificação da região.

Fonte: Adaptado de HOU *et al.*, 2015.

Devido a alta eficiência da edição do genoma de CXCR4 por lentiCRISPR-Cas9 em células T Ghost X4 e Jurkat no estudo realizado por HOU *et al.*, 2015, a etapa seguinte realizada pelos pesquisadores foi testar a viabilidade de deletar CXCR4 em células T CD4+ primárias humanas transfectadas com plasmídeo, através do lentiCRISPR-Cas9, essa transfecção entregou os gRNA controle, gRNA 6 e o gRNA 7 aos linfócitos e 3 dias depois foi realizado o ensaio T7EN1 mostrado na figura 13, comprovando que as mutações indel foram induzidas no gene CXCR4 em células T primárias porém o resultado foi menos eficiente que nas células Jurkat. A análise de sequenciamento de DNA confirmou a mutação nos sítios alvo de gRNA 6 e 7 do gene CXCR4 em células T CD4+ (HOU *et al.*, 2015).

Figura 13 - Ensaio T7EN1 em células TCD4+ Humanas



Legenda: Células T CD4+ humanas primárias transfectadas com CXCR4-gRNA/Cas9 e plasmídeos de controle. Após 36 horas, as células foram coletadas para extração de DNA genômico e ensaio de T7EN1. As bandas inferiores nas pistas 6 e 7 indicam alelos CXCR4 mutantes.

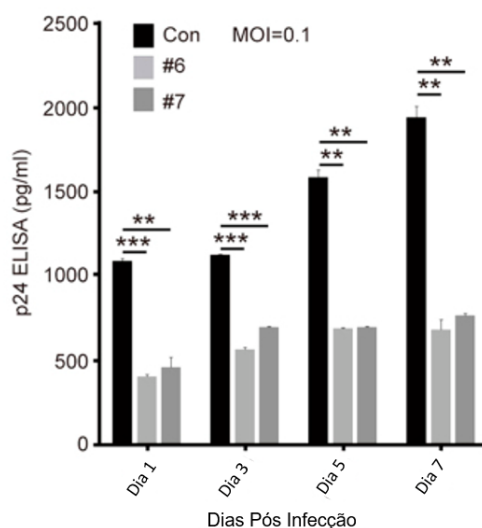
Fonte: Adaptado de HOU *et al.*, 2015.

Para determinar a eficiência da modificação de CXCR4-gRNA/Cas9 em fornecer proteção a células T CD4+ primárias contra infecção por HIV-1, as células (contendo CXCR4 modificado) foram infectadas com HIV-1 CXCR4 trópico e cultivadas por 7 dias (HOU, CHEN, WANG *et al.*, 2015).

A fim de demonstrar os resultados, foi realizado um ensaio de ELISA, ilustrado na figura 14, mostrando que o nível de p24 diminuiu mais de 64% em

células transfectadas com gRNA 6 e 7 CXCR4-gRNA/Cas9 em comparação com as células de controle no dia 7. Esses resultados demonstram que a interrupção da expressão de CXCR4 em células T CD4+ humanas por CRISPR-Cas9 confere proteção parcial à infecção por HIV-1 (HOU *et al.*, 2015).

Figura 14 - Ensaio de ELISA para detecção de p24



Legenda: Linfócitos TCD4+ foram estimulados e transfectados com plasmídeos de controle, gRNA6 e gRNA7 CXCR4-gRNA/Cas9. Após 48 horas, o HIV foi adicionado às células e em seguida, os sobrenadantes celulares foram removidos. Dias após a infecção, os sobrenadantes livres de células foram coletados e testados por ELISA para detecção de p24, assim determinando os títulos virais.

Fonte: HOU *et al.*, 2015.

Com o resultado promissor de que a interrupção da expressão de CXCR4 em linfócitos T CD4+ confere resistência ao HIV, é necessário avaliar possíveis mutações fora do alvo, pois qualquer modificação em locais não visados, são de extrema preocupação para futuras aplicações terapêuticas. Portanto com o intuito de determinar se houveram efeitos fora do alvo do lentiCXCR4-gRNA/Cas9, as sequências alvo #6 e #7 foram alinhadas ao genoma humano para pesquisar todos os potenciais sítios fora do alvo usando uma ferramenta online chamada *Guide Design Resources*. Conforme mostrado na figura 15, foram identificadas apenas duas possíveis sequências fora do

alvo com pontuações altas para gRNA 6 e cinco para gRNA 7 (HOU *et al.*, 2015).

Figura 15 - Análise das mutações fora do alvo

gRNA	Sequência alvo	PAM	Sequência fora do alvo prevista	gene	locus	Análise fora do alvo
#6	GCTTCTACCCCAATGACTTG	TGG	GCTGCTCCCCAATGACTTCAAG	NM022166	crom 16: -17232231	0/20
			CCTTATACCCCAATGAATTCAG	NM152786	crom 9: +116191155	0/10
#7	GTTCCAGTTTCAGCACATCA	TGG	GCTGCTGCTTCAGCACATCATGG	NM032207	crom 19: -16625337	0/10
			CTTCCAGCTGGAGCACATCATGG	NM111376	crom 14: +102482268	0/10
			GTTTGAGTTCAAGCACATCAAGG	NM0011256456	crom 1: -1249145	0/10
			GGCCAGTGTGAGCACATCATGG	NM001122819	crom 1: -21036229	0/10
			GTTGGAGTTTATGCACATCACAG	NM001204375	crom 5: -32790650	0/10

Legenda: Análise da frequência de mutação nos locais fora do alvo previstos. Os locais fora do alvo foram previstos e alinhados com o genoma humano. As células Ghost X4 infectadas com vírus lentiCXCR4-gRNA/Cas9 foram coletadas para extração de DNA genômico e amplificadas por PCR para os locais fora do alvo previstos. Os produtos de PCR foram então clonados no vetor T e submetidos a sequenciamento. As sequências fora do alvo na cor vermelha indicam bases diferentes dos locais no alvo. Pelo menos 10 clones recombinantes foram sequenciados e nenhum efeito fora do alvo foi observado. N/N indica o número de mutações no total de colônias sequenciadas.

Fonte: Adaptado de HOU *et al.*, 2015.

Foi amplificado, em seguida, o DNA genômico por PCR após a transdução e sequenciado o DNA abrangendo a região fora do alvo usando a clonagem de TA. Não foi detectada nenhuma mutação nesses locais em células T Ghost X4 transduzidas com lentiCRISPR/Cas9, sugerindo que não há mutagênese fora do alvo no experimento de transfecção de gRNA. Portanto, podemos assim concluir que a interrupção CRISPR-Cas9 de CXCR4 pode ser uma excelente ferramenta de modificação genética para aplicação terapêutica no futuro, pois não foram detectadas outras alterações fora da sequência do alvo previsto (HOU *et al.*, 2015).

5.0.2 EDIÇÃO DO CCR5

O CCR5 serve como um co receptor essencial para a entrada do HIV-1, ele é expresso em linfócitos, células mielóides ou subgrupos de células T CD4+, é responsável pelo estabelecimento de novas infecções e é dominante na fase crônica da infecção (HOU, CHEN, WANG *et al.*, 2015.).

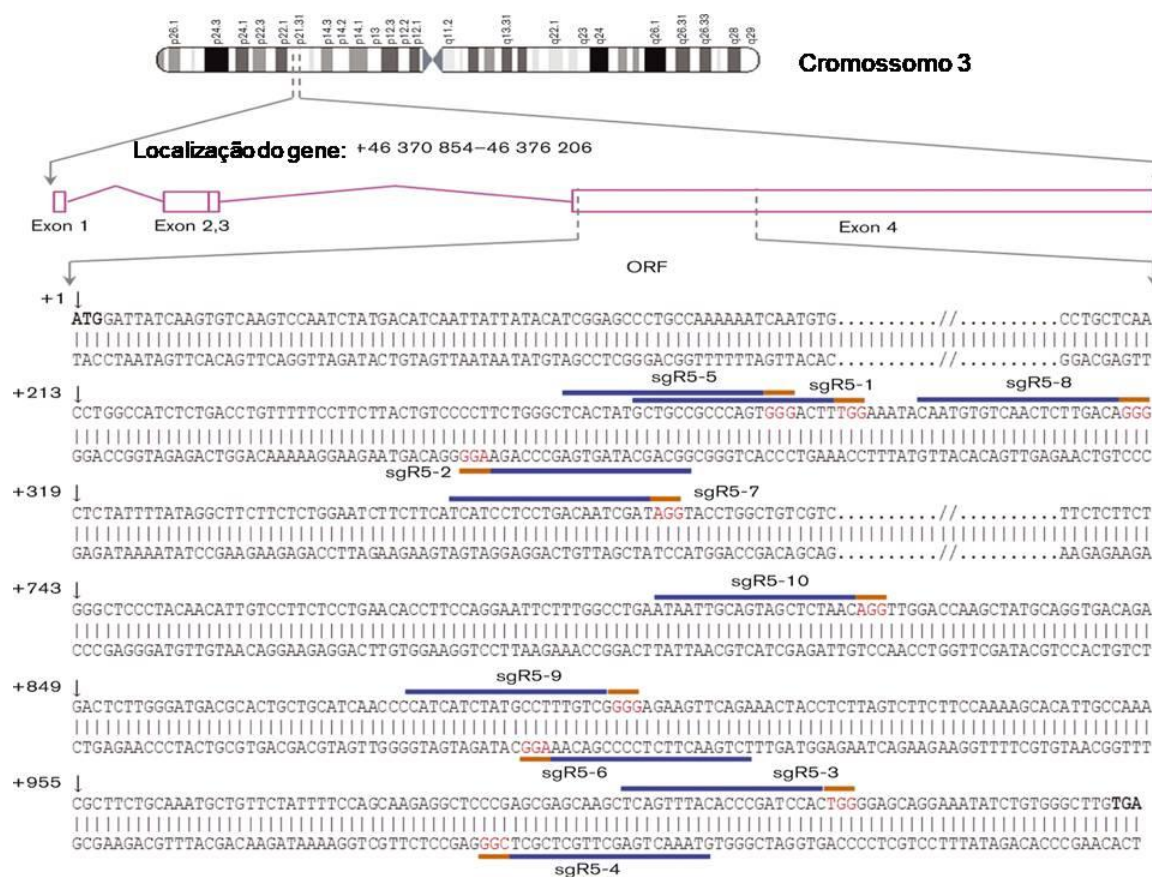
Estudos mostram que a interação do HIV com os receptores e co receptores presentes em suas células alvo pode ser afetada devido uma mutação presente em uma pequena parcela da população mundial, na qual o gene que codifica os receptores de quimiocina CCR5 sofrem uma deleção de 32 pares de base, esse indivíduos que possuem essa variante CCR5 Δ 32 parecem ser saudáveis (LI *et al.*, 2015). Quando o vírus entra em contato com as células desses indivíduos, a sua integração é impedida, pois a expressão de co receptores na superfície da célula é diminuída, nesse caso, o indivíduo apresenta resistência para a infecção. Tornando assim o CCR5 um alvo atraente para o controle da infecção pelo HIV-1. (SILVA, MONTEIRO, PINHEIRO *et al.*, 2020).

Segundo o estudo de Li *et al.*, 2015, onde foram projetados gRNAs visando a ORF de CCR5, ilustrados na figura 15, demonstrou-se que CRISPR-Cas9 pode mediar eficientemente a edição do locus CCR5 em linhas celulares, resultando no nocaute da expressão de CCR5 na superfície celular. O sequenciamento de próxima geração revelou que várias mutações foram introduzidas em torno do local de clivagem previsto de CCR5. Para cada um dos três gRNAs mais eficazes que foram analisados, nenhum efeito significativo fora do alvo foi detectado nos 15 potenciais locais. E ao construir adenovírus Ad5F35 quiméricos que transportam componentes CRISPR-Cas9, foi possível transduzir eficientemente linfócitos T CD4+ primário, interrompendo assim a expressão de CCR5, conferindo assim resistência ao HIV-1 as células transduzidas positivamente (LI *et al.*, 2015).

No estudo de Li *et al.*, 2015, várias sequências de gRNAs com alta potência foram obtidas para direcionar o CCR5, como resultado, foram gerados oito gRNAs (sgR5-3 a -10). Dois gRNAs (sgR5-1 e -2) visando CCR5 (CRADICK *et al.*, 2013) e um gRNA não direcionado (sgNeg) (SHALEM *et al.*,

2014) foram empregados como controles positivos e negativos, respectivamente, conforme mostra a figura 16 (LI *et al.*, 2015).

Figura 16 - Localização genômica de CCR5 e as sequências de sgRNA projetadas



Legenda: A localização genômica do gene CCR5 mapeia para o braço curto do cromossomo 3. Os quatro éxons (caixas magenta) e dois íntrons (linhas magenta) do gene CCR5 são mostrados. A ORF de CCR5 está localizada no quarto éxon. As barras azuis representam sequências de gRNAs projetadas para direcionar locais específicos da ORF CCR5, conforme mostrado pelas sequências de nucleotídeos. As barras laranja, correspondentes às sequências NGG vermelhas na ORF CCR5, denotam a região PAM. A ORF é numerada a partir do códon inicial.

Fonte: Adaptado de LI *et al.*, 2015.

Em seguida, foi investigado a eficácia de edição dos vírus Ad5F35 produzidos em células T CD4+, a eficiência de transdução foi monitorada pela expressão de GFP que em 4 dias atingiu seu pico e permaneceu constante por 10 dias. No pico, as células T CD4+ transduzidas com Ad5F35gCas9 exibiram

24,6% ou 30,3% da expressão de GFP, com isso é possível dizer que as células foram transduzidas com eficiência (SHAYAKHMETOV *et al.*, 2000).

Para testar se as células T CD4+ com CCR5 editado por CRISPR-Cas9 ganharam resistência ao HIV-1, as células T CD4+ foram transduzidas positivamente e expostas à infecção por HIV-1, a infecção pelo vírus foi determinada pela medição de p24, e como resultado foi obtido uma redução na expressão de p24, mostrando que a entrada do vírus nas células T CD4+ foi impedida na maioria das células (LI *et al.*, 2015).

Para determinar a especificidade dos gRNAs projetados, foram medidos os efeitos fora do alvo de gRNA5-5 e -8, que exibiram a maior eficácia de edição no alvo. Para cada um dos dois gRNAs, os 15 locais fora do alvo mais bem classificados em todo o genoma humano foram analisados. Segmentos abrangendo os potenciais locais fora do alvo foram amplificados a partir de DNA genômico de células TZM-bl e submetidos a análise tbl7EI. Nenhuma clivagem significativa foi detectada para todos esses potenciais locais fora do alvo (LI *et al.*, 2015).

É importante ressaltar que foi entregue eficientemente os componentes CRISPR-Cas9 em células T CD4+ primárias usando vetores adenovirais recombinantes, que inibiram a infecção por HIV-1 nas células transduzidas positivamente após a interrupção do CCR5 (LI *et al.*, 2015).

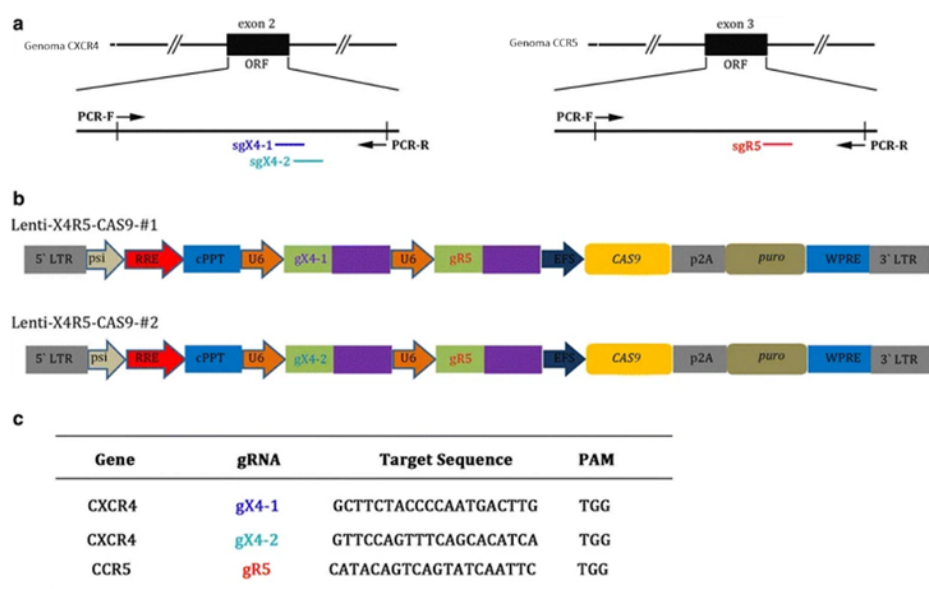
A partir do estudo de Li *et al.*, 2015 podemos dizer que a interrupção do gene CCR5 é um possível alvo para a terapia gênica uma vez que a infecção por HIV foi reduzida e modificações fora do alvo não foram identificadas, porém ainda é necessário mais estudos e pesquisas a respeito da não expressão completa do co receptor CCR5, visto que ele é expresso em linfócitos, células mielóides ou subgrupos de células T CD4+, ou seja células de extrema importância para a defesa do corpo humano.

5.0.3 Edição simultânea dos co receptores CXCR4 e CCR5

Foram projetadas no estudo de Liu *et al.*, 2017, duas combinações diferentes de gRNA visando CXCR4 e CCR5, em um único vetor. Os dois plasmídeos construídos foram referidos como lenti-X4R5-Cas9-#1(ou#1) e

lenti-X4R5-Cas9-#2 (ou# 2), ilustrados na figura 17 (LIU *et al.*, 2017).

Figura 17 - Diagrama esquemático do gRNAs dos alvos CXCR4 e CCR5 e construção do vetor



Legenda: (a) Esquema da região codificadora de CXCR4 e CCR5 em sequências de DNA genômico direcionadas por lenti-X4R5-Cas9-#1,#2. (b) Estrutura dos vetores lenti-X4R5-Cas9-#1,#2 expressando Cas9 e sgRNA duplo. (c) Sequências de gRNA usadas nos vetores lenti-X4R5-Cas9-#1,#2

Fonte: LIU *et al.*, 2017.

Foram feitos ensaios, que mostraram que infecções dos vírus HIV-1 que possuem tropismo por CXCR4 ou CCR5 foram significativamente reduzidas em células CXCR4 e CCR5 modificadas, e as células editadas exibiram uma vantagem seletiva sobre células não modificadas durante a infecção por HIV-1. Foi realizada também uma análise fora do alvo, que mostrou que nenhuma edição não específica foi encontrada em outros locais previstos. Além disso, os ensaios de apoptose indicaram que a ruptura simultânea de CXCR4 e CCR5 em células T CD4+ primárias por CRISPR-Cas9 não tiveram efeitos citotóxicos óbvios na viabilidade celular (LIU *et al.*, 2017).

Existe a preocupação de que o uso de um CRISPR-Cas9 que inativa o CCR5 leve à seleção de cepas de HIV-1 X4-trópicas. Assim, o direcionamento de CCR5 sozinho não poderia ser usado em indivíduos que abrigam vírus de trópico duplo ou misto, que é aproximadamente metade dos indivíduos com AIDS. Para proteger totalmente uma célula dos vírus R5 e X4-trópicos, seria necessária a edição simultânea de quatro alelos (YU *et al.*, 2017).

Embora o HIV-1 use o CCR5 para mediar a entrada nas células, o CXCR4 pode funcionar como um co receptor nos estágios finais da infecção, o que contribui para a progressão da doença. No estudo de Hou *et al.*, 2015, foi relatado que a interrupção do co receptor CXCR4 por CRISPR-Cas9 resultou na proteção de células T CD4+ primária da infecção pelo HIV-1 (LIU *et al.*, 2017).

Até então, apenas um estudo, que foi o de Yu *et al.* 2017, havia investigado a modificação simultânea de CXCR4 e CCR5 usando CRISPR-Cas9, que foi relatado para inibir a infecção pelo HIV-1 nas células. Neste estudo, apenas uma combinação de sgRNA CXCR4 e CCR5 foi avaliada. Por questões de eficácia e segurança, várias combinações de gRNAs de CXCR4 e CCR5 devem ser avaliadas (LIU *et al.*, 2017).

No estudo de Yu *et al.*, 2017, foi utilizado dois métodos independentes para entregar CRISPR-Cas9 em células T CD4 + primárias para modificar CXCR4 e CCR5 simultaneamente. A eficácia de nocaute do gene foi avaliada entre gRNA único (sgX4/sgR5) e gRNAs duplos (sgX4 e sgR5). Verificou-se que a entrega de um único vetor expressando sgX4 e sgR5 rendeu ablação de alta eficiência de CCR5 e CXCR4 (YU *et al.*, 2017).

Em estudos anteriores, os dois gRNAs CXCR4 direcionados e Cas9 inibiram eficientemente a infecção por HIV-1 em células T CD4 +. Já no estudo de Liu *et al.* 2017, foi relatado que cada um dos dois gRNAs CXCR4 juntamente com um gRNA CCR5, combinados em um vetor (lenti-X4R5-Cas9-#1, lenti-X4R5-Cas9-#2), pode romper CXCR4 e CCR5 simultaneamente em várias linhas celulares, bem como linfócitos T CD4+ primários. É importante ressaltar que as células modificadas são resistentes à infecção por HIV-1 CXCR4-trópica e CCR5-trópica e exibem uma vantagem seletiva sobre as células não modificadas durante todo o período de infecção por HIV-1. Foi verificado ainda que o lenti-X4R5-Cas9 poderia funcionar com

segurança sem qualquer edição ou citotoxicidade não específica após a interrupção de CXCR4 e CCR5. Portanto, o estudo de Liu et al., 2017, fornece uma base para o uso potencial do sistema CRISPR-Cas9 para bloquear eficientemente a infecção pelo HIV-1 em pacientes (LIU *et al.*, 2017).

O trabalho de Yu et al., 2017 também interrompeu com sucesso ambos os co receptores em linhagens de células suscetíveis ao HIV-1 e células T CD4+ primárias com mutagênese fora do alvo indetectável (YU *et al.*, 2017).

Foi realizado um teste no estudo de Liu et al., 2017, para saber se o sistema lenti-X4R5-Cas9 realmente funcionou em células T CD4+ primárias. O lentivírus X4R5-Cas9 foi usado na eletroporação para transfectar as células T CD4+ primárias, conforme relatado em estudo anterior de Hou *et al.*, 2015. Após a transfecção dos plasmídeos em células T CD4+, foi analisada a eficácia de nocaute no nível do genoma, e assim foi descoberto que os genes CXCR4 e CCR5 foram editados especificamente como esperado, mostrando assim que lenti-X4R5-Cas9 havia interrompido eficientemente os alvos CXCR4 ou CCR5 (LIU *et al.*, 2017).

No estudo de Liu et al., 2017, foi descoberto que o CRISPR-Cas9 poderia romper eficientemente os co receptores do HIV, CXCR4 e CCR5 simultaneamente usando gRNAs combinados visando as sequências dos genes CXCR4 e CCR5. O sistema CRISPR-Cas9 demonstrou ser tolerável a incompatibilidade entre gRNAs projetados e seus alvos. A análise fora do alvo foi realizada e nenhum desvio evidente foi detectado em qualquer um dos locais previstos nas células T CD4 + primárias, que confirmaram a especificidade dos gRNAs projetados (LIU *et al.*, 2017).

A partir de um estudo clínico, o Paciente de Essen, que era um paciente de 27 anos com infecção por HIV-1 e linfoma anaplásico de grandes células, recebeu um transplante de células-tronco CCR5 Δ 32 compatível com HLA, que foi semelhante ao paciente de Berlim. No entanto, ao invés deste paciente se curar do vírus como o paciente de Berlim, o resultado foi que o vírus mudou para HIV-1 X4-trópico, assim mostrando que editar apenas CXCR4 ou CCR5 pode não ser suficiente. Portanto, a ruptura simultânea dos co receptores do HIV deve ser considerada (LIU *et al.*, 2017).

Embora estudos sobre edição de CXCR4 e CCR5 em células sejam limitados, Yu et al., 2017 também relataram recentemente que eles

interromperam com sucesso CXCR4 e CCR5 simultaneamente por CRISPR-Cas9 em linhas celulares e células T CD4 + primárias. No entanto, para especificidade e eficiência, mais sítios alvo CXCR4 e CCR5 devem ser considerados no estudo de edição simultânea dos dois genes por CRISPR-Cas9. Para isso ser possível é necessário que mais estudos detalhados sejam realizados a respeito da dupla edição dos co receptores do HIV (LIU *et al.*, 2017).

6.0 QUESTÕES ÉTICAS

O método CRISPR-Cas9 já provou ser revolucionário, sendo apontado com imenso potencial para pesquisa e medicina genética. Sua precisão para leitura e para edição do genoma com baixo custo, considerando a tecnologia de edição genética, pode solucionar problemas genéticos de longa data, evitando-os. Para tanto, a tecnologia guarda inúmeras possibilidades de solução de problemas até então irreversíveis. Contudo os inúmeros riscos quanto às possibilidades de erro são preocupantes, especialmente quanto aos aspectos éticos e, dessa forma, o seu controle jurídico no mundo global (HUPFFER, BERWIG., 2020).

Essa possibilidade de modificar geneticamente linhagens germinativas tem sido alvo de discussões no campo da ciência desde o passado. A bioética sempre está presente quando novas técnicas são criadas, para avaliar os riscos do procedimento e as implicações morais envolvidas. Grande parte da comunidade científica aprova a terapia genética em células somáticas, principalmente quando se trata de doenças com desordens graves, como a fibrose cística e a distrofia muscular de Duchenne (GONÇALVES, PAIVA., 2017).

Em 2015 pesquisadores chineses ultrapassaram as questões morais e anunciaram pela primeira vez a modificação genética de células embrionárias utilizando a técnica CRISPR-Cas9. Em seguida, outros pesquisadores chineses também relataram a realização do mesmo feito com o intuito de conferir resistência ao HIV pela inserção da mutação do gene CCR5. A análise genética mostrou que 4 dos 26 embriões foram modificados com sucesso. O resultado revelou a necessidade de aprimoramento da técnica, alertando que,

possivelmente, tais ensaios poderiam ser testados previamente em modelos animais (GONÇALVES, PAIVA., 2017).

Esses estudos causaram polêmica sobre a edição genética. O Comitê de Ética local declarou que foi correta a forma como o experimento foi conduzido, pois houve aprovação para o estudo realizado e o consentimento das doadoras dos óvulos. Por outro lado, no Reino Unido, foi aprovado o primeiro projeto para a edição de embrião humano saudável, entretanto, grupos de pesquisadores americanos mantiveram-se conservadores, reforçando a posição de não apoiarem esse tipo de experimento e declarando esperar por melhorias das técnicas e das definições de questões éticas (GONÇALVES, PAIVA., 2017).

Uma hipótese que se levanta é a de que é imprescindível que se reflita criticamente sobre os riscos do avanço irresponsável da técnica CRISPR-Cas9, tendo em vista que os problemas éticos, jurídicos e sociais que podem surgir com a aplicação em humanos são enormes, o que justifica um debate social amplo. Tal debate deve partir de uma contextualização global, na qual os preceitos jurídicos compreendam a pluralidade de fontes do Direito. Construindo, assim, um diálogo pela busca de uma governança global, ética e jurídica responsável frente às possibilidades ilimitadas da técnica CRISPR-Cas9 (HUPFFER, BERWIG., 2020).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das informações coletadas foi possível compreender, por meio dessa revisão bibliográfica, como o HIV causa a infecção nas células alvo, assim podendo analisar uma nova possibilidade de tratamento, visto que a TARV é o único tratamento existente.

Com o intuito de apontar uma nova terapia para o HIV, foi abordado o funcionamento do sistema CRISPR-Cas9 para edição dos co receptores celulares CCR5 e CXCR4.

Nos estudos apresentados foi visto que os co receptores podem ser possíveis alvos para a terapia gênica. Com o objetivo de demonstrar que a edição é uma alternativa viável, os pesquisadores projetaram gRNAs para direcionar a proteína Cas9, provocando uma clivagem no sítio alvo e uma modificação.

Posteriormente foi analisado se os gRNAs foram eficazes, se as mutações foram induzidas, se houve ou não a expressão dos genes CCR5 e CXCR4 e se realmente a edição impediu a entrada do HIV nas células. O resultado obtido foi promissor, uma vez que os estudos mostraram que o número de T CD4+ infectadas pelo vírus foi reduzido e alterações fora do alvo não foram observadas em outros locais previstos, porém é de extrema importância avaliar outras possíveis mutações fora do alvo, para que não haja preocupações para futuras aplicações da terapia.

Portanto, é possível concluir que a terapia gênica é uma alternativa de tratamento para a infecção do HIV, levando em consideração a questão ética. Contudo é necessário maiores investimentos e pesquisas para que seja possível prosseguir para uma nova fase do estudo, visto que os trabalhos já existentes são muito promissores, porém poucos, uma vez que ao longo da execução do trabalho foram encontrados uma quantidade relativamente pequena de estudos abordando o tema, e muitas vezes artigos sobre o mesmo tema porém com mesmos autores.

REFERÊNCIAS

ALKHATIB, Ghalib. **The biology of CCR5 and CXCR4**. Curr Opin HIV AIDS, Indiana, EUA, p. 96-103, 4 mar. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19339947>. Acesso em: 20 set. 2021.

ALLEN, Alexander G. *et al.* **Gene Editing of HIV-1 Co-receptors to Prevent and/or Cure Virus Infection**. Front. Microbiol, [S. l.], 17 dez. 2018. DOI <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02940>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02940/full>. Acesso em: 9 abr. 2022.

ARAÚJO , Robert Souza de; DIAS, Bruno Leonardo do Nascimento. **Uma breve síntese do cenário atual dos medicamentos e terapias antirretrovirais para o combate ao HIV no Brasil**. REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR, [S. l.], p. 1-15, 18 abr. 2021. Disponível em: <https://www.recima21.com.br/index.php/recima21/article/view/134/158>. Acesso em: 18 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância. **Boletim Epidemiológico HIV/AIDS 2020**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. Acesso em: 04 abr. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância. **Boletim Epidemiológico HIV/AIDS 2021**. Brasília: Ministério da Saúde, 2021. Acesso em: 06 abr. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância. Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Manual técnico para diagnóstico da infecção pelo HIV**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Acesso em: 06 abr. 2022.

CARVALHO, Patrícia Paiva *et al.* **Fatores associados à adesão à Terapia Antirretroviral em adultos: revisão integrativa de literatura.** *Ciência & Saúde Coletiva*, [s. l.], 2019. DOI <https://doi.org/10.1590/1413-81232018247.22312017>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/hwgHkxJgkv5TpcVPVTtsLxs/?format=html>. Acesso em: 16 out. 2021

CORNU , Tatjana I. *et al.* **Editing CCR5: A Novel Approach to HIV Gene Therapy.** *Advances in Experimental Medicine and Biology*, [S. l.], p. 51-67, 12 fev. 2015. DOI https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2432-5_6. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4939-2432-5_6#citeas. Acesso em: 19 abr. 2022.

DEEKS, Steven G.; OVERBAUGH, Julie; PHILLIPS, Andrew; BUCHBINDER, Susan. **HIV infection.** *Nature Reviews Disease Primers*, Estados Unidos, p. 1-22, 1 out. 2015. DOI <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.35>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201535#Sec14>. Acesso em: 13 out. 2021.

ENGELMAN , Alan; CHEREPANOV , Peter. **The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights.** *Nature Reviews Microbiology* , [S. l.], p. 279–290, 16 mar. 2012. DOI <https://doi.org/10.1038/nrmicro2747>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2747#citeas>. Acesso em: 9 abr. 2022.

FANALES-BELASIO, Emanuele; RAIMONDO, Mariangela; SULIGOI, Barbara; BUTTÒ, Stefano. **HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview.** *Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy, Vol. 46*, p. 1-10, 2010. DOI: 10.4415/ANN_10_01_02. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20348614/>. Acesso em: 21 out. 2021

FERREIRA, Roberta Costa Santos; RIFFEL, Alessandro; SANT'ANA, Antônio Euzébio Goulart. **HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas.** *Universidade Federal de Alagoas, Maceió – AL, Brasil*, p. 1-13, 9 ago. 2010. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/qn/a/YcnBsJYMxyvv9DnhCm8mdzB/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 5 ago. 2021.

GONÇALVES, Giulliana Augusta Rangel; PAIVA, Raquel de Melo Alves. **Gene therapy: advances, challenges and perspectives**. Einstein (São Paulo) [online]. 2017, v. 15, n. 3p. 369-375, 28 jul. 2017. DOI <https://doi.org/10.1590/S1679-45082017RB4024>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/eins/a/cPw3g6fGY8srqk5hs83dDKR/?lang=pt>. Acesso em: 6 abr. 2022.

GRANGEIRO, Alexandre; DA SILVA, Lindinalva Laurindo; TEIXEIRA, Paulo Roberto. **Resposta à aids no Brasil: contribuições dos movimentos sociais e da reforma sanitária**. Rev Panam Salud Publica, p. 1-8, 2009. Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/rpsp/2009.v26n1/87-94/pt>. Acesso em: 21 set. 2021.

HERNANDEZ, Paolo A. *et al.* **Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease**. Nature Genetics , [S. l.], p. 70-74, 14 abr. 2003. DOI <https://doi.org/10.1038/ng1149>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng1149>. Acesso em: 3 abr. 2022.

HOU, Panpan; CHEN, Shuliang; WANG, Shilei; YU, Xiao; CHEN, Yu; JIANG, Meng; ZHUANG, Ke; HO, Wenzhe; HOU, Wei; HUANG, Jian; GUO, Deyin. **Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection**. Scientific Reports, China, p. 1-12, 20 out. 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep15577#article-info>. Acesso em: 13 jun. 2021.

HÜTTER, Gero. **CCR5 Targeted Cell Therapy for HIV and Prevention of Viral Escape**. Viruses, [S. l.], p. 4186–4203, 27 jul. 2015. DOI <https://doi.org/10.3390/v7082816>. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4576177/>. Acesso em: 16 fev. 2022.

JUNIOR, Veriano Terto. **Homossexualidade e saúde: desafios para a terceira década de epidemia de HIV/AIDS**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 1-12, jun. 2002. DOI <https://doi.org/10.1590/S0104-71832002000100008>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ha/a/nnvKsFYGkD7TPDyhc8jGxqM/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 10 jun. 2021.

KLASSE, Per Johan. **The molecular basis of HIV entry. Cellular microbiology**, [S. l.], p. 1183-1192, 14 ago. 2012. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01812.x>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417324/>. Acesso em: 16 abr. 2022.

LI, Chang *et al.* **Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4+ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9**. Journal of General Virology, Indiana, EUA, v. 96, n. 8, 1 ago. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25854553/>. Acesso em 20 jun.2021

LIU, Shuai *et al.* **HIV-1 inhibition in cells with CXCR4 mutant genome created by CRISPR-Cas9 and piggyBac recombinant technologies**. Scientific reports, [S. l.], p. -, 5 jun. 2018. DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26894-4>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5988798/?report=classic>. Acesso em: 16 abr. 2022.

LIU, Zhepeng *et al.* **Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection**. Cell & Bioscience, [s. l.], 9 set. 2017. DOI <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0174-2>. Disponível em: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-017-0174-2#citeas>. Acesso em: 10 mar. 2022.

MURDOCH C. **CXCR4: receptor de quimiocina extraordinário**. Revisões Imunológicas. 2000 Out; 177:175-184. Acesso em: 10 mar. 2022.

MURPHY, Kenneth; TRAVERS, Paul; WALPORT, Mark. **Imunobiologia de Janeway**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 885p. E-book.

OLIVEIRA, Bárbara de Alencar *et al.* **Vetores virais para uso em terapia gênica**. Revista Pan-Amazônica de Saúde, Ananindeua, v. 9, n. 2, p. 57-66, 1 jun. 2018. DOI <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-62232018000200008>. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232018000200008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 20 mar. 2022.

PECHANSKY, Flavio. **Modelo teórico de exposição a risco para transmissão do vírus HIV em usuários de drogas**. Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil, p. 1-7, mar. 2001. DOI <https://doi.org/10.1590/S1516-44462001000100011>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbp/a/qwGxgpRg3NB8k5sRprgJ8MC/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 13 set. 2021.

RAMOS, Antonio David Rufino. **CRISPR-Cas9: uma ferramenta de edição genética para investigação e novas terapias**. Universidade de Coimbra, p. 1-31, 5 jul. 2016. Disponível em: <https://eg.uc.pt/bitstream/10316/42065/1/MONO-DAVID.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2021.

ROSA, Matheus Costa da; SILVA, Naylê Maria Oliveira da; HORA, Vanusa Pousada da. **Patogênese do HIV – características do vírus e transmissão materno-infantil**. Universidade Federal do Rio Grande – FURG – Rio Grande, RS, Brasil., p. 1-6, 5 jan. 2015. Disponível em:

<http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2017/04/RBAC-vol-48-4-2016-ref.-203.pdf>. Acesso em: 3 out. 2021

SAAYMAN, S. M., LAZAR, D. C., SCOTT, T. A., HART, J. R., TAKASHI, M., BURNETT, J. C., PLANELLES, V., MORRIS, K. V., & WEINBERG, M. S. **Potent and Targeted Activation of Latent HIV-1 Using the CRISPR/dCas9 Activator Complex**. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, p. 488–498. DOI <https://doi.org/10.1038/mt.2015.202> Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4786915/> . Acesso em: 17 dez. 2021

SANDER, Jeffrey D.; JOUNG, Keith. **CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting**. Harvard Medical School, Boston, MA, USA, p. 1-24, 2 abr. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4022601/#!po=7.57576>. Acesso em: 23 dez. 2021.

SILVA, Daniel Fernandes da *et al.* **O Genótipo CCR5 Δ 32 em pacientes infectados pelo HIV candidatos à transplante de medula**. *Brazilian Journal of health Review*, Curitiba, v. 3, n. 3, p. 5082-5106, 26 maio 2020. DOI <https://doi.org/10.34119/bjhrv3n3-089>. Disponível em: <https://brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/10613/9008>. Acesso em: 5 mar. 2022

UNAIDS. **Estatísticas mundiais sobre o HIV**. Folha de dados 2021, UNAIDS, p. 1-6, dez. 2021. Disponível em: https://unaids.org.br/wp-content/uploads/2021/06/2020_11_19_UNAIDS_Factsheet_PORT_Revisada-Final.pdf. Acesso em: 20 set. 2021.

XIAO, Qiaoqiao; GUO, Deyin; CHEN, Shuliang. **Application of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing in HIV-1/AIDS Therapy**, China, p. 1-15, 22 mar. 2019. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6439341/>. Acesso em: 13 abr. 2021

YU, Songlin *et al.* **Simultaneous Knockout of CXCR4 and CCR5 Genes in CD4+ T Cells via CRISPR/Cas9 Confers Resistance to Both X4- and R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection.** *Human Gene Therapy*, [S. l.], p. 51-67, 1 jan. 2018. DOI <http://doi.org/10.1089/hum.2017.032>. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/hum.2017.032>. Acesso em: 19 abr. 2022.

ZHANG, Feng; WEN, Yan; GUO, Xiong. **CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges.** *Human Molecular Genetics*, [s. l.], v. 23, p. 40-46, 15 set. 2014. DOI <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu125>. Disponível em: <https://academic.oup.com/hmg/article/23/R1/R40/2900693?login=false>. Acesso em: 16 mar. 2022.