

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Vanessa Silva dos Santos

TÉCNICA DE CRISPR/CAS9 APLICADA NO COMBATE AO HIV-1

São Paulo

2018

Vanessa Silva dos Santos

TÉCNICA DE CRISPR/CAS9 APLICADA NO COMBATE AO HIV-1

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Profa. Dra. Beatriz Helena Pizarro De Lorenzo, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

**São Paulo
2018**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Santos, Vanessa Silva dos

Técnica de CRISPR/Cas9 aplicada no combate ao HIV-1 / Vanessa
Silva dos Santos. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2018.
81 p.

Orientação de Beatriz Helena Pizarro de Lorenzo

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina
(Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2018.

1. Edição de genes 2. HIV 3. Mutação 4. Sistemas
CRISPR-CAS 5. Terapia genética I. Lorenzo, Beatriz Helena
Pizarro de II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 573.21

Vanessa Silva dos Santos

TÉCNICA DE CRISPR/CAS9 APLICADA NO COMBATE AO HIV-1

São Paulo, 2018

Professora Orientadora Dra. Beatriz Helena Pizarro De Lorenzo

Professor Examinador Dr. Ronni Rômulo Novaes e Brito

Agradecimentos

Meu eterno agradecimento à minha mãe, que sempre lutou e nunca mediu esforços para me proporcionar a melhor educação possível, por sempre acreditar no meu potencial, pelo amor incondicional e por me ensinar desde criança a força e capacidade das mulheres.

À minha tia Edilene, pelo companheirismo, pelos momentos alegres de descontração quando eu mais precisava e por sempre torcer por mim.

Aos meus colegas de classe, pela parceria. Em especial ao meu grande amigo Felipe Pequeno, que conheci no início do curso, pelo companheirismo de sempre, pelas risadas e pela amizade que se estenderá pelo resto da vida.

Aos meus professores, pela forma apaixonada de ensinar, que me inspiraram e motivaram durante esses anos e pela capacidade de fazer despertar em mim o amor pela Biomedicina.

Aos responsáveis pelo programa Ciência sem Fronteiras, pela oportunidade de estudar no exterior com bolsa de intercâmbio, que me proporcionou grandes experiências não apenas acadêmicas, mas também culturais e pessoais.

Por fim, agradeço imensamente a Deus e meus guias, que me deram força durante toda essa trajetória, me ajudaram, deram sabedoria e tranquilidade para seguir durante os momentos difíceis.

“Ciência inteligente não é aquela que resolve detalhes e fecha portas, mas a que abre novas questões e possibilidades”

Suzana Herculano-Houzel

SANTOS, Vanessa Silva dos. **Técnica de crispr/cas9 aplicada no combate ao HIV-1**. 2018. 80 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018.

Desde sua descoberta em bactérias *Escherichia coli* no ano de 2005, o sistema CRISPR/Cas9 tem despertado grande interesse da comunidade científica e mostrado enorme potencial para edição genômica tanto para experimentos *in vitro* quanto *in vivo*. Uma das diversas aplicações dessa técnica consiste no tratamento para a infecção com HIV. Sabe-se que essa infecção pode ser controlada de maneira eficiente por meio da terapia antirretroviral, desde que haja a devida aderência por parte do paciente. Entretanto tais medicamentos não possuem a capacidade de conduzir à cura. Este estudo teve como objetivo revisar sobre a aplicação da técnica de terapia gênica CRISPR/Cas9 no combate ao HIV-1. Para tanto, realizou-se uma revisão da literatura em livros acadêmicos especializados e artigos científicos. Foi visto que o sistema CRISPR tipo II pode ser empregado de maneira eficiente, principalmente, por meio de gRNAs com alvo em sequências virais essenciais (como LTR, Gag, Pol, Env, etc), ou então, para editar os co-receptores CCR5 e CXCR4 da célula hospedeira. É possível que ocorra escape viral devido às mutações causadas por Cas9, a melhor alternativa para se evitar a fuga é escolhendo uma sequência viral alvo altamente conservada. Muito já evoluiu na edição de material genético por meio de CRISPR/Cas9, mas a técnica ainda precisa ser aprimorada em questões relacionadas à entrega e aos efeitos fora do alvo de interesse, antes de ser aplicada ao ser humano, razão pela qual ainda existem questionamentos bioéticos relacionados ao uso de embriões humanos em pesquisas.

Palavras-chave: Edição de genes. HIV. Mutação. Sistemas CRISPR/Cas. Terapia genética

Since its discovery in *Escherichia coli* bacteria, in 2005, the CRISPR/Cas9 system awakened great interest in the scientific community and showed enormous potential for genomic editing in both *in vitro* and *in vivo* experiments. One potential application of this technique is in the treatment of HIV infection, that can be efficiently controlled through antiretroviral therapy, since the patient adheres to the treatment. Unfortunately, these drugs can not cure the patient. This study reviewed in the current related scientific literature, the use of the CRISPR/Cas9 technique to combat HIV-1 infections. The results presented here showed that type II CRISPR can be efficiently applied to edit essential viral sequences (such as LTR, Gag, Pol, Env, etc.) using specific gRNAs, or editing the CCR5 and CXCR4 co-receptors in the host cells. An efficient way to avoid viral escape, due to Cas9-induced mutations, is to target highly conserved sequences in the viral genome. Genomic editing was greatly improved by CRISPR/Cas9; however, there are points that need to be refined before human trials, such as the development of most efficient delivery methods and reduce or eliminate off-target effects. These unimproved issues still lead issues related to the use of human embryos.

Keywords: Gene editing. HIV. Mutation. CRISPR/Cas systems. Gene therapy

Lista de Figuras

Figura 1 – Organização gênica do HIV e as funções das proteínas codificadas	20
Figura 2 – Mecanismo de penetração do HIV na célula	22
Figura 3 – Ciclo vital do HIV	23
Figura 4 – Perfil sorológico da infecção pelo HIV	25
Figura 5 – Visão geral do sistema CRISPR/Cas	28
Figura 6 – Mecanismo natural dos diferentes tipos de CRISPR na imunidade adaptativa de micro-organismos	30
Figura 7 – Nuclease Cas9 guiada por RNA	32
Figura 8 – Formas de reparo de edição genômica de dupla fita	33
Figura 9 – O ciclo de vida do HIV com pontos alvo de intervenção	35
Figura 10 – Análise da eliminação do DNA proviral por produto de PCR	39
Figura 11 – Interrupção da infecção lentiviral por CRISPR/Cas9	40
Figura 12 – Esquema simplificado do posicionamento de LTR e GFP no material proviral	41
Figura 13 - Análise da intensidade média de fluorescência gerada por GFP em células HEK293 infectadas por HIV-1 _{NL4-3-ΔE-GFP} e transfectadas com hCas9 e gRNAs com alvo em regiões distintas do genoma viral	42
Figura 14 – Efeitos de gRNA/Cas9 e gRNA sozinho na expressão de GFP e produção viral	44
Figura 15 – Supressão do HIV-1 por gRNAs multiplex com alvo em diferentes regiões do DNA viral	45
Figura 16 – Reinfecção de diferentes clones de células T por HIV-1NL4-gfp	46
Figura 17: Níveis de HIV-1 medidos pelo repórter luciferase 72 horas pós infecção ..	51
Figura 18: Níveis de p24 no sobrenadante de culturas celulares T Jurkat pós-infecção por HIV-1 de tropismos diferentes	52
Figura 19: Níveis de p24 no sobrenadante de culturas celulares T CD4+ primárias pós-infecção por HIV-1 de tropismos diferentes	53
Figura 20: Resistência de células GHOST X4R5 transduzidas com diferentes lentivírus CRISPR/Cas9 ao HIV-1 X4 e R5 tropicos	54
Figura 21: Resistência de duas diferentes linhagens de células T CD4+ tratadas com LV-X4R45 ao HIV-1 X4 e R5 tropicos	55
Figura 22: Aplicações de Cas9 em uma plataforma alternativa de engenharia	

genômica	56
Figura 23: dCas9 fundidas à efetores funcionais	57
Figura 24: Replicação do HIV-1 em células 293T expressando Cas9 e gRNA	60
Figura 25: Uma abordagem combinacional de edição de genes CRISPR/ Cas9 pode impedir a replicação do HIV e prevenir a fuga viral	61
Figura 26: Análise de provírus de HIV-1 com Cas9 / gRNA	62
Figura 27: Excisão in vivo do DNA de HIV-1 por rAAV9: saCas9/ gRNA em vários tecidos de camundongos Tg26	64
Figura 28: Excisão de DNA pró-viral do HIV-1 e uma redução robusta na transcrição de RNA do HIV-1 na maioria dos órgãos/ tecidos de camundongos transgênicos Tg26 por meio de sgRNAs/ saCas9 AAV-DJ/8	65
Figura 29: Esquema do locus alvo de CCR5	66
Figura 30: Injeção de um zigoto humano 3PN (painel esquerdo) e o desenvolvimento em estágio de 8–16 células <i>in vitro</i> (painel direito)	66

Lista de siglas

AIDS: *acquired immunodeficiency syndrome* ou síndrome da imunodeficiência adquirida

TARV: terapia antirretroviral

Cas: *CRISPR associated proteins* ou proteínas associadas à CRISPR

CRISPR-Cas9: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – Cas9 associated* ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas – associadas à Proteína 9

crRNA: CRISPR-RNA

dCas9: *dead Cas9*

DNA: dideoxynucleotideo

EGFP: *enhanced green fluorescent protein* ou proteína melhorada verde fluorescente

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* ou Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

GFP: *Green Fluorescent Protein* ou proteína verde fluorescente

gRNA: RNA guia

hCas9: enzima Cas9 humanizada

HDAC: Histona desacetilase

HDR: *homology-directed repair* ou reparo direcionado por homologia

HIV: *human immunodeficiency virus* ou vírus da imunodeficiência humana

iPSC: *induced pluripotent stem cell* ou célula-tronco pluripotente induzida

Kb: quilobase

KRAB: *Kruppel-associated box*

LTRs: *long terminal repeats* ou repetições longas de terminais

NHEJ: *non-homologous end joining* ou união de extremidade não-homóloga

Nt: nucleotídeo

PAM: *protospacer adjacent motif* ou protoespaçador adjacente ao motivo/ motivo adjacente ao protoespaçador

Pb: pares de base

PBMC: *peripheral blood mononuclear cell* ou célula mononuclear do sangue periférico

PMA: *phorbol myristate acetate* ou acetato de miristato de forbol

RT: *reverse transcriptase* ou transcriptase reversa

sgRNA: *small guide RNA* ou RNA guia pequeno

TALEN: *transcription activator-like effector nuclease* ou enzimas efetoras de ativação da transcrição

TSA: tricostatina A

WGS: *whole-genome sequencing* ou sequenciamento total do genoma

ZFNs: *zinc-finger nuclease* ou nuclease dedo de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	METODOLOGIA	18
4	DESENVOLVIMENTO	19
4.1	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida	19
4.1.1	Estrutura, genes e ciclo de vida do HIV-1	19
4.1.2	Transmissão e grupos de risco	23
4.1.3	Diagnóstico e curso da doença	24
4.1.4	A atual terapia medicamentosa	26
4.2	Sistema CRISPR/Cas	27
4.2.1	Proteínas Cas e os diferentes tipos de sistema CRISPR	29
4.2.2	Mecanismo do sistema CRISPR/Cas9	30
4.3	Estudos do uso de CRISPR para inativação do HIV-1 <i>in vitro</i>	33
4.3.1	Efeitos fora do alvo de interesse	36
4.3.2	Métodos de entrega da Cas9	36
4.3.3	Método baseado em gRNA com alvo em LTR e genes virais essenciais	38
4.3.4	Método com alvo em CCR5 e CXCR4	48
4.3.5	Outros métodos de combate ao HIV com CRISPR/Cas9	55
4.3.6	Escape do HIV-1 devido à própria ação de CRISPR/Cas9	58
4.4	Estudos do uso de CRISPR/Cas9 para inativação do HIV-1 <i>in vivo</i> e aspectos éticos	63
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

Nas ciências médicas, desde a compreensão do DNA como unidade básica da hereditariedade, a capacidade de gerar modificações pontuais no genoma humano tem se tornado um propósito cada vez mais importante para pesquisadores no mundo inteiro (GONÇALVES; PAIVA, 2017). Com o passar dos anos, houve o desenvolvimento de áreas da ciência voltadas para essa manipulação, como engenharia e terapia gênica, direcionadas à modificação de organismos e sistemas biológicos; marcando o começo de uma nova era para a ciência básica, medicina e biotecnologia (HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

De maneira geral, engenharia genômica consiste no processo de fazer modificações específicas no genoma, conseqüentemente em suas marcas epigenéticas e atividade transcricional (HSU; LANDER; ZHANG, 2014). Em adição, compreende-se terapia gênica como a habilidade de aprimorar o material genético mediante correção de genes alterados e/ou alterações sítio-específicas com objetivo terapêutico (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Uma técnica recentemente descoberta e empregada nesse campo é a que utiliza o sistema CRISPR/Cas9 bacteriano, que consiste em pequenas repetições palindrômicas interespaçadas associadas à Proteína 9 (ZHU et al., 2015). Historicamente, sequências palindrômicas interespaçadas foram descritas pela primeira vez no material genético de *Escherichia coli*, onde cinco sequências de 29 pb foram encontradas entre espaçadores de 32pb. Tempos depois, o mesmo padrão, porém com sequências diferentes, foi encontrado em outros micro-organismos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Haloferax spp.* e *Archaeoglobus fulgidus* (RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012).

Em 2005, pesquisadores presumiram que essas sequências variáveis eram de origem extracromossomal, e funcionavam como memória imunológica contra fagos e plasmídeos (MOJICA et al., 2005). Foi então dado o estopim inicial à utilização do sistema CRISPR/Cas que, desde 2012, apresenta-se como uma das mais importantes técnicas biotecnológicas de edição genômica (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

CRISPR-Cas atua como um tipo de sistema imune-adaptativo de procaríotos, pois há o reconhecimento do material genético invasor, clivagem em fragmentos e

incorporação ao seu DNA, por meio de diferentes proteínas Cas. Na ocorrência de um segundo ataque pelo mesmo agente, os ácidos nucleicos invasores serão reconhecidos e destruídos pela endonuclease Cas9, guiada por um RNA complementar à sequência do alvo (RAN et al., 2013; HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

Assim, Cas9 é a enzima responsável pelo corte do DNA, e CRISPR é um conjunto de sequências de DNA que orientam precisamente onde a Cas9 deve cortar. Conseqüentemente, basta que a sequência correta seja fornecida à Cas9 para que o genoma seja clivado no local desejado (RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012).

Tempos antes da descoberta do sistema CRISPR/Cas, duas técnicas biomoleculares de edição gênica com nucleases já eram bem conhecidas e utilizadas: as Nucleases Dedo de Zinco (*Zinc-Finger Nucleases – ZFNs*) e Nucleases Efetoras Semelhantes à Fatores de Transcrição (*Transcription activator-like effector nucleases – TALEN*) (LEBBINK et al., 2017). Ambas, assim como CRISPR/Cas, induzem quebra de dupla fita do DNA alvo em *loci* específicos (RAN et al., 2013). Porém a endonuclease Cas9 possui algumas vantagens sobre os métodos ZFNs e TALEN, como a facilidade de personalização, já que Cas9 pode ser redirecionada para novas sequências de DNA apenas modificando-se a sequência guia; facilidade de edição de genoma multiplex, pois Cas9 pode ser direcionada a múltiplos *loci* genômicos simultaneamente, utilizando-se vários pequenos gRNAs; maior eficiência para acertar o local alvo, pois é capaz de clivar exatamente entre as 17^a e 18^a bases da sequência alvo (RAN et al., 2013). Além disso, o sistema CRISPR/Cas9 também possui a vantagem de ter um menor tamanho, quando comparada ao TALEN (com sequências grandes e repetitivas); característica que permite sua entrega por vetores lentivirais à célula alvo (EBINA et al., 2013).

Atualmente, essa terapia é empregada em laboratórios de pesquisa, de forma experimental, com amplo foco para o tratamento de doenças ocasionadas por desordens genéticas recessivas, doenças genéticas adquiridas, como câncer, e certas infecções virais (GONÇALVES; PAIVA, 2017). Diversos alvos estão em foco nos estudos sobre o uso de CRISPR/Cas9 como ferramenta de controle de infecções virais, como o adenovírus, vírus herpes simples tipo 1, Epstein-Barr, citomegalovírus humano, papilomavírus humano, vaccínia, hepatite B e HIV-1 (YIN et al., 2018). Esse

último, o vírus da imunodeficiência humana, detectado pela primeira vez em 1981 (IMRAN et al., 2017).

De acordo com dados mundiais, mais de 35 milhões de pessoas estão infectadas pelo HIV-1 (o tipo mais prevalente), e mais de 2 milhões de novas infecções ocorrem todos os anos (IMRAN et al., 2017). É estimado que 30% dos indivíduos infectados não tenham conhecimento sobre seu diagnóstico e apenas 54% dos adultos e 43% das crianças infectadas recebem tratamento com antirretrovirais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). No Brasil, a maioria dos pacientes soro-positivos está concentrada nas regiões Sudeste e Sul, com cerca de 50% e 20% de todos os casos diagnosticados entre 1980 e 2017, respectivamente. E a maior ocorrência dos casos de AIDS no Brasil, está nos indivíduos de faixa etária entre 25 e 39 anos, tanto para o sexo masculino quanto feminino (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Sendo uma infecção lentiviral, células do sistema imune do hospedeiro são atacadas pelo HIV e têm o DNA proviral (material intermediário, que se forma por transcrição reversa a partir do RNA viral) integrado ao seu genoma (LIAO et al., 2015).

Atualmente, o tratamento medicamentoso conta com combinações de antirretrovirais capazes de inibir fases distintas do ciclo, controlam a viremia e restauram parcialmente o número de células T CD4+, mas não conduzem à cura da infecção. Por isso, há uma constante necessidade em desenvolver estratégias alternativas e efetivas na cura da infecção pelo HIV, principalmente devido às mutações que levam à resistência aos medicamentos orais, e também à carga viral latente nos reservatórios do organismo (YIN et al., 2018; LEBBINK et al., 2017). Esses reservatórios apresentam um número significativo de células infectadas de forma latente (cerca de 1 por milhão de células CD4+ de memória) e se localizam no cérebro (FISCHER-SMITH et al., 2001), sangue periférico (FINZI, 1997), tecido linfóide (CHUN et al., 1997), trato gastrointestinal (SMITH et al., 2003), entre outros (SILICIANO et al., 2003).

Como a inserção do DNA viral no genoma da célula hospedeira é essencial para o estabelecimento da infecção e geração de reservatórios no organismo, hipoteticamente, deletar ou inativar o DNA proviral é a chave para a cura e eliminação do HIV; tornando o sistema CRISPR/Cas9 uma nova estratégia na luta contra essa

doença (ZHU et al., 2015). E, justamente por ser o mais proeminente grupo de células latentes infectadas, as células T CD4+ de memória possuem importante papel nas pesquisas de CRISPR focadas na supressão da infecção latente por HIV-1 (KAMINSKI et al., 2016a).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar, por meio de revisão bibliográfica, a aplicação da técnica de edição gênica CRISPR/Cas9 no combate ao vírus da imunodeficiência humana tipo 1.

2.2 Objetivos Específicos

1) Descrever os aspectos principais da AIDS, como sua via de transmissão, diagnóstico e a atual terapia medicamentosa utilizada no mundo;

2) Descrever o HIV-1, estruturalmente e geneticamente

3) Discorrer sobre o mecanismo original do sistema bacteriano CRISPR/Cas9;

4) Revisar sobre a aplicação de CRISPR/Cas9 na eliminação do HIV 1 em infecções latentes, em infecções e reinfecções;

5) Reunir informações de estudos que utilizaram CRISPR/Cas9 *in vitro* e *in vivo*, ressaltando sua importância, resultados, evolução e desafios; com foco no desenvolvimento de uma nova opção de tratamento;

6) Discorrer sobre aspectos éticos envolvendo essa técnica de edição gênica.

3 METODOLOGIA

Foi realizada revisão bibliográfica em livros do acervo da biblioteca Padre Inocente Radrizzani do Centro Universitário São Camilo e em bases de dados como LILACS (Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências Sociais e da Saúde), PubMed, Bireme e no portal de revista eletrônica Scielo (Scientific Electronic Library Online). A maioria das publicações utilizadas datam de 2012 a 2018, com preferência pelos artigos e periódicos dos últimos 3 anos, em idioma inglês e português. Foram utilizados os seguintes descritores: CRISPR/Cas, CRISPR II, tracrRNA, Cas, Cas9, HIV, AIDS, vírus, imunodeficiência, engenharia gênica, terapia gênica, CCR5, CXCR4, LTR, células T, sistema imune.

Realizou-se então, uma extensa revisão de texto para devida análise de dados, com seleção de 93 artigos, tendo em vista que os critérios de inclusão foram: correlação e relevância com o tema proposto, clareza, coerência e coesão e informações atuais.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

A AIDS foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1981, em um surto no qual alguns pacientes apresentavam infecções incomuns em indivíduos imunocompetentes, como pneumonia por fungo oportunista (*P. carinii*) bem como o sarcoma de Kaposi, um raro tumor dermatológico. Uma avaliação mais detalhada, feita por epidemiologistas, mostrou que uma deficiência da resposta imune celular e diminuição marcante da subpopulação de células T auxiliares eram características comuns ao grupo de pacientes (GELMANN et al., 1983). Complementarmente, descobriu-se que uma diversidade de células do sistema imune é atacada pelo vírus, compreendendo não somente células T CD4+, mas também macrófagos, células dendríticas, astrócitos e células da glia (BARRE-SINOUSI et al., 1983).

Posteriormente, em 1983, foi isolado e identificado o agente etiológico responsável por esses eventos: o HIV. Foram apontados dois tipos estreitamente correlacionados, o HIV-1 e o HIV-2, que divergem em relação à virulência, origem, prevalência e sequência de DNA (MONTAGNIER et al., 1984).

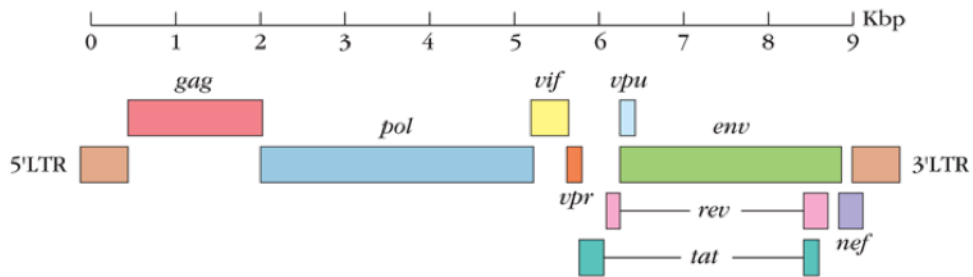
Por ser membro da família dos lentivírus, o HIV tem como principais características o armazenamento de sua informação genética em RNA, habilidade de desencadear efeitos citopáticos e capacidade de causar infecções latentes, resultando em doenças fatais e de desenvolvimento lento (GELMANN et al., 1983).

4.1.1 Estrutura, genes e ciclo de vida do HIV-1

O genoma da fita de RNA tem aproximadamente 9.2 kb de tamanho e apresenta uma combinação básica de sequências típica de todos retrovírus habituais: Repetições Terminais Longas (*Long Terminal Repeats - LTRs*) em cada extremidade do genoma, com a função de conduzir a integração do vírus ao material gênico do hospedeiro, sua expressão e replicação; sequências *gag*, responsáveis pela codificação de proteínas estruturais básicas; sequências *env*, que codificam gp120 e gp41, duas glicoproteínas fundamentais para a invasão da célula; *Pol*, que codifica a integrase e a protease viral, duas enzimas transcriptases reversas essenciais para a replicação. Adicionalmente, HIV-1 apresenta outros seis genes reguladores

específicos, importantes para sua replicação: *tat*, *ver*, *vif*, *nef*, *vpr* e *vpu* (Figura 1) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Figura 1 – Organização gênica do HIV e as funções das proteínas codificadas



Gene	Produto proteico	Função da proteína codificada
<i>gag</i>	Precursor de 53 kDa ↓ p17 p24 p9 p7	Proteínas do nucleocapsídeo Forma a camada externa do cerne Forma a camada interna do cerne É um componente do nucleóide do cerne Se liga ao RNA genômico
<i>env</i>	Precursor de 160 kDa ↓ gp41 gp120	Glicoproteínas do envelope É uma proteína transmembrana associada com gp120 e necessária para a fusão Projeta-se do envelope e se liga ao CD4 53
<i>pol</i>	Precursor ↓ p64 p51 p10 p32	Enzimas Possui atividade de RNase e transcriptase reversa Possui atividade de transcriptase reversa É a protease que cliva o precursor de gag É uma integrase
<i>tat</i>	p14	Proteínas reguladoras Ativa fortemente a transcrição do DNA pró-viral
<i>rev</i>	p19	Permite a exportação de RNAs não processados ou pouco-processados do núcleo Proteínas auxiliares
<i>nef</i>	p27	Regula negativamente o MHC de classe I e o CD4 da célula hospedeira
<i>vpu</i>	p16	É necessária para a reunião viral eficiente e o brotamento Promove a liberação das partículas virais e degrada o CD4 no retículo endoplasmático
<i>vif</i>	p23	Promove a maturação e a infectividade da partícula viral
<i>vpr</i>	p15	Promove a localização nuclear do complexo de pré-integração e inibe a divisão celular

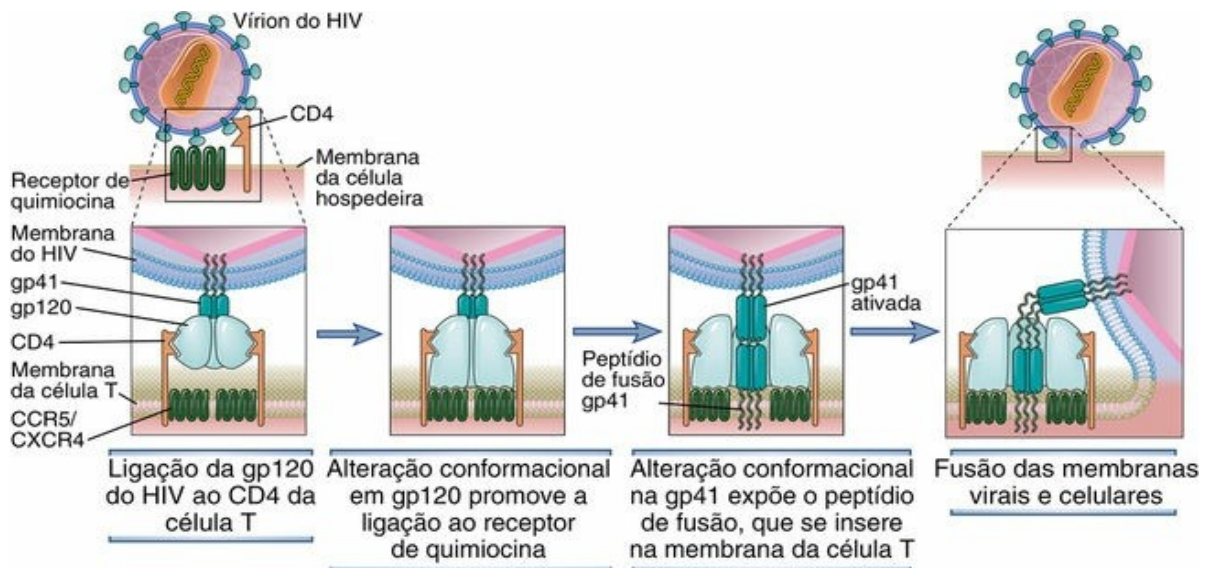
Os três principais genes *gag*, *pol* e *env*, codificam glicoproteínas precursoras que são clivadas dando origem às proteínas do cerne do nucleocapsídeo, enzimas necessárias para a replicação e as proteínas do envelope. Dos seis genes restantes, três (*tat*, *rev* e *nef*) codificam proteínas reguladoras que desempenham um papel fundamental no controle da expressão, dois (*vif* e *vpu*) codificam proteínas necessárias para a manutenção do vírion e um (*vpr*) codifica um fraco ativador de transcrição. A longa repetição terminal 5' (LTR) contém sequências onde se ligam as proteínas reguladoras. A organização do HIV-2 é similar, exceto pelo gene *vpu*, que é substituído pelo *vpx* nos dois genomas.

Fonte: (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008)

As glicoproteínas, de membrana gp41 e externa gp120, são subunidades secundárias derivadas do precursor gp160. Nesse complexo, a subunidade externa liga-se a moléculas CD4, induzindo mudança conformacional que favorece sua ligação secundária a um co-receptor de quimiocina (CCR5 para vírus R5, CXCR4 para vírus X4 e ambos para vírus trópicos duplos R5X4) (ROITT et al., 2014). Sabe-se que, na maioria dos casos, o vírus utiliza, inicialmente, o CCR5 para mediar sua entrada na célula e, uma vez que a infecção esteja estabelecida, o vírus utiliza o co-receptor CXCR4 como uma molécula alternativa para sua entrada; ou seja, um paciente soropositivo crônico pode apresentar tropismo viral duplo (CONNOR et al., 1997).

Somente a ligação com CD4 não é o bastante para a invasão viral, é necessária a ligação aos co-receptores para que haja a devida infecção. Essa ligação, por sua vez, provoca outra mudança conformacional, dessa vez na subunidade transmembrânica, expondo uma região hidrofóbica, conhecida como peptídeo de fusão, encarregado por unir a membrana do vírus com a da célula-alvo, após sua inserção na mesma (Figura 2) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

Figura 2 – Mecanismo de penetração do HIV na célula



Mudanças na conformação sequencial em gp120 e gp41 são induzidas pela ligação ao CD4. Essas mudanças promovem a ligação do vírus ao co-receptor (um receptor de quimiocina) e fusão das membranas do HIV-1 e da célula hospedeira. O peptídeo de fusão gp41 ativado contém resíduos hidrofóbicos de aminoácido que medeiam a inserção na membrana plasmática da célula hospedeira.

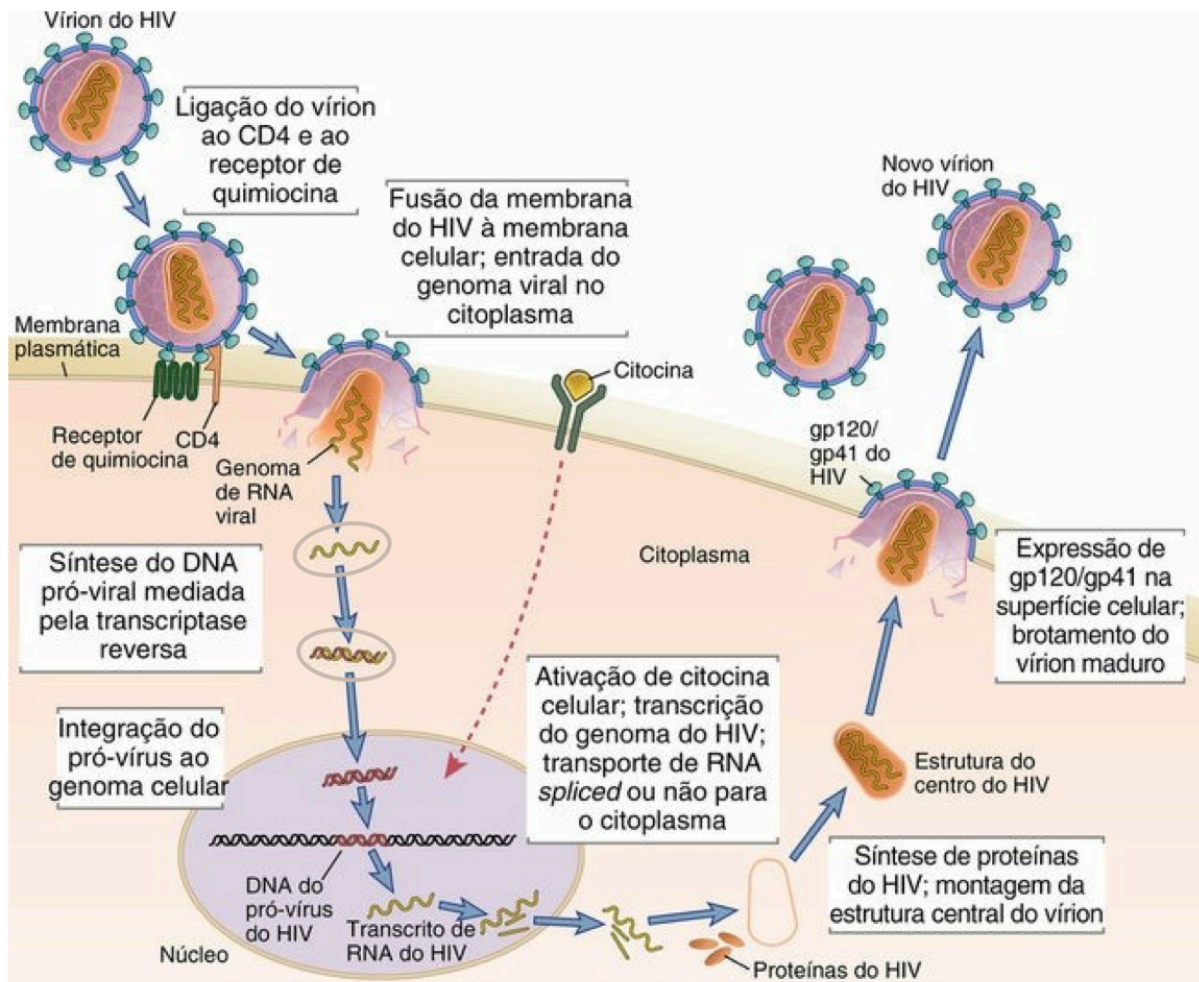
Fonte: (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008)

Após sua entrada na célula, o RNA viral é transcrito em DNA pela sua enzima transcriptase reversa. Essa cópia é denominada provírus e é introduzido ao genoma hospedeiro pela integrase viral, e será replicado e transcrito junto com o DNA celular. Os vários RNAs mensageiros do vírus são então traduzidos em proteínas e utilizados na formação de novas partículas virais. Quando o provírus é expresso para formação de novos vírions em grande quantidade a lise da célula hospedeira ocorre. Em contrapartida, o provírus pode permanecer latente por meses ou anos, com pouca ou nenhuma produção de novas proteínas ou vírions, até que algum sinal regulador o reative (Figura 3) (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

Para regular esse início da transcrição, as LTRs são de extrema importância e nelas, encontram-se três sequências fundamentais: sequências de sinais de poliadenilação, sequência promotora TATA box e sítios de ligação para NF- κ B e SPI (ambos fatores de transcrição da célula hospedeira). O início da transcrição do gene do HIV nas células T, macrófagos e monócitos está relacionado à presença de citocinas para a ativação fisiológica dessas células por meio do NF- κ B e sua posterior

ligação à sequências da LTR. Esse evento diz muito sobre a patogênese da AIDS, pois a resposta normal de uma célula imunológica CD4+ a uma infecção por micro-organismo pode ser a chave para o fim do estágio de latência e reinício da produção do vírus. Logo, múltiplas infecções adquiridas por pacientes aidséticos instigam a produção do vírus e infecção de novas células (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Figura 3 – Ciclo vital do HIV



As etapas sequenciais no ciclo vital do HIV são apresentadas, desde a infecção inicial de uma célula hospedeira até a replicação viral e a liberação de um novo vírion.

Fonte: (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008)

4.1.2 Transmissão e grupos de risco

A infecção inicial pelo HIV ocorre por meio da exposição de uma pessoa sã à líquidos corporais de uma pessoa infectada, como sêmen, líquido vaginal, leite materno e sangue. Atualmente, a via mais comum de transmissão dá-se por meio de

intercurso sexual desprotegido, mas também ocorre por meio do uso agulhas contaminadas (frequentemente compartilhadas entre usuários de drogas injetáveis) e transfusão sanguínea e de hemoderivados, embora essa última opção seja bastante improvável, já que bolsas transfusionais são rotineiramente testadas quanto à presença do vírus (ROITT et al., 2014).

Outra importante via de transmissão ocorre entre uma mãe infectada e seu bebê no momento do parto ou pelo leite materno. Essa infecção vertical depende da carga viral materna e da frequência de amamentação, mas pode ser significativamente reduzida pela administração de fármacos antirretrovirais, como zidovudina, durante a gravidez e também pelo tratamento do recém-nascido por seis semanas após o nascimento (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002. KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

Pelo fato da transmissão pelo HIV-1 demandar contato com fluidos contaminados, pesquisadores e profissionais da saúde compõem outro grupo de risco; porém, acatar as devidas precauções com medidas preventivas diminui significativamente o risco de contaminação (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

4.1.3 Diagnóstico e curso da doença

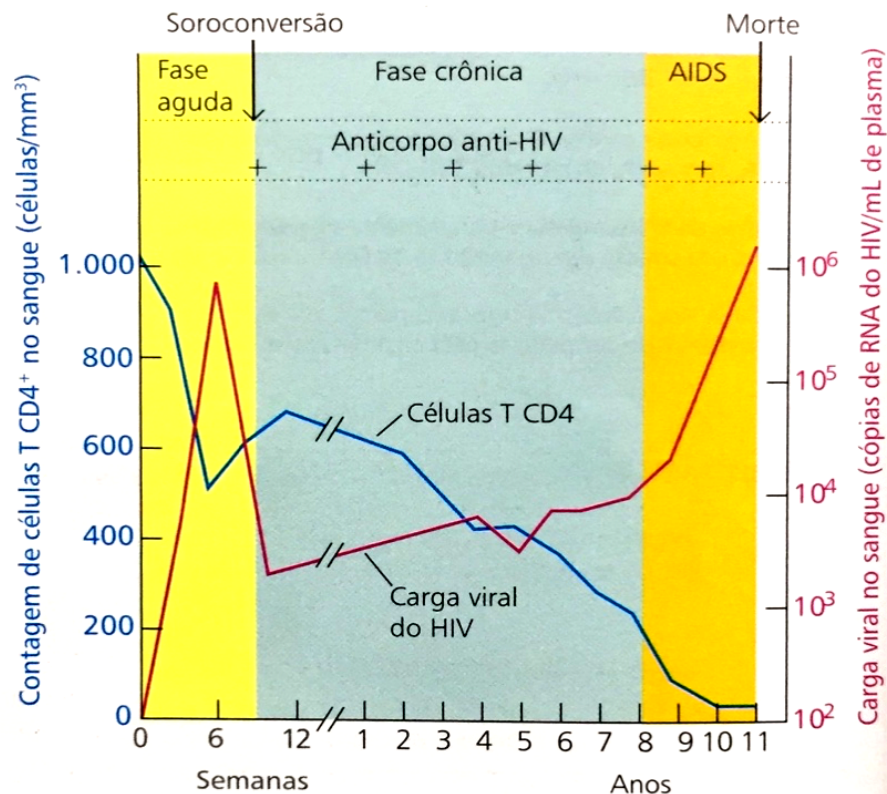
Entre duas e oito semanas depois da infecção, os pacientes desenvolvem viremia aguda com sintomas semelhantes aos de uma gripe comum, com febre alta, dor de garganta, cefaleia e aumento de volume dos linfonodos. Esse quadro é designado como síndrome retroviral aguda e tais sintomas costumam desaparecer espontaneamente entre 1 a 4 semanas (ROITT et al., 2014).

No decorrer dessa fase aguda, ocorre aumento exponencial da replicação viral, principalmente nas células T CD4+ intestinais, e uma redução significativa das células T CD4+ circulantes. Nessa fase, geralmente também tem início forte resposta de células T CD8-HIV específicas, com foco na destruição de células infectadas, seguida por produção de anticorpos anti-HIV específicos, ocorrendo a chamada soroconversão (ROITT et al., 2014).

Após a infecção primária, inicia-se um período de latência, em que o vírus mantém sua multiplicação em células de vida curta no sangue, ocorrendo então uma

diminuição gradativa na função e número absoluto de células T CD4+ mediada pelos efeitos citopáticos diretos do HIV sobre a célula, como constante perda de membrana, comprometimento da síntese proteica, formação de sincícios e morte celular (Figura 4) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Figura 4 – Perfil sorológico da infecção pelo HIV



Logo após a infecção, o RNA viral é detectável no soro. Entretanto, a infecção pelo HIV é mais comumente detectada pela presença de anticorpos anti-HIV após a soroconversão, que em geral ocorre em poucos meses após a infecção. Sintomas clínicos indicativos da AIDS geralmente não aparecem por pelo menos oito anos após a infecção, mas este intervalo é variável. O início clínico da AIDS costuma ser marcado por um decréscimo no número de células T e por um aumento na carga viral.

Fonte: (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008)

O processo global se inicia sem anticorpos anti-HIV detectáveis e progride até a síndrome completa da AIDS, com número significativamente menor de células T CD4+, reações de hipersensibilidade tardia reduzidas ou ausentes e ocorrência de infecções oportunistas por tuberculose, pneumonia, diarreia e várias malignidades. Geralmente, a infecção primária passa despercebida e dá origem a uma longa fase

crônica, caracterizada por pouco ou nenhum sinal evidente de infecção; sendo inclusive estabelecida uma relação entre o número de células T CD4+ e o curso da infecção no indivíduo, já que há uma relação dinâmica entre o vírus e o sistema imune (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

Para diagnóstico, um dos testes mais conhecidos é pela detecção da presença de anticorpos contra as proteínas do HIV, com sensibilidade para cerca de três meses após a infecção (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

4.1.4 A atual terapia medicamentosa

O HIV apresenta uma das mais elevadas taxas de mutação na natureza e rápida replicação, o que contribui para acelerar a evolução viral. (LEBBINK et al., 2017).

Atualmente, a infecção por HIV é suprimida pela terapia antirretroviral (TARV), que inibe a replicação viral e controla a viremia em níveis abaixo do limite detectável em pacientes soropositivos (WANG, G. et al., 2016b). A terapia tem como alvos diferentes fases do ciclo viral, como: entrada, fusão, transcrição reversa, integração, transcrição/transativação, montagem e maturação (ROITT et al., 2014). Entretanto, apresenta alguns obstáculos como alto custo, necessidade de aderência integral ao uso das drogas por parte do paciente, efeitos colaterais resultantes do uso a longo prazo das medicações, desenvolvimento de resistência e, sobretudo, a incapacidade de conduzir à cura (YIN et al., 2018).

O vírus permanece em reservatórios celulares latentes no organismo hospedeiro e cópias do DNA proviral que foram integradas ao DNA hospedeiro ficam em um estado inativo, mas podem ser reativados para produzir novos vírus se a terapia for interrompida, o que acarreta rápido aumento da carga viral. Frente a isso, a TARV deve ser mantida ao longo de toda a vida do paciente, mesmo naqueles que respondem muito bem às medicações (KAMINSKI et al., 2016a).

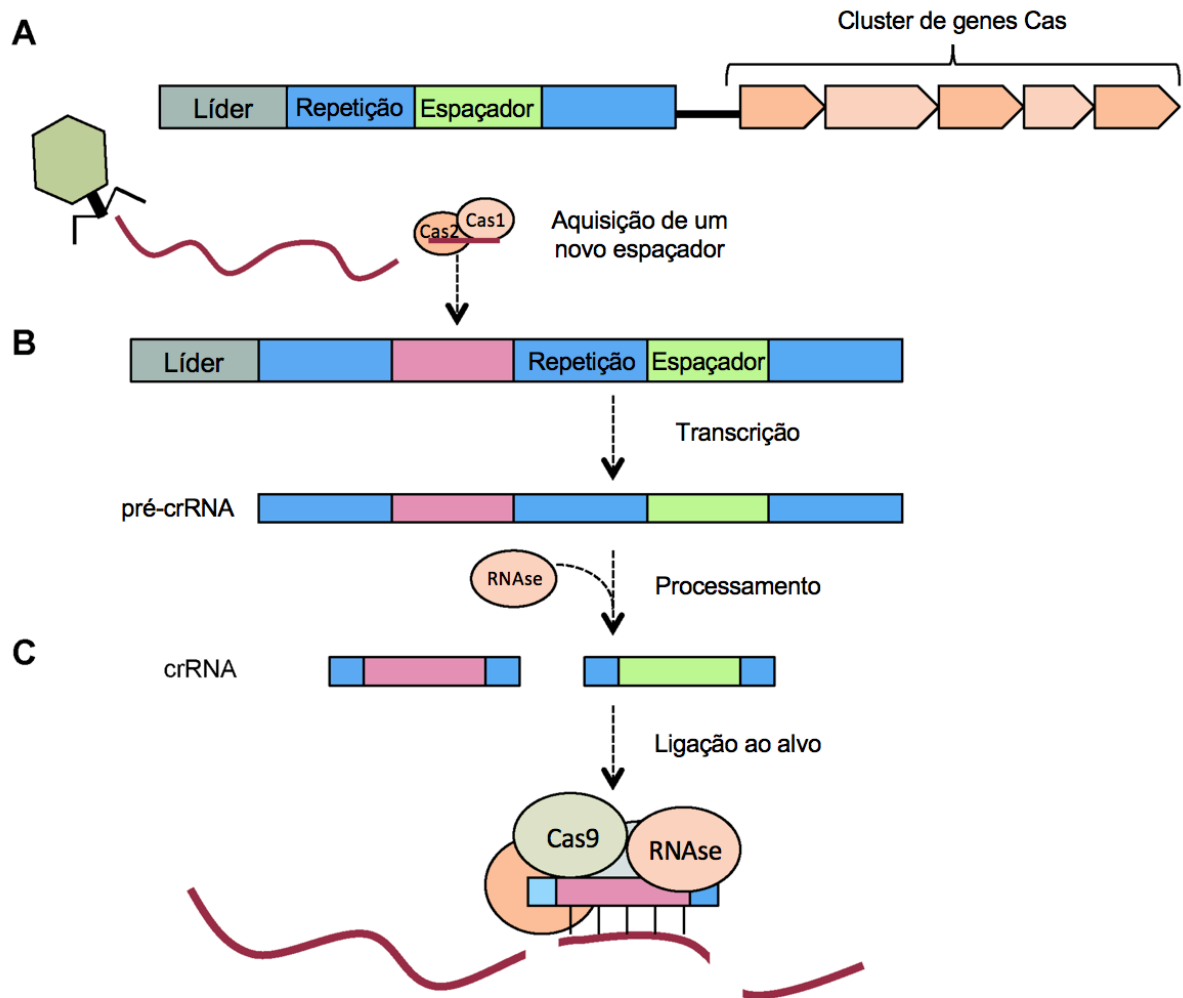
O desenvolvimento de drogas contra o HIV ainda é um desafio, pois o vírus tem uma alta variabilidade genômica, o que leva à produção de quase-espécies e resistência à drogas que anteriormente eram eficazes (IMRAN et al., 2017).

4.2 Sistema CRISPR/Cas

CRISPR-Cas atua como uma espécie de imunidade adaptativa de microorganismos que utiliza uma nuclease guiada por RNA para clivar elementos genéticos exógenos (GONÇALVES; PAIVA, 2017). Encontra-se presente em aproximadamente 90% das arqueas e 40% das bactérias (HORVATH; BARRANGOU, 2010; HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

O funcionamento desse sistema ocorre em três etapas: a fase adaptativa, com inserção de pequenas sequências do material genético do invasor, os chamados espaçadores, entre os elementos repetitivos do genoma bacteriano, conhecidos como matrizes de CRISPR. Em seguida, nas fases de expressão e interferência, essas matrizes são transcritas em pequenos fragmentos de pré-crRNA, por proteínas Cas, e depois gerados os crRNA maduros. Finalmente, o complexo Cas-crRNA, guiado pela sequência específica, liga-se ao material alvo do invasor (Figura 5) (RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012; JINEK et al., 2012).

Figura 5 – Visão geral do sistema CRISPR/Cas



Visão geral de CRISPR/ imunidade adaptativa associada a CRISPR/Cas.

A) Adaptação. CRISPR é composto de repetições curtas e interespaçadas por sequências derivadas de invasores externos. Por meio da infecção com esse elemento estranho (por exemplo, fagos ou plasmídeos), parte do genoma é usualmente incorporada na extremidade líder de CRISPR e a repetição é duplicada. As matrizes de CRISPR estão localizadas adjacentes a um cluster de genes Cas;

B) Geração de crRNA. Os CRISPR são transcritos em pré-crRNA que são processados em crRNAs maduros;

C) Interferência. O crRNA, sob o comando de um complexo de proteínas Cas, se liga e degrada o ácido nucleico alvo do elemento invasor.

Fonte: (RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012)

4.2.1 Proteínas Cas e os diferentes tipos de sistema CRISPR

Os genes Cas codificam diversas nucleases e helicases, que são responsáveis por cortar ou desenrolar o DNA (JASEN et al., 2002). Apesar de partilhar alguns mecanismos, o sistema CRISPR/Cas é atualmente classificado em três diferentes tipos, com base em características singulares, como presença de diferentes RNAs não codificantes, matriz de elementos repetitivos e proteínas Cas de assinatura (RAN et al., 2013).

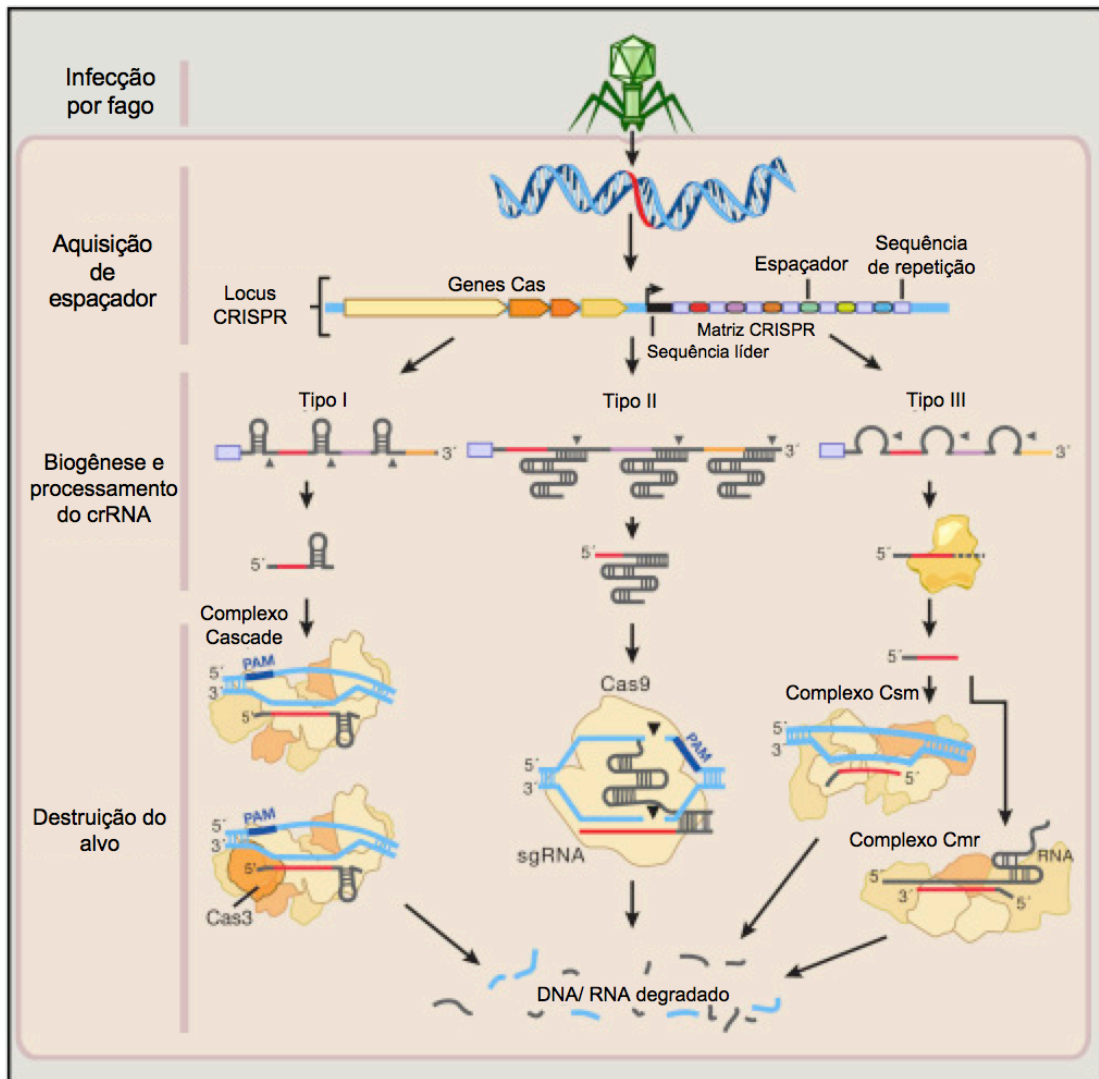
Enquanto algumas proteínas Cas estão envolvidas na obtenção de novos espaçadores, outras são responsáveis por promover resistência ao fago invasor, afetando elementos genéticos estranhos. As proteínas Cas1 e Cas2 estão presentes em todos três tipos de CRISPR, e formam o maquinário enzimático essencial para a aquisição de novos espaçadores e elementos de invasão; sendo a Cas1 uma endonuclease metal-dependente que cliva dsDNA, enquanto que Cas2 atua especificamente como endoribonuclease, clivando ssRNA (HORVATH; BARRANGOU, 2010).

Já as proteínas Cas3, Cas9 e Cas10 são proteínas de assinatura específicas para os sistemas CRISPR tipo I, II e III respectivamente (Figura 6) (RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012).

Os sistemas tipo I e III podem ser encontrados tanto em bactérias como arqueas, compartilham algumas características gerais e possuem um grande complexo de proteínas multi-Cas, eficientes no reconhecimento e clivagem de ácidos nucleicos complementares ao crRNA. Esses complexos são conhecidos como Casata (para o tipo I) e Cmr ou Csm RAMP (para o tipo III) (HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

Diferentemente dos sistemas anteriormente citados, o tipo II está presente apenas em bactérias (HSU et al., 2014) e Cas9 (antes chamada de Cas5, Csn1 ou Csx12) é a endonuclease de assinatura (HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

Figura 6 – Mecanismo natural dos diferentes tipos de CRISPR na imunidade adaptativa de micro-organismos



O arranjo CRISPR é um transcrito de RNA não codificante que é maturado enzimaticamente através de caminhos distintos que são únicos para cada tipo de sistema CRISPR. Esse trabalho tem como foco, o sistema CRISPR tipo II.

Fonte: (HSU; LANDER; ZHANG, 2014)

4.2.2 Mecanismo do sistema CRISPR/Cas9

Após a invasão da célula por um fago ou plasmídeo, as sequências de repetição são interespaçadas por sequências variadas provenientes do DNA exógeno alvo, denominado espaçador ou protoespaçador. Neste processo, ocorre separação da dupla fita da sequência de repetição e sua duplicação, sendo o material estranho adicionado entre elas e à extremidade proximal líder da matriz CRISPR. Esses dois

elementos (sequencia de repetição e DNA exógeno alvo) são transcritos e formam o CRISPR RNA ou crRNA (RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012).

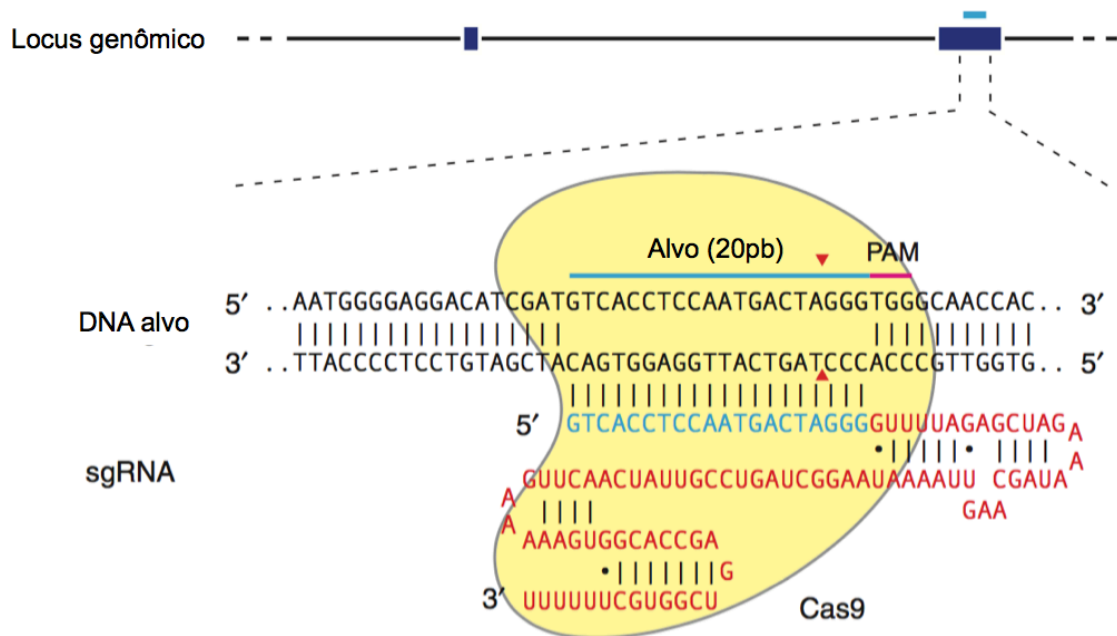
Cada crRNA contém uma sequência guia de 20nucleotídeos e uma sequência de repetição, sendo a primeira responsável por orientar a Cas9 ao DNA alvo de 20pb para pareamento segundo modelo de bases de Watson-Crick (RAN et al., 2013).

Cada protoespaçador está sempre associado com uma sequência PAM, que difere para cada tipo de sistema e bactéria. No CRISPR-Cas9 originado de *Streptococcus pyogenes*, o DNA alvo necessariamente tem que preceder uma sequência trinucleotídea 5'-NGG PAM. Essa sequência é diferente das de *S. thermophilus* e *N. meningitidis*, por exemplo (RAN et al., 2013). É de conhecimento que PAM é responsável por auxiliar na distinção entre sequências próprias e não próprias pela Cas9, já que as próprias não possuem PAM (HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

No CRISPR tipo II, um dos sistemas mais bem definidos e o de escolha no âmbito experimental, ocorre processamento do pré-crRNA em crRNA maduro por meio de um pequeno RNA trans-codificado de 25 pb, denominado crRNA de trans-ativação (tracrRNA). Além do tracrRNA, para o processamento de pré-crRNA em crRNA maduro, também é necessária a presença de Cas9 e RNase III: a associação entre tracrRNA e crRNA gera um RNA de fita dupla que, ao ser processada pela RNase III, dá origem a uma molécula híbrida, responsável por direcionar a Cas9 ao alvo (DELTCHEVA et al., 2011). É entendido, então que as proteínas Cas9 compõem uma família de endonucleases que necessitam de uma estrutura de pares de bases formada por tracrRNA e crRNA para clivar o dsDNA alvo (JINEK et al., 2012).

O requisito da RNase III é a primeira descoberta de uma proteína não-Cas como parte essencial da maquinaria de defesa CRISPR/Cas (RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012).

Figura 7 – Nuclease Cas9 guiada por RNA



Cas9 derivada de *S. Pyogenes*. Uma sequência de sgRNA de 20 pb (azul) guia a endonuclease. A sequência guia pareia com o DNA alvo (barra azul superior), obedecendo ao requisito de preceder a sequência PAM 5'-NGG. Cas9 provoca a quebra de dupla fita 3 pb anteriores à PAM (triângulo vermelho).

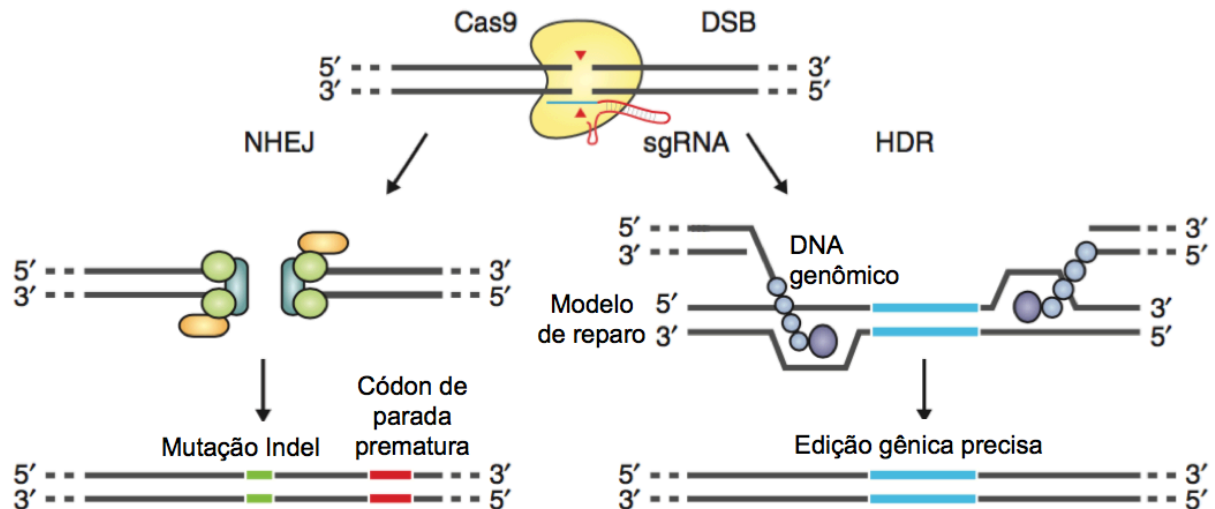
Fonte: (RAN et al., 2013)

A proteína Cas9 é composta por dois domínios homólogos às endonucleases HNH e RuvC, e não têm seu papel implicado somente na maturação do crRNA, mas juntamente com a estrutura híbrida tracrRNA:crRNA (conhecido como gRNA), reconhece e liga-se ao dsDNA alvo, promove uma ruptura de dupla fita e degrada o material alvo (Figura 7) (RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012). Como consequência desse processo, pode ocorrer a integração de uma sequência exógena no genoma (knock-in), inativação (*knockout*) ou substituição alélica no alvo (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Depois da clivagem pela Cas9, o *locus* alvo passa por uma das duas principais vias de reparo do DNA: recombinação não homóloga (NHEJ), que é passível de erros pois, por não necessitar de nenhum molde de DNA, deixa marcas na forma de mutações *indel* de inserção/ deleção e pode mediar inativação por provocar mudanças de estrutura nos códons; ou então o reparo é dado via recombinação homóloga (HDR) de alta fidelidade, uma vez que necessita da presença de uma sequência molde,

diminuindo o erro. Porém, esta ocorre em menor frequência (Figura 8) (RAN et al., 2013; KLANN; BLACK; GERSBACH, 2018).

Figura 8 – Formas de reparo de edição genômica de dupla fita



Na via NHEJ, propensa a erros, as extremidades de uma quebra de dupla fita são processadas por maquinaria endógena de reparo de DNA e reunidas, o que pode resultar em mutações indel aleatórias no local da junção. Alternativamente, um modelo de reparo com fita molde pode ser fornecido para alavancar o caminho HDR, que permite alta fidelidade e edição precisa.

Fonte: (RAN et al., 2013)

4.3 Estudos do uso de CRISPR para inativação do HIV-1 *in vitro*

É difícil pensar em alguma outra revolução que tenha impactado tanto e tão rapidamente a área biológica quanto CRISPR (LANDER, 2016).

Em um dos primeiros estudos *in vitro*, foi comprovado que era possível induzir a clivagem de dsDNA precisamente 3 nucleotídeos depois da sequência PAM. Também se provou possível a reprogramação de Cas9 com espaçadores específicos na matriz CRISPR para a quebra em um local previamente escolhido e que os domínios HNH e RuvC da nuclease Cas9, quando devidamente modificados, quebram cada um, uma das fitas do DNA alvo (JINEK et al., 2012). Hoje, sabe-se que tais domínios podem ser mutados e explorados em pesquisas científicas para provocar quebra de dupla fita, resultando em mutações indel e reparo pelo mecanismo de NHEJ (RAN et al., 2013; HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

Mas essas primeiras pesquisas foram realizadas em micro-organismos e a próxima etapa seria a aplicação dessa técnica em células de mamíferos; que ao contrário das bactérias, são mais complexas, com um genoma 1000 vezes maior, dentro da estrutura nuclear e envoltos por uma elaborada estrutura de cromatina (LANDER, 2016).

Para superar esse problema, Mali e colaboradores desenvolveram uma versão dessa ferramenta de edição gênica que pode ser empregada em células eucarióticas, tendo como base alterações em spCas9 (EBINA et al., 2013): em células de mamíferos, a função de nuclease guiada por RNA pode ser reconstituída por meio da expressão heteróloga de um códon humano Cas9 otimizado (hCas9) e dos componentes de RNA necessários, ou seja, crRNA e tracrRNA (MALI et al., 2013; RAN et al., 2013). Além do mais, crRNA e tracrRNA podem ser combinados para criar um sgRNA quimérico e Cas9 pode ser redirecionada por meio de uma sequência guia de 20 nt para quase qualquer alvo de interesse e sem perda de sua eficiência na clivagem, desde que seja um local antecessor imediato da sequência PAM (5`-NGG) (JINEK et al., 2012; RAN et al., 2013).

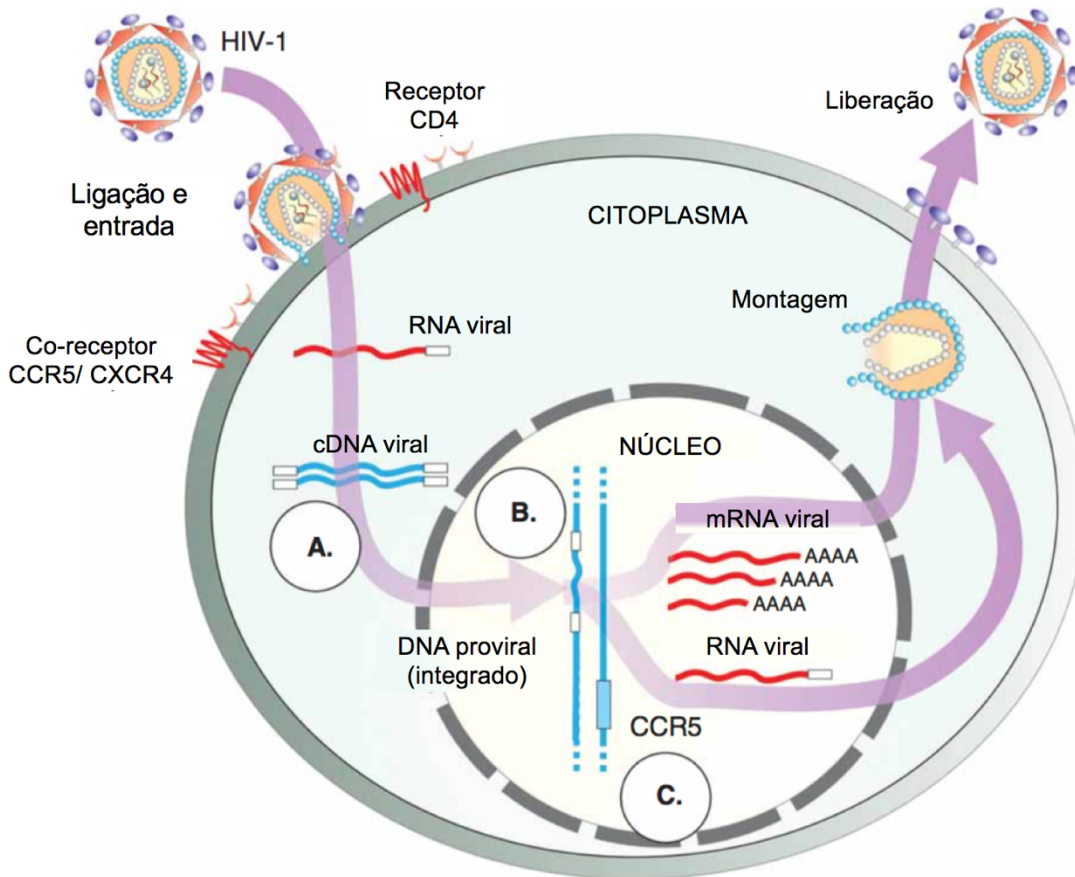
Baseando-se nesse mecanismo natural, a edição de sequências específicas do genoma de qualquer organismo tornou-se mais viável; necessitando, exclusivamente, de três moléculas: Cas9, gRNA e DNA alvo (GONÇALVES; PAIVA, 2017; HSU; LANDER; ZHANG, 2014). Devido à combinação entre alta flexibilidade, especificidade e grande eficiência para clivagem, o sistema CRISPR/Cas9 tem sido cada vez mais utilizado não só em estudos de edição genômica, mas também para aplicações antivirais (WANG et al., 2018).

Observações passadas sugerem que a chave para a cura da infecção por HIV-1 está em métodos que eliminam o genoma proviral de células HIV-1 positivas e as protege de futuras infecções, com pouco ou nenhum dano ao paciente. Nesse contexto, o sistema CRISPR/Cas9 representa uma estratégia na inibição do HIV-1 tanto *in vitro* como *in vivo* (KAMINSKI et al., 2016a).

Com base nesses princípios, duas principais estratégias destacam-se dentre uma variedade de possibilidades: a primeira delas consiste em usar o maquinário CRISPR/Cas9 para editar os co-receptores de HIV-1, CCR5 e CXCR4. A outra opção baseia-se na inativação de sequências LTR ou sequências virais fundamentais por

meio de gRNAs desenvolvidos para se ligar a esses genes, estando integrados ou não ao genoma hospedeiro (Figura 9) (YIN et al., 2018).

Figura 9 – O ciclo de vida do HIV com pontos alvo de intervenção



O HIV liga-se à superfície celular por meio do receptor CD4 e dos co-receptores CCR5/ CXCR4. Após a fusão com a membrana celular, a partícula viral entra na célula e seu genoma é transcrito de RNA para DNA. Esse DNA é integrado ao genoma da célula hospedeira, produzindo vírions, que se desprendem da célula, completando o ciclo infeccioso. A ruptura do ciclo de vida do HIV, dirigida por nucleases, pode ocorrer em qualquer um dos seguintes estágios: **A.** Direcionamento e prevenção da integração do DNA proviral no genoma. **B.** O DNA pró-viral, uma vez integrado ao genoma, é um alvo para excisão ou desativação **C.** Alvo em fatores celulares necessários para o ciclo de vida do HIV, que incluem o co-receptor CCR5 ou outros fatores de dependência do hospedeiro.

Adaptado de: (SAAYMAN et al., 2015)

4.3.1 Efeitos fora do alvo de interesse

O principal obstáculo da técnica está nos possíveis efeitos fora do alvo (*off-target*), que levam à toxicidade. Para prevenir esse efeito, deve-se escolher um local altamente específico, e definir precisamente quais serão as sequências gRNA/PAM (WANG et al., 2018). Nessa busca, ferramentas de bioinformática podem e devem ser utilizadas com o objetivo de selecionar gRNAs com alta atividade no alvo e baixa atividade fora dele (MORENO-MATEOS et al., 2015). Posteriormente, a atividade dos gRNAs selecionados deve ser analisada experimentalmente, o que pode ser feito em cultura celular por meio de co-transfecção de Cas9 e gRNA e posterior verificação da clivagem do DNA plasmidial com a sequência alvo (YIN et al., 2016).

Estudos anteriores já confirmaram que os efeitos fora do alvo de interesse podem ser significativamente reduzidos controlando-se o tempo necessário da atividade de CRISPR tanto para inativação quanto ativação do HIV (WANG et al., 2018). No entanto, a eficiência deve ser posteriormente testada com as sequências-alvo integradas no genoma celular, por exemplo, em células infectadas, pois a estrutura local da cromatina pode afetar a atividade CRISPR (Wu et al., 2014).

4.3.2 Métodos de entrega da Cas9

Para que seja totalmente bem-sucedida, a tecnologia de CRISPR aplicada no combate ao HIV deve apresentar uma entrega, ou *delivery*, eficiente de seus componentes a todas as células infectadas pelo vírus, principalmente àquelas que compõem o reservatório latente durante a TARV ou às células suscetíveis ao HIV. (WANG et al., 2018).

Para essa função, emprega-se um vetor, que nada mais é que um carreador molecular; o vetor precisa ser muito específico, eficiente na liberação de um ou mais genes de tamanhos variados de acordo com a aplicação clínica, não desencadear resposta imune no paciente, ser purificado para uso em grande escala e, por fim, deve ser capaz de expressar o gene para toda a vida do paciente (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Essa questão de transporte representa um desafio contínuo para a engenharia genética, fazendo-se indispensável o desenvolvimento de métodos mais eficazes e

seletivos para a correta introdução dos itens de edição apenas no local desejado (WANG et al., 2018). Salvo todas as limitações, há três principais métodos de entrega para Cas9 e gRNA: plasmídeos, vetores virais e ribonucleoproteínas (JINEK et al., 2012).

O primeiro é o mais comum e consiste na transfecção de células com plasmídeos codificando Cas9, crRNA e tracrRNA. Este processo é feito por meio de eletroporação e sua maior vantagem é a fácil produção *in vitro* (JINEK et al., 2012). Entretanto, seu uso em humanos restringe-se a casos *ex vivo*, já que *in vivo* há uma baixa eficiência de entrega. Além disso, foi observada integração aleatória do material ao genoma das células transfectadas, o que pode levar a efeitos *off-target* e mutações por inserção (KIM et al., 2014).

Com relação aos vetores virais, estes são empregados para introdução de um fragmento exógeno de DNA em células primárias ou refratárias à transfecção por plasmídeos (SHUI et al., 2016). Essa integração do material exógeno é feita de maneira prolongada e aleatória, o que pode ocasionar inserções não almejadas, limitando seu uso (ZHOU et al., 2014). Para resolver essa questão, vetores virais não integrativos, como adenovírus e vírus adeno-associados (AAVs), podem ajudar (JINEK et al., 2012). Nesses, o DNA viral é eliminado após alguns ciclos celulares (MAGGIO et al., 2014). Adenovírus apresentam boa correlação entre eficiência de empacotamento e tamanho do vírus; em contrapartida, quando utilizados *in vivo*, podem levar ao aumento da resposta imune e produção de citocinas inflamatórias (RAN et al., 2014).

Outro problema é que AVVs são pequenos, o que dificulta o processo de empacotamento da Cas9 (RAN et al., 2014). Endonucleases menores, provenientes de outras bactérias podem ser utilizadas nesses casos, como a de *Streptococcus thermophiles* (FONFARA et al., 2013), *Neisseria meningitides* (HOU et al., 2013) e *Staphylococcus aureus*, embora menores, têm a mesma eficiência que SpCas9 (RAN et al., 2014).

Por último, as ribonucleoproteínas (RNPs) representam um método alternativo aos plasmídeos e vetores virais, embora apresentem elevadas taxas de mutações *off-target*, por causarem uma expressão prolongada de Cas9 e gRNAs (WANG et al., 2018), RNPs com Cas9 conjugada a gRNA podem superar essa questão, pois após

induzirem a alteração específica no local alvo, são degradadas (SHUI et al., 2016). Esse mecanismo pode ser facilmente gerado *in vitro* e entregue por microinjeção direta, eletroporação ou lipossomas catiônicos (WANG et al., 2018).

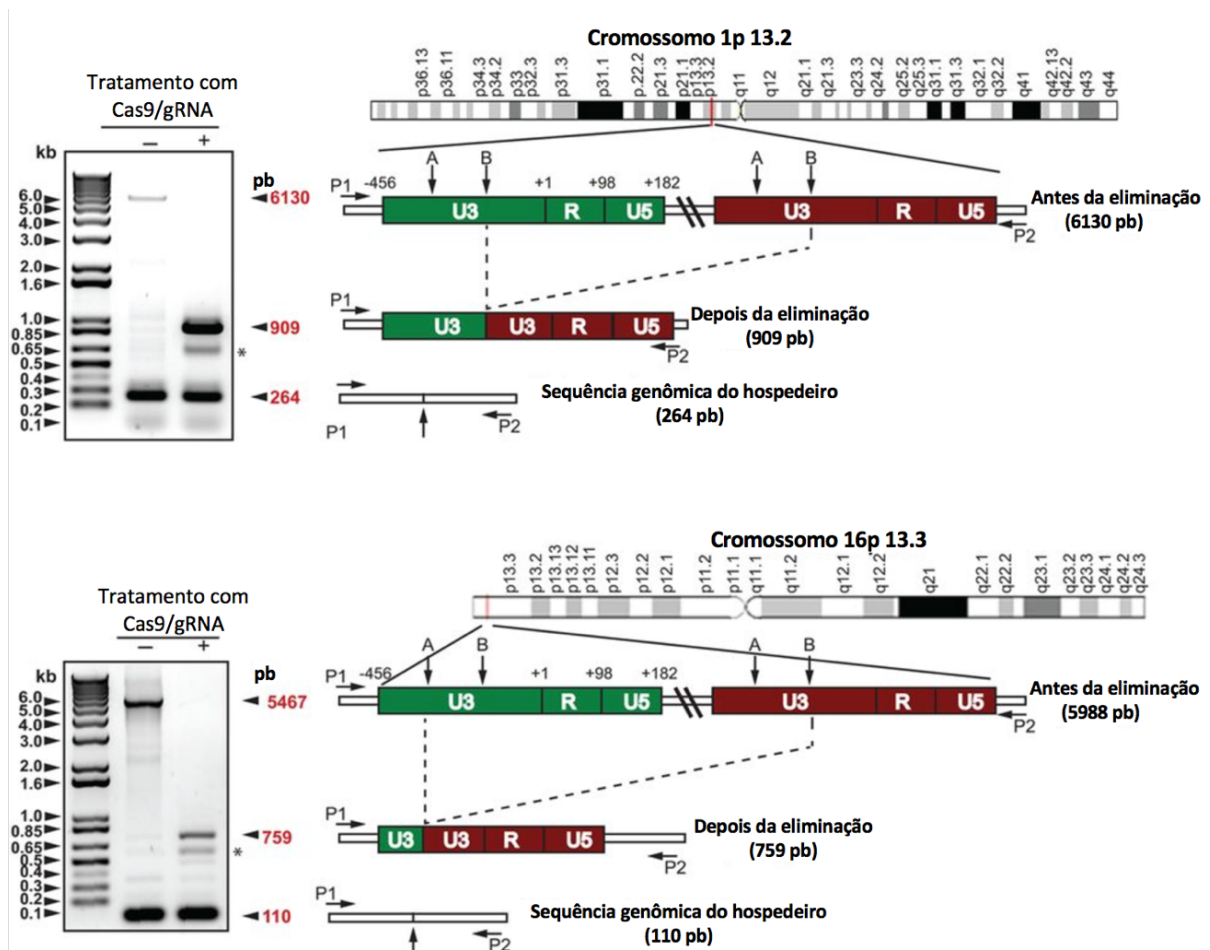
4.3.3 Método baseado em gRNA com alvo em LTR e genes virais essenciais

A integração de seu material na célula hospedeira é um passo indispensável para a continuidade do ciclo viral, sendo essa etapa regulada essencialmente pelo promotor LTR. O DNA proviral possui duas regiões LTR em cada extremidade do genoma, o que significa que, tendo LTR como alvo, o sistema CRISPR/Cas9 poderia cortar simultaneamente dois locais do material genético e remover toda extensão interna no DNA proviral integrado ao genoma hospedeiro (EBINA et al., 2013).

Ebina e colaboradores foram os primeiros a demonstrar que Cas9, juntamente com um gRNA apropriado, podem inibir a expressão do HIV-1 por meio de alvo justamente na região LTR do provírus (YIN et al., 2018). Análises mais detalhadas, feitas por esses pesquisadores, mostraram que CRISPR/Cas9 não apenas levou ao surgimento de mutações *indel* em LTR, mas também eliminou sequências entre 5' e 3' LTR; ou seja, o experimento bloqueou a expressão de pró-vírus latentes (EBINA et al., 2013).

Estudos posteriores confirmaram e chegaram aos mesmos resultados obtidos por Ebina, e aprimoraram tanto a inativação quanto remoção do DNA de HIV-1 em diferentes tipos celulares (Figura 10) (HU et al., 2014; LIAO et al., 2015; ZHU et al., 2015; KAMINSKI et al., 2016a; LEBBINK et al., 2017; YIN et al., 2018).

Figura 10 – Análise da eliminação do DNA proviral por produto de PCR



Resultados da análise de DNA por produto de PCR amplificado, utilizando *primers* específicos (P1 e P2) derivados dos genes celulares interrompidos por inserções de DNA viral. Diagramas de cada cromossomo contendo DNA de HIV-1 integrado completo antes do tratamento com CRISPR / Cas9 e a sequência residual de DNA de LTR após o tratamento com Cas9 / gRNAs são representados, com base no sequenciamento de Sanger dos principais fragmentos de DNA vistos em gel de agarose. Os asteriscos presentes em ambos painéis de PCR apontam para as bandas de DNA menores, indicando a remoção completa do DNA viral quando os alvos dentro das LTRs 5' ou 3' foram usados.

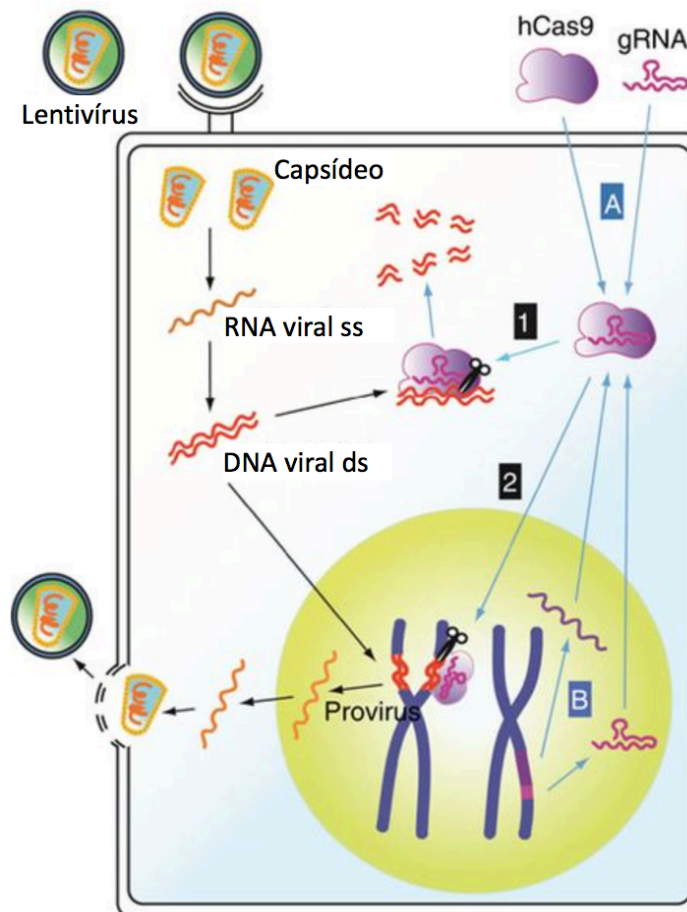
Fonte: (KAMINSKI et al., 2016a)

O sistema CRISPR/Cas9 foi testado ao longo dos anos em diferentes estudos anti-HIV aspirando a dois principais caminhos: curar células infectadas ou prevenir a infecção de células saudáveis (LIAO et al., 2015). Para o primeiro questionamento, Cas9 e gRNAs complementares à sequência alvo são inseridos em células infectadas para atacar o DNA proviral integrado. No segundo, Cas9 e gRNAs são introduzidos em

células não infectadas e espera-se que haja o ataque ao DNA viral reversamente transcrito produzido numa infecção futura, funcionando como uma forma de defesa intracelular contra a infecção viral (WANG et al., 2018).

Experimentos comparando a eficiência do sistema CRISPR/Cas9 em inativar o material pró-viral antes de sua integração ao genoma hospedeiro com a eficiência de inativação no material já integrado mostram efeitos semelhantes, independentemente do grau de integração do lentivírus (Figura 11) (LIAO et al., 2015).

Figura 11 – Interrupção da infecção lentiviral por CRISPR/Cas9



Modelo de defesa intracelular dirigida por CRISPR/Cas9 contra infecção lentiviral. A hCas9 e o seu gRNA podem ser sintetizados a partir de plasmídeos transfectados (módulo A) ou cassetes de expressão de *knockin* (módulo B). Após a síntese, uma vez que penetre nas células hospedeiras, a transcriptase reversa viral usa o genoma de RNA lentiviral como molde para a síntese do cDNA viral. A integrase viral liga-se e LTR e auxilia na inserção do cDNA viral no genoma do hospedeiro. Durante esses processos, o genoma viral está desprotegido por seu envelope e capsídeo, tornando-o vulnerável à clivagem por endonucleases de DNA.

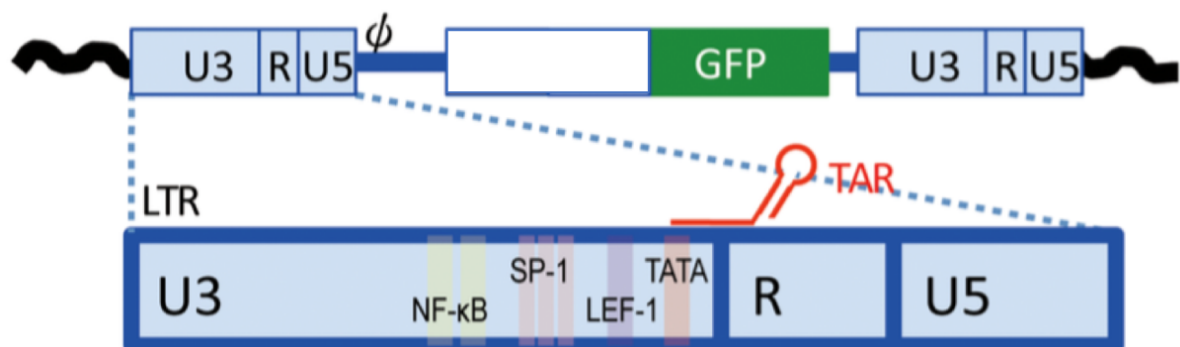
Estudos com o sistema CRISPR/Cas9 podem focar na ligação e rompimento do DNA viral na pré-integração (Etapa 1) e/ou do provírus integrado (Etapa 2).

Adaptado de: (LIAO et al., 2015)

Nos estudos com células infectadas e sem expressão de gRNAs/Cas9, as células latentes, ou seja, com o provírus integrado ao seu genoma de forma silenciosa, foram tratadas com diferentes agentes pró-inflamatórios para ativar o promotor LTR (EBINA et al., 2013; HU et al., 2014; LIAO et al., 2015; ZHU et al., 2015; KAMINSKI et al., 2016a; LEBBINK et al., 2017; YIN et al., 2018). Essa ativação faz-se necessária apenas para células com infecção latente; em modelos celulares com infecção ativa não ocorre essa etapa com uso de citocinas pró-inflamatórias (LIAO et al., 2015).

Para medir o nível de expressão viral basta que haja o monitoramento de um gene repórter inserido no DNA do HIV-1, como GFP ou EGFP (Figura 12); os níveis de expressão de GFP/EGFP eram analisados alguns dias após a transfecção por meio de citometria de fluxo (EBINA et al., 2013; HU et al., 2014; LIAO et al., 2015; ZHU et al., 2015; KAMINSKI et al., 2016a; LEBBINK et al., 2017; YIN et al., 2018).

Figura 12 – Esquema simplificado do posicionamento de LTR e GFP no material pró-viral



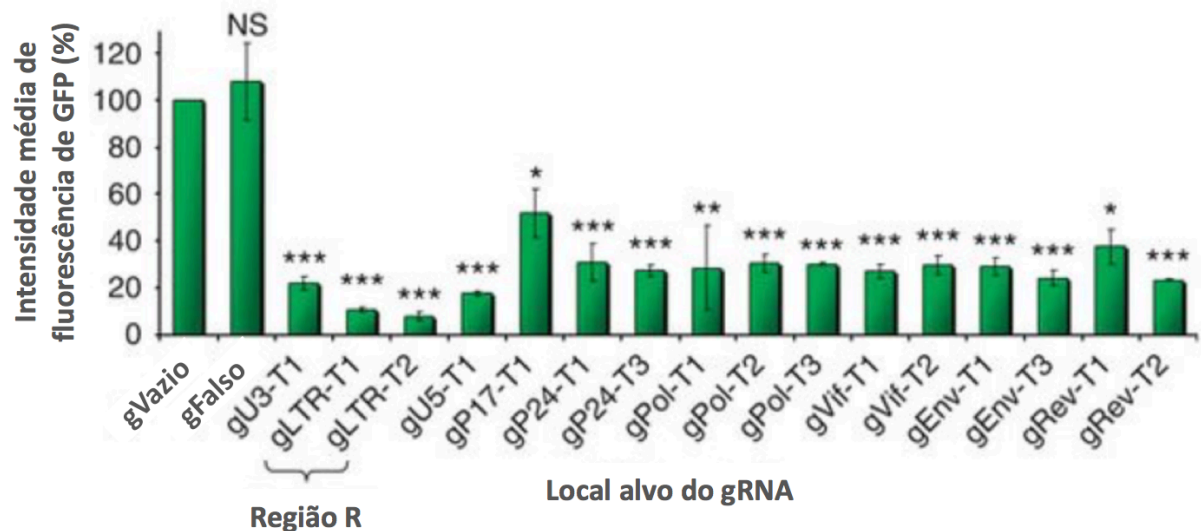
Esquema do gene repórter GFP inserido no provírus de HIV-1. Locais-alvo de CRISPR/Cas9 estão indicados na parte inferior de LTR: SP-1, TAR U5, etc.

Adaptado de (EBINA et al., 2013)

Depois, plasmídeos expressando hCas9 mais construções de gRNAs com alvo em regiões distintas de LTR, como TAR, SP-1 ou U3, ou até mesmo outros genes estruturais do HIV, mas de fundamental importância como Gag, Tat, Rev, Pol e Env foram introduzidos nas células (Figura 13) (EBINA et al., 2013; HU et al., 2014; LIAO

et al., 2015; ZHU et al., 2015; KAMINSKI et al., 2016a; LEBBINK et al., 2017; YIN et al., 2018).

Figura 13 - Análise da intensidade média de fluorescência gerada por GFP em células HEK293 infectadas por HIV-1_{NL4-3-ΔE-GFP} e transfectadas com hCas9 e gRNAs com alvo em regiões distintas do genoma viral.



Intensidade de fluorescência de GFP em células HEK293 infectadas com HIV-1NL4-3-A-GFP transfectadas com hCas9 juntamente com uma variedade de gRNAs contra o genoma do HIV. Fonte: (LIAO et al., 2015)

Sabe-se que é de extrema importância a escolha apropriada da sequência alvo, e que esta deve ser altamente conservada e com pouca variação entre os subtipos de HIV-1 (EBINA et al., 2013).

Quadro 1 – Exemplos de gRNA com alvo em diferentes regiões de HIV-1

Nome	Posição no DNA do HIV-1 _{LAI}	Sequência alvo + PAM	Orientação
gLTR1	79-101, 9211-9233	ATTGGCAGAACTACACACCAGGG	Senso
gLTR9	379-401, 9511-9533	GGCGTGGCCTGGGCGGGACTGGG	Senso
gLTR7	413-435, 9544-9566	CCCTCAGATGCTGCATATAAGCA	Anti-senso
gGag1	1389-1411	GTTAAAAGAGACCATCAATGAGG	Senso
gGag3	1480-1502	CCAAGGGGAAGTGACATAGCAGG	Anti-senso
gGag4	1827-1849	GATGACAGCATGTTCAGGGAGTGG	Senso
gGagPol	2288-2310	CCCTCAGATCACTCTTTGGCAAC	Anti-senso
gPol3	4185-4207	GCATGGGTACCAGCACACAAAGG	Senso
gTatRev	6002-6024	CCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGA	Anti-senso
gEnv2	7841-7863	GGAGCAGCAGGAAGCACTATGGG	Senso

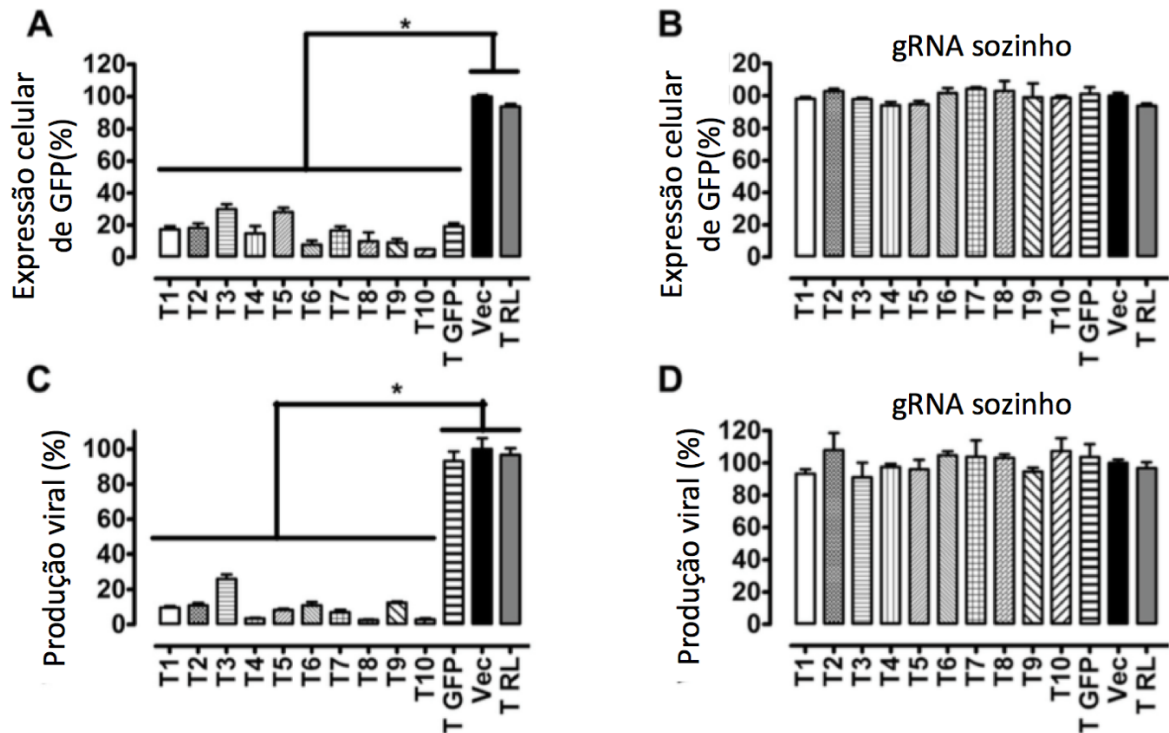
Dez gRNAs que têm como alvo a cadeia com sentido senso ou antissenso do genoma do DNA do HIV-1 (subtipo LAI) foram selecionados. Três gRNAs tiveram como alvo as sequências LTR presentes nas extremidades 5' e 3' do DNA viral, e sete gRNAs direcionados às sequências codificantes de proteínas presentes em uma única posição.

Adaptado de: (WANG G. et al., 2016b)

A expressão simultânea de Cas9 e gRNAs diminuiu o número de células GFP/EGFP-positivas em diferentes graus, indicando inibição da expressão do gene do HIV, medidos no sobrenadante de culturas celulares (Figura 14) (ZHU et al., 2015).

Foi comprovado que gRNAs e Cas9 utilizados isoladamente não exercem efeito sobre a expressão de GFP (ZHU et al., 2015; LIAO et al., 2015).

Figura 14 – Efeitos de gRNA/Cas9 e gRNA na expressão de GFP e produção viral.

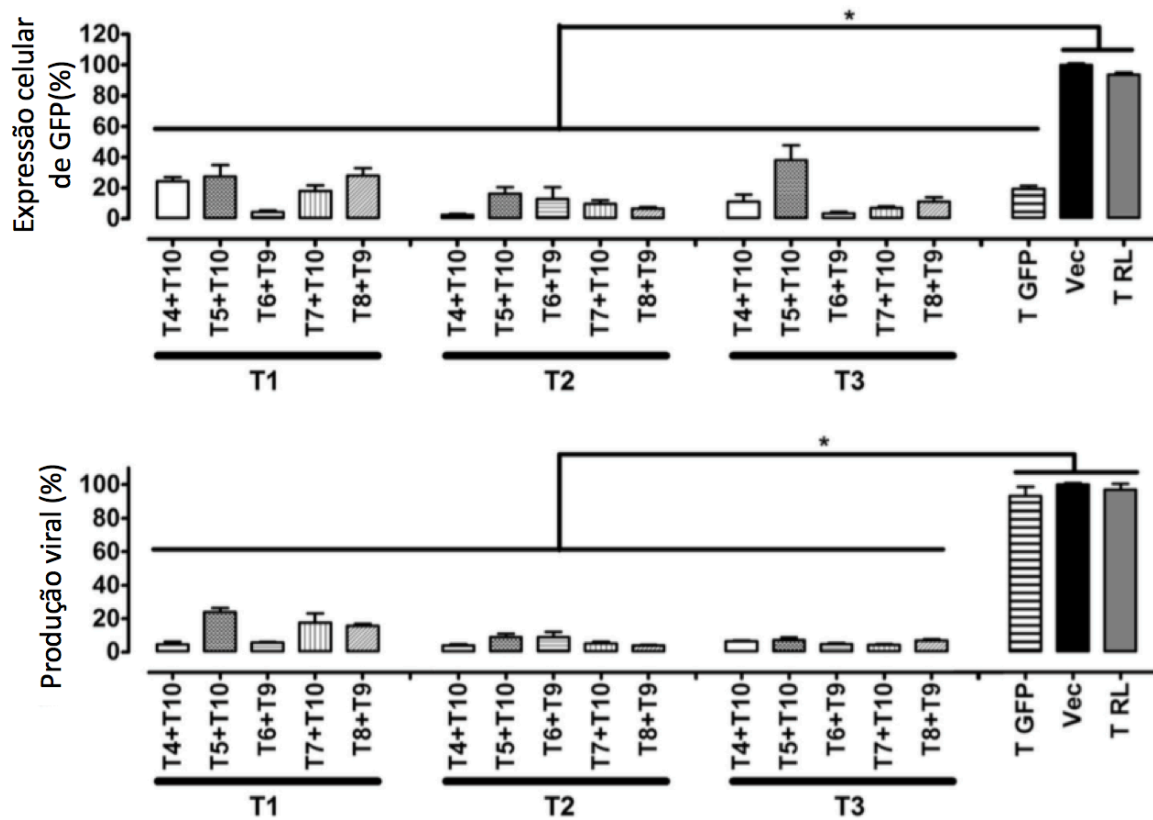


Dez gRNAs (denominados T1 a T10) foram selecionados e inseridos no vetor de clonagem de gRNA. Desses, três dos locais-alvo ficam na LTR, cinco no gene pol e dois no segundo exon de tat/rev respectivamente; gRNA com alvo em GFP DNA, denominado T GFP; gRNA com alvo em renilla luciferase, denominado T RL (GTAGCGCGGTGTATTATACC) utilizado como controle negativo e Vec correspondendo ao vetor vazio sem gRNA.

Fonte: (ZHU et al., 2015)

Depois de testar cada gRNA individualmente, alguns dos experimentos testaram seus respectivos gRNAs em combinação, a fim de aumentar o potencial de inibição e diminuir as chances de fuga/mutação do HIV-1; isso foi testado tanto para provírus integrado (Figura 15) (LIAO et al., 2015; ZHU et al, 2015) quanto para não-integrado (YIN et al., 2016; LEBBINK et al., 2017). A produção de GFP foi similar em células tanto de expressão única quanto múltipla para gRNAs, o que sugere que a expressão de um gRNA único pode resultar na clivagem da região LTR e erradicar o DNA proviral (KAMINSKI et al, 2016a).

Figura 15 – Supressão do HIV-1 por gRNAs multiplex com alvo em diferentes regiões do DNA viral.



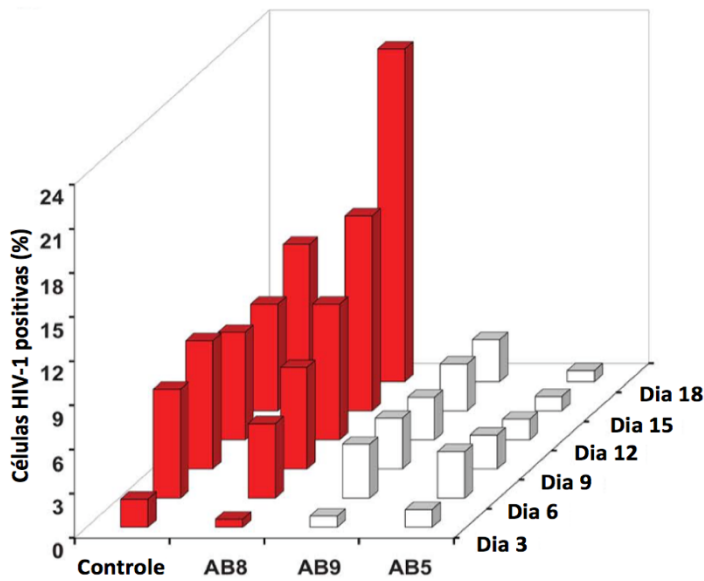
Supressão do HIV-1 por múltiplos gRNAs que visam diferentes locais de DNA do HIV-1. Os resultados apresentados são a média de três experiências de transfecção independentes.

gRNAs com alvo na sequência LTR: T1 (GACAAGATATCCTTGATCTG), T2 (GTGTGTAGTTCTGCCAATCA) e T3 (TCTAGCAGTGGCGCCCGAAC); sequência Pol: T4 (GTTGCCAAAGAGTGATCTGA), T5 (GACTTCTGGGAAGTTCAATT), T6 (GTAGGATCTGACTTAGAAAT), T7 (GGACAAGTAGACTGTAGTCC) e T8 (GTAGCAGTTCATGTAGCCAG); sequência Rev: T9 (TCTATTCCCTCGGGCCTGTGC) e T10 (GGTGGTAGCTGAAGAGGCAC).

Fonte: (ZHU et al., 2015)

Outro experimento testou a suscetibilidade das células à reinfecção: células expressando Cas9 ou gRNA separadamente foram infectadas por HIV-1 e suportaram a replicação viral durante o curso do estudo (18 dias), sendo resistentes apenas células que possuíam ambos, Cas9 e gRNA (Figura 16) (KAMINSKI et al., 2016a). Em suma, os resultados demonstram que a presença de Cas9 e gRNAs pode proteger culturas de células T humanas contra nova infecção por HIV-1 (LIAO et al., 2015; KAMINSKI et al., 2016a; LEBBINK et al., 2017).

Figura 16 – Reinfecção de diferentes clones de células T por HIV-1_{NL4-gfp}



Células HIV-1 positivas (%)				
Dias	C7	AB8	AB9	AB5
3	1.9 (± 0.71)	0.6 (± 0.21)	0.8 (± 0.07)	1.2 (± 0.42)
6	7.4 (± 1.41)	5.1 (± 0.64)	3.7 (± 0.92)	3.2 (± 0.21)
9	8.7 (± 0.28)	6.9 (± 0.42)	3.5 (± 0.64)	2.3 (± 0.14)
12	7.3 (± 0.14)	9.2 (± 0.57)	2.9 (± 0.99)	1.4 (± 1.13)
15	7.2 (± 0.11)	13.2 (± 0.30)	3.2 (± 0.14)	1.0 (± 0.20)
18	9.4 (± 0.21)	22.6 (± 1.70)	2.9 (± 0.07)	0.8 (± 0.07)

Clones celulares C7 (controle) têm expressão de Cas9 mas não de gRNA

Clones celulares AB8 possuem gRNA mas não apresentam níveis detectáveis de Cas9

Clones AB9 e AB5 possuem níveis iguais de gRNA e diferentes níveis de Cas9, com AB5 expressando um nível maior da endonuclease.

Fonte: (KAMINSKI et al., 2016a)

O sequenciamento de genoma completo de células tratadas com CRISPR/Cas9 não identificou local editado fora do alvo, além disso, foi verificada a presença de mutações *indel* e de único nucleotídeo em regiões alvo de gRNA, características que confirmam a edição por CRISPR/Cas9 (KAMINSKI et al., 2016a).

Ao avaliar uma estratégia terapêutica baseada em CRISPR/Cas9, é fundamental entender que não apenas o HIV-1 será eliminado das células infectadas de forma ativa e latente, mas a maioria das células não infectadas se tornará resistente à infecção pelo HIV. Juntos, esses dados demonstram a grande eficiência do sistema CRISPR/Cas9 na clivagem e inativação do DNA proviral de HIV-1 (ZHU et al., 2015).

Quadro 2 – Comparação de cinco estudos que eliminaram de forma eficiente HIV-1 por meio de gRNA/Cas9

	Células alvo	Gene repórter	Local alvo	Agente(s) pró-inflamatório(s)	Combinação multiplex
EBINA et al., 2013	293T e HeLa; Jurkat (como modelo de latência)	GFP	Sequência TAR da região R de LTR e sequência de ligação para NF- κ B da região U3 de LTR	TNF- α ou uma combinação de 5-Aza-dC/TSA	Não testada
HU et al., 2014	microglia linhagem CHME5	eGFP	Sequência U3 da região LTR do HIV-1	TSA	Combinação de gRNAs A/B e C/D
ZHU et al., 2015	JLat10.6	GFP	Região LTR, gene Pol e segundo éxon de Tat/ Rev	TNF- α (10 ng/ml) 16 horas antes da nucleotransfecção	T1/T6/T9, T2/T4/T10 e T3/T6/T9; todos reduziram o número de células GFP e HIV positivas e em mais de 24 vezes comparando-se com gRNA único, sendo que todas as três combinações possuem gRNAs para sequências tat/rev.
LIAO et al., 2015	HEK293 e células T (clones A2 e 10.6Jlat)	eGFP	Um alvo na região U3 e dois alvos na região R de LTR	PMA e TNF- α (apenas para células A2 e 10.6 J-lat)	Cinco diferentes combinações de dois gRNAs, sendo sempre um gRNA para a região LTR combinado com gRNA para outras regiões (locais distintos em rev, vif e U3)
KAMINSKI et al., 2016a	Jurkat 2D10	GFP	Região U3 de LTR na posição dos nucleotídeos 287-254 e 146-113	PMA e/ ou inibidor de HDAC tricotostatina A	Os dois gRNAs utilizados no estudo foram testados em combinação

4.3.4 Método com alvo em CCR5 e CXCR4

Em 1996, foi relatado que alguns indivíduos europeus seguiam livres do HIV-1 mesmo depois de auto-exposição a um evento de grande risco de infecção (LIU et al., 2017). Algum tempo depois, descobriu-se que essa resistência à infecção era devido a uma deleção natural de 32 pb no *locus* CCR5 desses indivíduos, o que torna tal co-receptor não funcional (LIU et al., 1996; DEAN et al., 1996). Os raros indivíduos que apresentam naturalmente a mutação CCR5- Δ 32 são altamente resistentes ao HIV-1 e não apresentam mudança fenotípica significativa (HOU et al., 2015).

Mais de uma década depois dessa descoberta, em 2007, o estadunidense soropositivo Timothy Ray Brown, conhecido como 'paciente de Berlim', portador de leucemia mieloide aguda, foi submetido a transplante de medula óssea. O doador tinha genótipo CCR5- Δ 32, o que também curou Timothy da infecção por HIV-1 sem necessidade de administração de TARV (HÜTTER et al., 2009; ALLERS et al., 2010). No entanto, embora esse resultado seja encorajador, é improvável que o transplante alogênico seja amplamente aplicado, pois há um número muito limitado de doadores CCR5- Δ 32 homozigotos (~ 1% da população caucasiana) (ZIMMERMAN et al., 1997) e também devido à toxicidade por rejeição alogênica (HOU et al., 2015).

A ablação de CCR5 já foi analisada, entre outros tipos celulares, em células tronco pluripotentes induzidas (KANG, 2015), células T CD4⁺ humanas (MANDAL, 2014) e células tronco hematopoiéticas e progenitoras CD34⁺ (MANDAL, 2014; XU, 2017) com sgRNA simples ou em combinação dupla. Em outro estudo, vetores adenovirais foram utilizados com diversos alvos no quarto exon do gene CCR5 em células TZM-b1: dois desses alvos foram responsáveis por reduzir em mais de 60% a expressão de CCR5, confirmado que a técnica conferiu resistência à infecção pelo HIV (LI et al., 2015).

Entretanto, estudos anteriores mostraram que 46% dos indivíduos soropositivos submetidos à TARV possuem cepas de tropismo duplo, ou seja, tanto para R5 quanto X4; além disso, 4% possuem cepa com tropismo apenas para X4 (WILKIN et al., 2007).

Vírus com tropismo por X4 raramente são transmitidos, mas se desenvolvem ao longo do tempo em um indivíduo infectado (YU et al., 2018). Como prova disso,

sabe-se que cepas X4 trópicas emergem em aproximadamente metade dos pacientes que foram inicialmente infectados apenas com cepas de tropismo para R5 (WANG et al., 2017). Seu aparecimento está associado a um prognóstico pessimista e uma progressão mais rápida da doença (YU et al., 2018).

Em 2015, um importante estudo demonstrou que o silenciamento da expressão apenas em CCR5 pode selecionar e impulsionar a troca do co-receptor do HIV-1, o que causa a entrada do vírus na célula hospedeira utilizando CXCR4 (POVEDA, 2015). Um exemplo clínico disso foi um paciente de 27 anos com infecção pelo HIV-1 e linfoma anaplásico de grandes células, que recebeu um transplante de células-tronco CCR5- Δ 32, semelhante ao paciente de Berlim. No entanto, o vírus passou a ser X4 trópico, o que indica que a edição apenas de CCR5 individualmente pode não ser suficiente (KORDELAS; VERHEYEN; ESSER, 2014).

Em contrapartida, também há na literatura, artigos descrevendo a ablação específica do co-receptor CXCR4. Em dois estudos, foram utilizadas células Ghost X4 (derivada de osteosarcoma humano expressando CXCR4), células T Jurkat (HOU et al., 2015; WANG et al., 2017) e células T CD4⁺ humanas (HOU et al., 2015), células HEK293T e TZM-bl (células derivadas de células HeLa) (WANG et al., 2017). Assim como os estudos sobre o co-receptor CCR5, os resultados da ablação de CXCR4 por CRISPR/Cas9 também confirmam a proteção de células: a expressão de CXCR4 diminuiu em aproximadamente 30%. As células modificadas apresentaram resistência à infecção por HIV e a produção de p24 foi reduzida em mais de 60%. Além disso, apresentou alta especificidade, ausência de efeitos fora do alvo e manutenção normal da divisão e propagação celular (HOU et al., 2015).

O co-receptor CXCR4 foi apontado por ter um papel crucial na manutenção da função biológica das células-tronco hematopoiéticas (PELED, 1999). Um aspecto importante na ablação do CXCR4 diz respeito a um possível prejuízo para células hematopoiéticas e na diferenciação tímica, assim como migração e direcionamento de células progenitoras. CXCR4 e seu ligante CXCL12 (SDF-1) apresentam importante atribuição na retenção destas células tronco na medula óssea; portanto, a completa eliminação de CXCR4 em ensaios clínicos pode não ser possível. No entanto, apesar de questionável, relatórios anteriores revelaram que a ablação de CXCR4 por CRISPR/Cas9 ou alguma outra técnica biomolecular não afetou a viabilidade,

proliferação ou desenvolvimento celular (HOU et al., 2015). Também foi mostrado que células T humanas deficientes em CXCR4 mantiveram sua função imunológica em camundongos (YUAN et al., 2012).

Com base em todas essas evidências, para proteger totalmente as células, uma modificação genômica simultânea de CCR5 e CXCR4 parece ser a cura mais promissora, em comparação com uma modificação individual em apenas um dos co-receptores (HOU et al., 2015; YU et al., 2018).

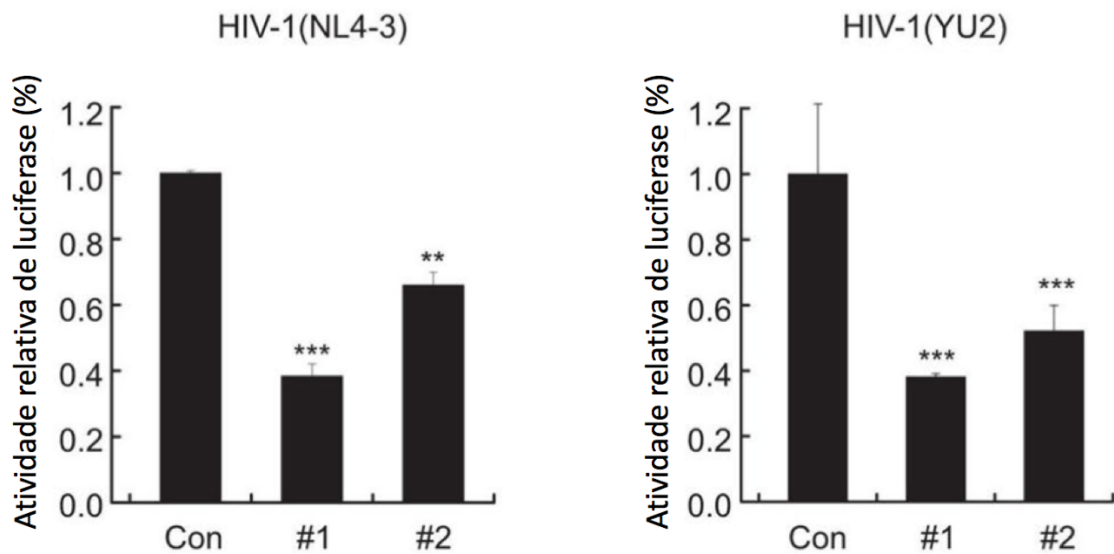
Contudo, até o momento apenas dois estudos investigaram o impacto de modificações simultâneas em CXCR4 e CCR5 utilizando-se CRISPR/Cas9: LIU e colaboradores e Yu e colaboradores verificaram que a modificação simultânea de CXCR4 e CCR5 tornou as células mais resistentes à variante de HIV-1 com tropismo duplo, em comparação com nenhuma ou uma única ablação de CXCR4 ou CCR5. Esses estudos são apoiados pelo sucesso de ensaios clínicos já existentes com outras endonucleases, como ZFN e TALEN. E até certo ponto, ambos estudos verificaram a eficácia e o potencial de CRISPR/Cas9 na edição simultânea dos co-receptores de HIV-1 com diferentes combinações de sgRNA (LIU et al., 2017; YU et al., 2018).

Diversos experimentos mostraram que a eficiência da técnica com alvo em CCR5 e CXCR4 depende do tipo celular utilizado, e que para que haja uma maior efetividade e segurança, múltiplas combinações de sgRNA de CXCR4 e CCR5 devem ser testadas (KANG et al., 2015; MANDAL et al., 2014; ZHOU et al., 2014).

LIU e colaboradores (2017) comprovaram a eficiência da técnica em diferentes tipos celulares: células TZM-bl (de origem epitelial), Jurkat T (expressando os co-receptores CXCR4 e CCR5 na superfície) e células T CD4⁺ humanas de doadores saudáveis.

Para TZM-bl, dois diferentes lentivirus (lenti-X4R5-Cas9-#1 e lenti-X4R5-Cas9-#2) foram testados, tanto para vírus X4 (HIV-1NL4-3) quanto R5 trópicos (HIV-1YU-2). Os resultados indicaram que ambos mediaram silenciamento de CXCR4 e CCR5, tornando as células TZM-bl resistentes a infecções (Figura 17).

Figura 17: Expressão de RNA viral medida pela atividade relativa da enzima luciferase, 72 horas após a infecção.

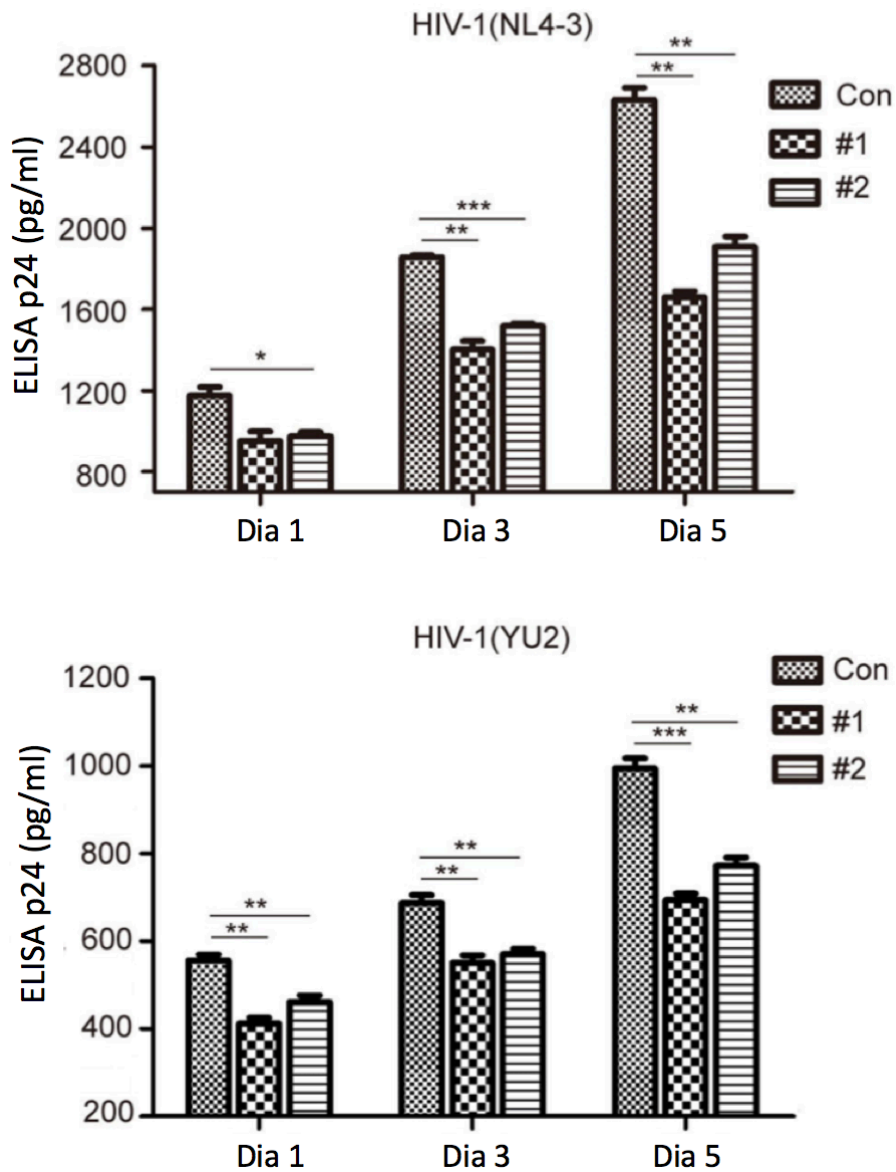


Linhagem de células TZM-bl transfectada com: Con: controle; #1: lentivírus lenti-X4R5-Cas9-#1 e #2: lentivírus lenti-X4R5-Cas9-#2 e infectadas com HIV-1NL4-3 ou HIV-1YU-2 (3 dias após a infecção).

Fonte: (LIU et al., 2017)

Também foi avaliado se o nocaute simultâneo de CXCR4 e CCR5 poderia tornar células T Jurkat resistentes à infecção pelo HIV-1. Os resultados mostraram que, em comparação com células não modificadas, as células alteradas produziram menos p24, indicando que eram mais resistentes tanto à infecção X4 quanto R5 trópica (Figura 18).

Figura 18: Níveis de p24 no sobrenadante de culturas de células T Jurkat pós-infecção por HIV-1 com tropismos diferentes



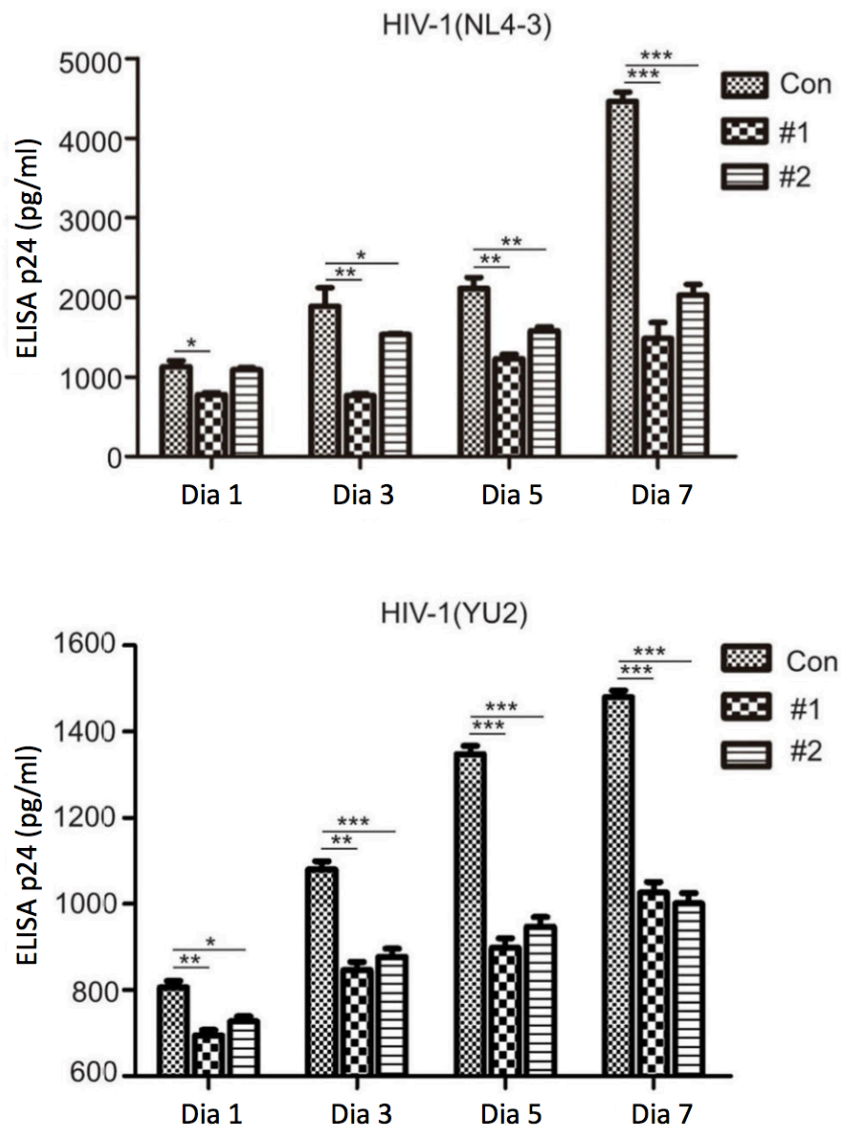
Teste de ELISA p24 do dia 1 ao dia 5 após a infecção.

Con: controle; #1: lentivírus lenti-X4R5-Cas9-#1 e #2: lentivírus lenti-X4R5-Cas9-#2.

Fonte: (LIU et al., 2017)

Por fim, testou-se se a ablação de CXCR4 e de CCR5 nas células T CD4+ primárias as protegeria da infecção pelo HIV-1. Os resultados também foram calculados indiretamente pela quantidade de p24 e, indicaram que as células modificadas estavam protegidas da infecção, tanto por cepas X4 quanto R5-trópicas, em comparação com o controle não modificado (Figura 19).

Figura 19: Níveis de p24 no sobrenadante de culturas celulares T CD4+ primárias pós-infecção por HIV-1 de tropismos diferentes



Con: controle; #1: lentivírus lenti-X4R5-Cas9-#1 e #2: lentivírus lenti-X4R5-Cas9-#2

Fonte: (LIU et al., 2017)

YU e colaboradores (2017), que também pesquisaram sobre terapia anti-HIV com alvo em ambos co-receptores, usaram tanto células GHOST CXCR4+/CCR5+ (também conhecidas como GHOST X4R5) quanto células T CD4+ para determinar se diferentes lentivírus poderiam causar perda de função em CXCR4 e/ou CCR5. Os lentivírus foram produzidos por transfecção dos diferentes plasmídeos pLenti-CAS-sgX4, pLenti-CAS-sgR5 e pLenti-CAS-sgX4R5.

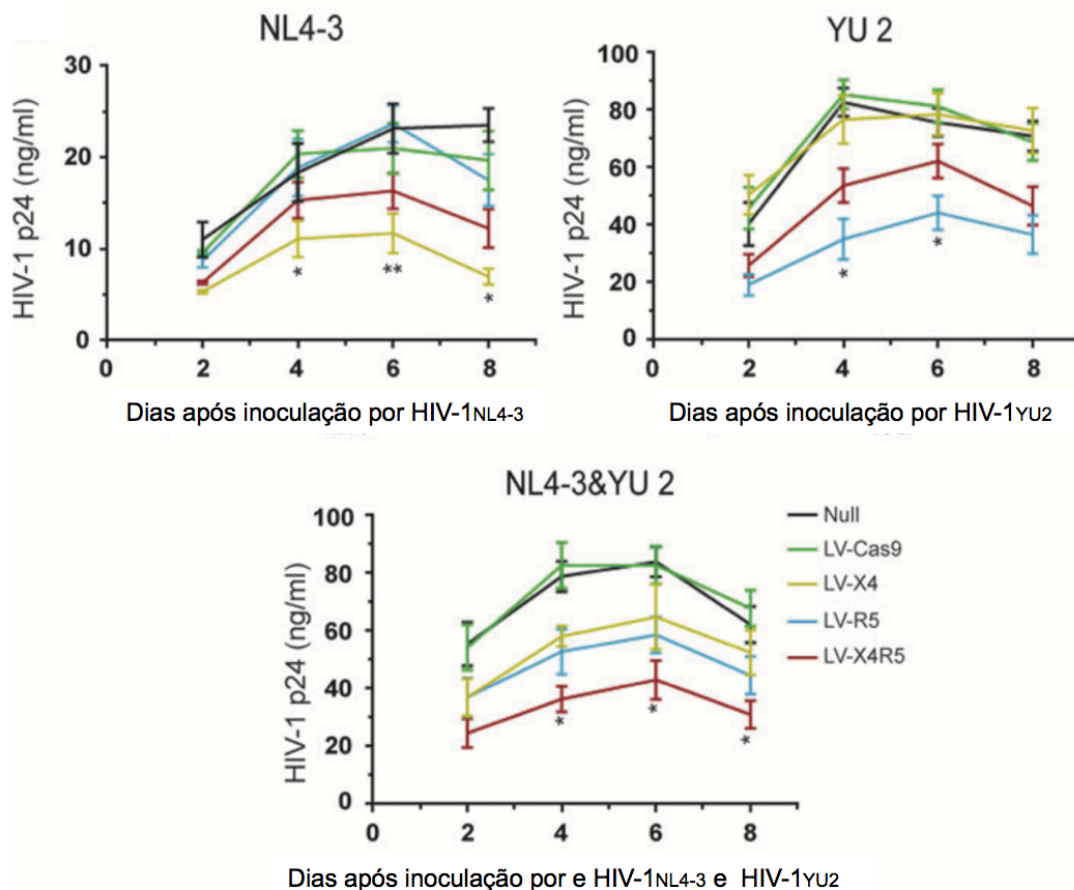
Primeiramente, células GHOST X4R5 transduzidas com LV-X4, LV-R5 e LV-X4R5, além do controle transduzido com LV-Cas ou sem nenhuma transdução, foram

infectadas com diferentes cepas de HIV-1: uma X4-trópica (HIV-1NL4-3) e outra R5 trópica (HIV-1YU2), separadamente e em conjunto.

As células que foram transduzidas com LV-X4 ou LV-R5 resistiram significativamente à infecção viral com tropismo para X4 ou R5, respectivamente; além de significativa resistência à infecção dupla (NL4-3&YU2). Células tratadas com LV-X4R5 apresentaram resistência parcial a qualquer infecção viral.

Existem diferenças significativas entre o LV-X4 e o LV-X4R5 durante o período do dia 6 ao dia 8 após a infecção pelo HIV-1NL4-3. Da mesma forma, há diferenças significativas entre o LV-R5 e o LV-X4R5 durante o período do dia 4 ao dia 6 após a infecção pelo HIV-1YU. No entanto, quando infectados com uma mistura contendo HIV-1NL4-3 e HIV-1YU 2, o tratamento com LV-X4R5 forneceu mais proteção à infecção viral do que LV-X4 ou LV-R5, especialmente durante o período do dia 4 ao dia 8 após a infecção (Figura 20).

Figura 20: Resistência de células GHOST X4R5 transduzidas com diferentes lentivírus CRISPR/Cas9 ao HIV-1 X4 e R5 tropicos

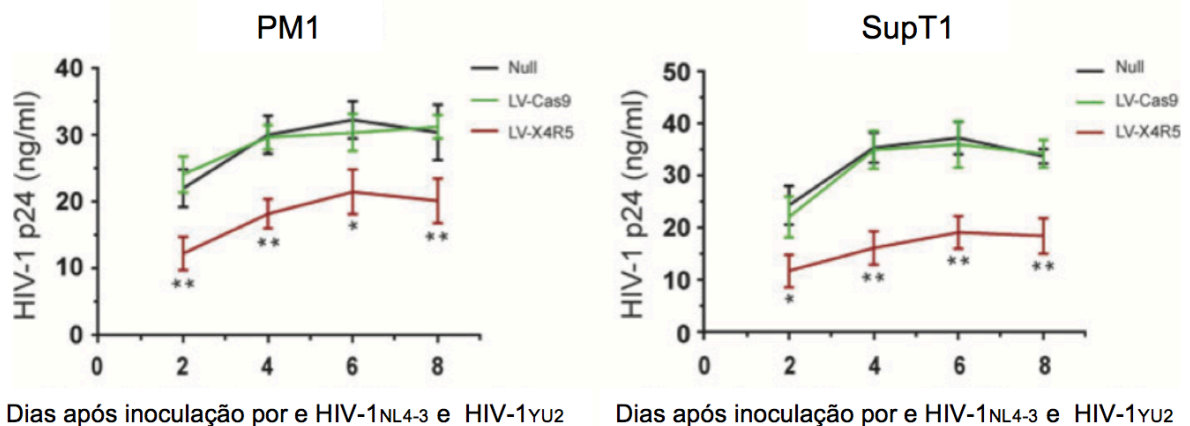


Concentração de p24 dos vírions de HIV-1 libertados no sobrenadante foi medida todos os dias por um kit de ensaio imunabsorvente ligado a enzima comercial (ELISA). Os níveis de p24 foram comparados. Diferenças estatísticas são indicadas com asteriscos.

Fonte: YU et al., 2017

Posteriormente, o mesmo ensaio foi feito para duas linhagens diferentes de células T CD4⁺ (PM1 e SupT1), porém transfectadas apenas com LV-X4R5. Tais células modificadas foram testadas com HIV-1NL4-3 e HIV-1YU2, o resultado demonstrou concentração de p24 substancialmente menor em comparação com as células não tratadas ou tratadas com LV-Cas9 do dia 2 ao dia 8, indicando que um único tratamento com LV-X4R5 pode fornecer proteção a células T CD4⁺ contra infecção X4 e R5-trópicas (Figura 21).

Figura 21: Resistência de duas diferentes linhagens de células T CD4⁺ tratadas com LV-X4R45 ao HIV-1 X4 e R5 trópicos



Sobrenadante de células foi submetido a ensaio ELISA p24 para HIV para avaliar o efeito protetor da edição genômica em células T CD4⁺. Diferenças estatísticas são indicadas com asteriscos.

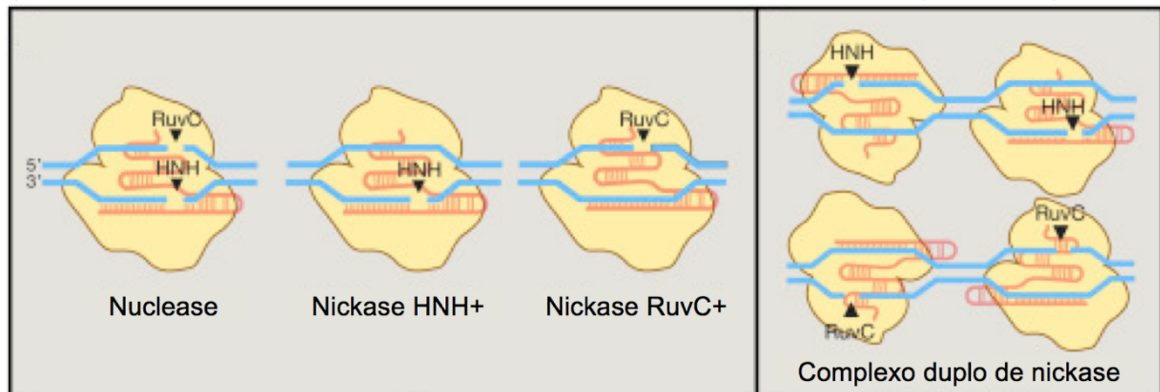
Fonte: (YU et al., 2017)

4.3.5 Outros métodos de combate ao HIV com CRISPR/Cas9

Sistemas baseados em CRISPR-Cas9 também são estudados e aplicados como ferramenta para modificação do genoma e modulação do transcriptoma, tanto das células hospedeiras quanto dos vírus invasores (WANG et al., 2018). Dentre as

opções, na condição de um dos domínios de Cas9 (HNH ou RuvC) ser inativado por meio de pequenas mutações pontuais, são originadas variantes da endonuclease com apenas um domínio catalítico ativo, conhecidas como *nickases* (JINEK et al., 2012). Essas são responsáveis por um único corte na dupla fita de DNA, induzindo reparo dirigido por homologia de alta fidelidade, o que provoca menos efeitos fora do alvo (KHALILI et al., 2015). Ainda, tentando-se o aumento na especificidade de Cas9, criou-se um complexo com duas *nickases*, em analogia aos dímeros ZFN e TALEN, o que aumenta o número de bases reconhecidas (Figura 22). Esse complexo imita o duplo corte de DNA feito por uma única nucleose, intensificando a eficiência e precisão no reparo (HSU et al., 2014).

Figura 22: Aplicações de Cas9 em uma plataforma alternativa de engenharia genômica.

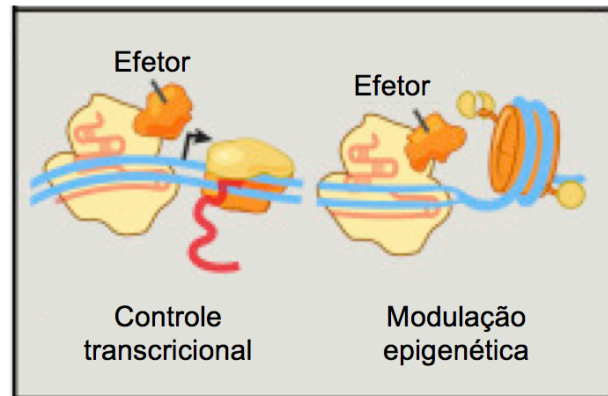


A nucleose Cas9 cliva o DNA por meio de seus domínios RuvC e HNH, cada um dos quais corta uma cadeia de DNA para gerar uma quebra de dupla fita. Cada domínio catalítico pode ser inativado individualmente para gerar mutantes, conhecidos como *nickases*, que causam quebras de DNA de fita simples. Complexos duplos de *nickases* com locais-alvo apropriadamente espaçados podem mimetizar as quebras de dupla fita direcionadas, dobrando o comprimento do reconhecimento do alvo sem sacrificar a eficiência da clivagem. Fonte: (HSU et al., 2014)

Caso ambos domínios enzimáticos de Cas9 sejam inativados, a endonuclease fica cataliticamente 'morta', conhecida como *dead Cas9* (dCas9), que pode reprimir a expressão dos genes ao se ligar ao DNA alvo, interferindo no processo de transcrição (Figura 23) (HSU et al., 2014; RAN et al., 2014). Outra possibilidade é a fusão de dCas9 com modificadores epigenéticos de ativação da expressão gênica (como VP64, VPR e SunTag) ou modificadores de supressão (como KRAB - *Kruppel-associated box*) (GILBERT et al., 2013). O acoplamento de dCas9 a um domínio ativador ou

repressor pode estimular ou silenciar de maneira robusta a expressão de múltiplos genes endógenos de forma altamente específica (SAAYMAN et al., 2016).

Figura 23: dCas9 fundidas à efetores funcionais



dCas9 pode atuar fundida com efetores funcionais, tais como ativadores de transcrição ou enzimas epigenéticas

Fonte: (HSU et al., 2014)

dCas9 acoplada a um domínio ativador pode ser utilizada como uma alternativa para eliminação de reservatórios virais pelo princípio “*shock and kill*” (também chamado de “*kick and kill*” ou “*reactivation and elimination*”), que busca reativar reservatórios latentes (choque) e eliminar as células reativadas (morte) por meio de uma intensa combinação entre TARV e a resposta imune do hospedeiro (DELAGRÈVERIE et al., 2016). Durante o estado de latência, diferentes fatores, como HDAC e outras enzimas modificadoras de cromatina, associam-se à região LTR do pró-vírus integrado, aumentando a condensação da cromatina o que previne a ligação tanto de fatores de transcrição, quanto de silenciamento ao genoma do HIV (SAAYMAN et al., 2016). Como consequência, as células produzem pouca ou nenhuma proteína viral, escapando do sistema imunológico. Porém, como já dito anteriormente, a reativação da expressão gênica viral pode evidenciar essas células hospedeiras ao sistema imune ou desencadear sua morte direta (WANG et al., 2018). Diversas drogas já foram testadas para reativação da expressão viral, como inibidores de HDAC (que abrem a estrutura da cromatina), ativadores de proteína C quinase (que estimulam a transcrição pela via do NFκB) e também citocinas pró-inflamatórias (que ativam células T) (ARCHIN et al., 2014; SHIRAKAWA et al., 2013). É nessa etapa que dCas9 pode ser empregada, pois, diferentemente dos agentes reativadores, a

ativação pela *dead* endonuclease é específica para o provírus, e não causa os efeitos colaterais generalizados (SAAYMAN et al., 2016).

Já em relação ao potencial supressor de dCas9, a endonuclease pode ser utilizada sozinha ou em conjunto com o modificador epigenético KRAB (SAAYMAN et al., 2016). Embora dCas9 e dCas9-KRAB possam ser usados para reprimir a transcrição e a replicação do HIV, sua aplicação na terapia antiviral não parece ser tão atraente, já que é necessária a ligação contínua dCas9 /dCas9-KRAB para a inibição permanente do vírus. Em contraste, a terapia antiviral baseada na clivagem pela Cas9 requer apenas atividade transitória para inativar permanentemente todos os genomas virais (WANG et al., 2018).

Existem muitos outros fatores que podem servir como candidatos potenciais em abordagens baseadas em terapia gênica contra o HIV, incluindo inibidores de fusão, charizes de genes ou variantes trans-dominantes (KIEM et., 2012). Uma outra opção refere-se aos co-fatores celulares endógenos, que incluem membros da família de proteínas APOBEC3, BST2/tetherin, TRIM5 α e SAMHD1. Identificados inicialmente em primatas, esses co-fatores atuam após a entrada do HIV para inibição da replicação de viral (HARRIS; HULTQUIST; EVANS, 2012; MALIM; BIENIASZ, 2012). Os estudos realizados com essas famílias de proteínas buscam a aplicação desses fatores no homem, já que o vírus desenvolveu mecanismos para evitar suas ações em hospedeiros humanos (MALIM; BIENIASZ, 2012). Por exemplo, vírus selvagens do tipo HIV-1 Vif inibem APOBEC3 e HIV-1 Vpu inibem tetherin no homem (BENITEZ et al., 2015).

4.3.6 Escape do HIV-1 devido à própria ação de CRISPR/Cas9

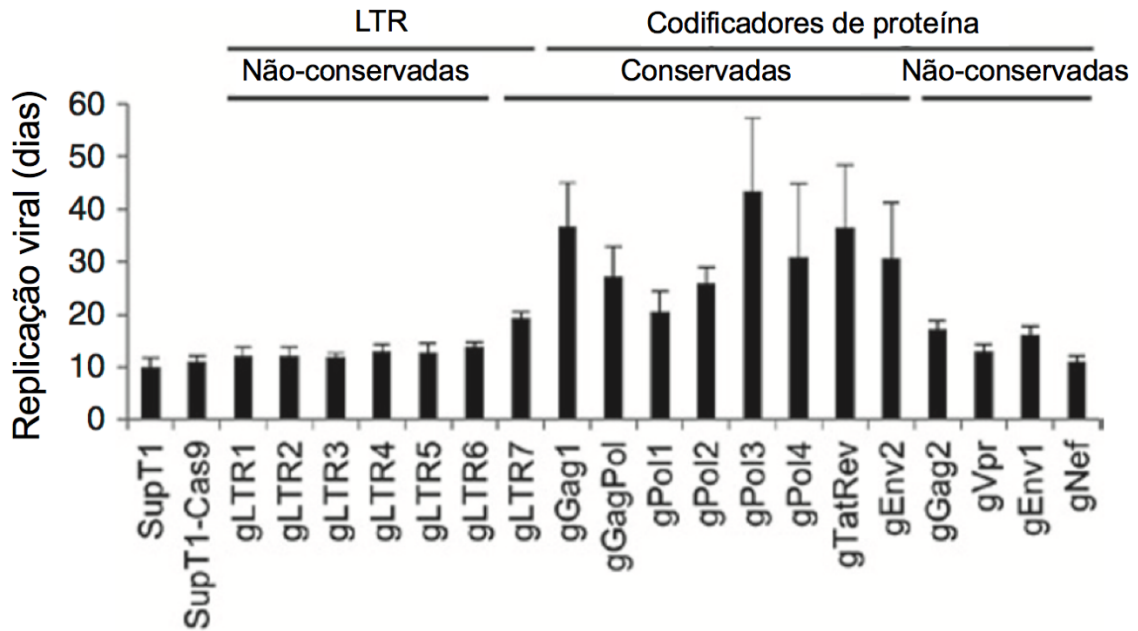
A princípio, diversos grupos evidenciaram que Cas9 e gRNAs inibem de maneira efetiva tanto a expressão quanto replicação viral em culturas celulares (WANG G. et al., 2016a). Sabe-se também que essa inibição ocorre por meio de mutações próximas ao local de clivagem de Cas9; em que células tentam reparar a quebra de dupla fita, na maioria das vezes, por meio do mecanismo já citado anteriormente, NHEJ (YU et al., 2018)

Entretanto, nesses estudos, tais culturas foram mantidas por um período de tempo relativamente curto (LEBBINK et al., 2017). Quando teve início o questionamento sobre a possibilidade de escape viral, pesquisas mostraram a capacidade do HIV-1 de fugir dessa inibição, por meio do desenvolvimento de mutações na sequência alvo de gRNA, o que leva à resistência contra o ataque de Cas9 (WANG et al., 2018); que por não mais reconhecer a sequência viral, a torna imune aos próximos ataques de CRISPR (LEBBINK et al., 2017).

Contudo, sabe-se que o período de supressão viral varia significativamente para diferentes gRNAs, e isso está intimamente relacionado com a conservação da sequência alvo do HIV: gRNAs direcionados a sequências virais fortemente conservadas impedem a replicação por um período maior que gRNAs com alvo em sequências malconservadas (LIANG et al., 2016): em regiões pouco conservadas e não essenciais mutações indel resultantes do reparo por NHEJ são geradas, o que explica o ligeiro desenvolvimento de vírus resistentes ao CRISPR/Cas9, que possuem muitas opções de escape disponíveis. Já quando o alvo se dá em regiões conservadas, que são essenciais no genoma viral, tais mutações indel são incompatíveis com a replicação do HIV e somente pequenas mutações, como substituições de nucleotídeos, resultam em um vírus resistente ao mecanismo CRISPR/Cas9; nesse caso, mutações decorrentes do reparo por NHEJ originam menos opções de fuga o que explica o atraso no escape viral (WANG et al., 2018).

Uma prova disso está em um estudo desenvolvido há dois anos atrás que utilizou o nível de p24 presente no sobrenadante de células SupT1 tratadas com Cas9 e diferentes gRNAs para avaliar o escape viral. Sequências de HIV-1 altamente conservadas mostraram um efeito mais prolongado e replicação mais tardia (20 – 43 dias) em comparação com domínios menos conservados (replicação em 11-17 dias), e acredita-se que os vírus que conseguiram se reproduzir, podem representar variantes de escape viral que não são mais suscetíveis ao sistema CRISPR/Cas9 (Figura 24) (WANG G. et al., 2016a).

Figura 24: Replicação do HIV-1 em células 293T expressando Cas9 e gRNA



A replicação do vírus foi monitorizada marcando a formação de sincícios induzidos por vírus. O dia em que foram observados sincícios maciços, o que reflete a replicação do vírus, é indicado.

Fonte: (WANG G. et al., 2016a)

Nesse caso, os gRNAs com alvo em domínios não conservados (gLTR1-6) apresentaram deleções (1-31 nt em 20 culturas) e inserções (1-3 nt em seis culturas), por outro lado, vírus resistentes (gLTR7) obtiveram substituições adquiridas (1 ou 2 nt; em três culturas) e inserções de 1 nt (em três culturas). O alvo gLTR7 inclui a sequência TATA box, o que poderia explicar porque grandes deleções não são toleradas. A ocorrência de substituições de nucleotídeo único em posições-alvo críticas confirma a especificidade da sequência de ação de Cas9/ gRNA (WANG G. et al., 2016a).

Outra alternativa está na indução proposital de mutações HDR por meio da utilização de um fragmento homólogo nas extremidades, mas com uma sequência previamente mutada da forma desejada (com eliminação de nt específicos ou códon de parada) inserida no centro, local que será complementado por pareamento de bases a partir da fita molde (ZHENG; XING; ZHANG, 2017).

De certo modo, pode parecer esperado que HIV-1 tenha a habilidade de escapar do mecanismo Cas9/ sgRNA, uma vez que já é capaz de desenvolver

resistência aos antiretrovirais, responsividade imunológica e resistir a outros tipos de mecanismos de pressão, como iRNA (WESTERHOUT, 2005). Entretanto, nessas situações, a resistência ocorre devido ao acúmulo de mutações da RT e de alguns fatores celulares, como APOBEC3G (JERM et al., 2009). No caso de Cas9/ gRNA, o próprio mecanismo é um mutagênio específico, o que proporciona uma fonte independente de mutações para resistência (WANG Z. et al., 2016).

Porém, foi comprovado que a utilização de dois gRNAs direcionados a diferentes loci do HIV inibiram a replicação viral e atrasaram o escape do vírus de maneira mais eficiente quando comparado a um único gRNA (Figura 25) (LEBBINK et al., 2017).

Figura 25: Uma abordagem combinacional de edição de genes CRISPR/ Cas9 pode impedir a replicação do HIV e prevenir a fuga viral

combinação de gRNAs	escape viral (dias)				HIV (MOI 0.006)			
	HIV (MOI 0.003)				HIV (MOI 0.006)			
RT2+MA3	23	34*	38*	-	38*	13	48*	30
RT2+PR2	-	-	-	-	38*	-	-	-
RT2+IN5	-	-	-	23	55*	30*	34*	21*
MA3+PR2	-	-	-	-	-	-	-	-
MA3+IN5	-	-	-	-	-	-	-	-
PR2+IN5	-	-	-	-	-	-	-	-

- = sem escape viral

* = usado em análise de sequenciamento do local alvo de CRISPR

Células SupT1 transduzidas com combinações de dois gRNAs. Estas células foram infectadas com um vírus repórter do HIV. As culturas foram monitorizadas diariamente durante dois meses.

Fonte: (LEBBINK et al., 2017)

Eventualmente, o escape ocorreu para a maioria das combinações, entretanto, outro estudo identificou combinações de gRNA, com alvo em Gag e sequências Tat/ Rev ou Env sobrepostas, que foram capazes de bloquear completamente a replicação viral durante o curso de 128 dias do experimento (Figura 26) (WANG G. et al., 2016b).

Figura 26: Análise de provírus de HIV-1 com Cas9 / gRNA

gRNAs	cultura	escape viral			
		dia 16	dia 41	dia 69	dia 97
gGag1 + gTatRev	1	+	-	-	-
	2	+	-	-	-
	3	+	-	-	-
	4	+	-	-	-
gGag1 + gEnv2	1	+	+	+	-
	2	+	+	-	-
	3	+	+	+	-
	4	+	+	+	-

Para o ensaio do fenótipo, as células infectadas isoladas em diferentes tempos (16-97 dias) foram misturadas com uma quantidade igual de células SupT1 não transduzidas e cultivadas durante 30 dias. A formação de sincícios nessas culturas foi monitorada para detectar o resgate de vírus competentes para replicação. + indica sincício detectável dentro do período de acompanhamento de 30 dias; - indica nenhum sincício detectável.

Fonte: (WANG G. et al., 2016b)

Também há a possibilidade de utilizar mecanismos alternativos para reduzir o nível de replicação e prevenir o escape viral, como a combinação de CRISPR/Cas9 com antirretrovirais (HERRERA-CARRILLO; BERKHOUT, 2016). Outra possibilidade a ser melhor desenvolvida é a inibição do mecanismo de NHEJ por meio de drogas anticancerígenas como SCR7, porém maiores estudos são necessários para encontrar uma concentração ideal que previna o escape viral e, ao mesmo tempo, não cause toxicidade ao paciente (MARUYAMA et al., 2015). Além disso, também pode ser utilizada uma endonuclease Cas9 modificada, conhecida como Cpf1 que, ao invés de reconhecer e quebrar o DNA 3 nt subsequentes a PAM, executa a quebra numa região mais distal, menos crítica para o reconhecimento por não ser o local de ligação do gRNA, o que pode reduzir a resistência e dificultar a fuga do vírus (YAMANO et al., 2016).

Esses resultados um tanto quando desfavoráveis sugerem a urgência de um planejamento cuidadoso e avaliações cautelosas na aplicação da técnica de CRISPR/Cas9 ao combate do HIV/ AIDS ao passo que gRNAs multiplex e diversos

locais alvo de um provírus podem ser necessários para a eliminação completa e definitiva nas células de reservatório (HUANG et al., 2017).

4.4 Estudos do uso de CRISPR/Cas9 para inativação do HIV-1 *in vivo* e aspectos éticos

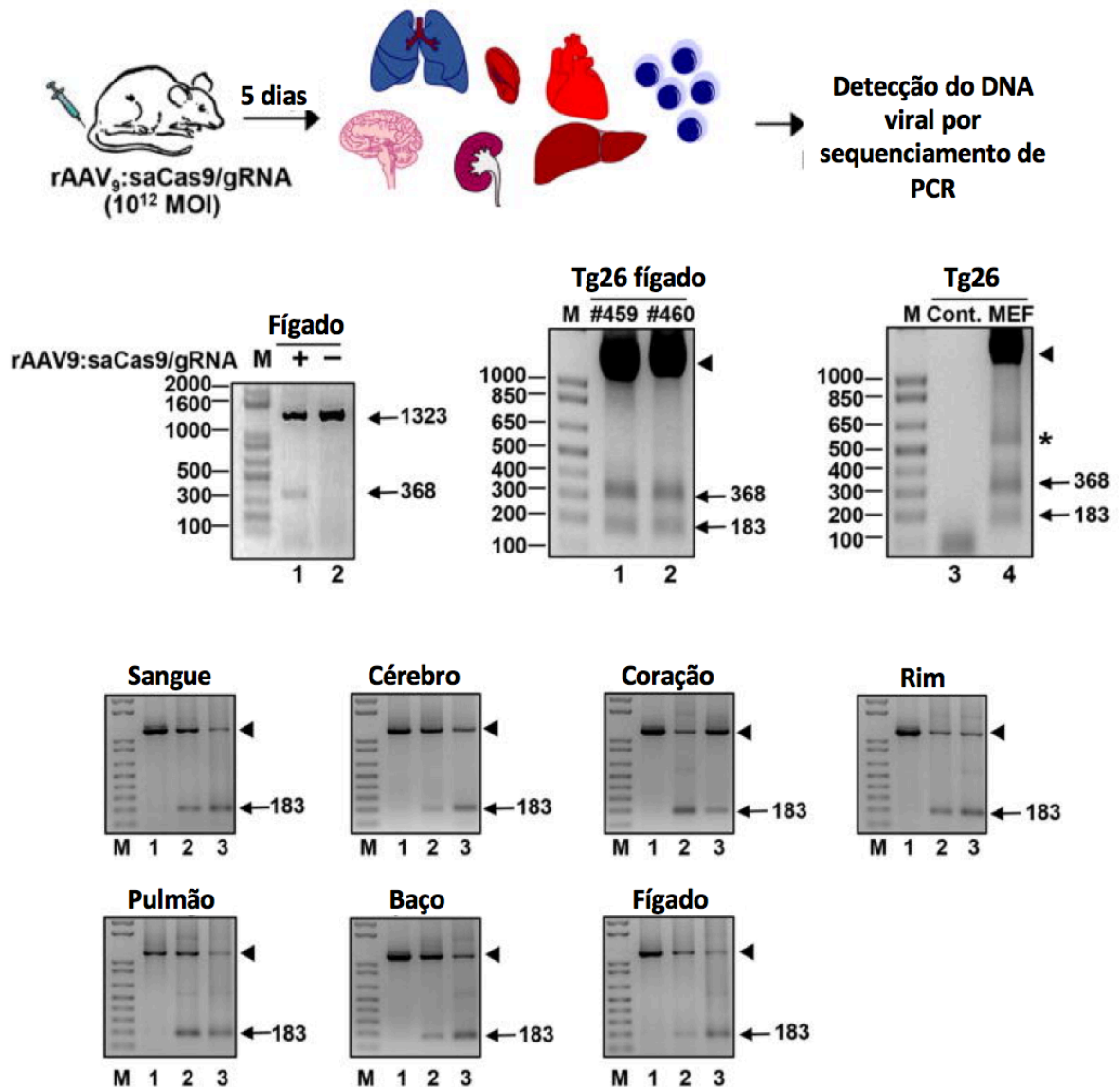
É possível observar que, nos últimos dois anos, houve um crescente interesse de instituições acadêmicas, pequenas empresas de biotecnologia e grandes empresas farmacêuticas em tecnologias específicas para edição de genoma (CORNU; MUSSOLINO; CATHOMEN, 2017). Uma das possíveis razões para isso é a perspectiva econômica que diz que o mercado de edição de genes valerá mais de US\$ 6 bilhões até 2022 (MARKETSANDMARKETS.COM).

Embora a força motriz desse rápido desenvolvimento tenha se dado pela técnica CRISPR/Cas9, há obstáculos que precisam ser eliminados para que essa plataforma chegue à clínica, como: a entrega, a atividade e a especificidade das nucleases modificadas e o estabelecimento dos processos de produção das células editadas (CORNU; MUSSOLINO; CATHOMEN, 2017).

Apesar de tais aspectos, o mecanismo de CRISPR/Cas9 já foi empregado *in vivo*: a técnica foi testada pela primeira vez em seres humanos adultos, para combater câncer de pulmão por meio do silenciamento da proteína PD-1 (CYRANOSKI, 2016).

Já com foco no combate ao HIV-1, um dos estudos com experimento *in vivo* utilizou camundongos transgênicos (Tg26). Foi utilizado um vetor viral adeno-associado, que apresenta baixa toxicidade e mantém a expressão gênica por até 12 meses após uma única administração (NALDINI, 2015). O vetor expressava saCas9 e gRNAs com alvo em LTR e Gag (rAAV:saCas9/gRNA) e foi introduzido nos animais via veia caudal. Cinco dias após esse procedimento, os animais foram eutanasiados e constatou-se ruptura do DNA de HIV-1 integrado, com eliminação de um fragmento de 940 pb entre os genes LTR e Gag, no baço, fígado, coração, pulmão, rins e linfócitos circulantes (Figura 27) (KAMINSKI et al., 2016b).

Figura 27: Excisão do DNA de HIV-1 por rAAV9:saCas9/gRNA em vários tecidos de camundongos Tg26 *in vivo*



Faixa 1: tecido de camundongo sem tratamento

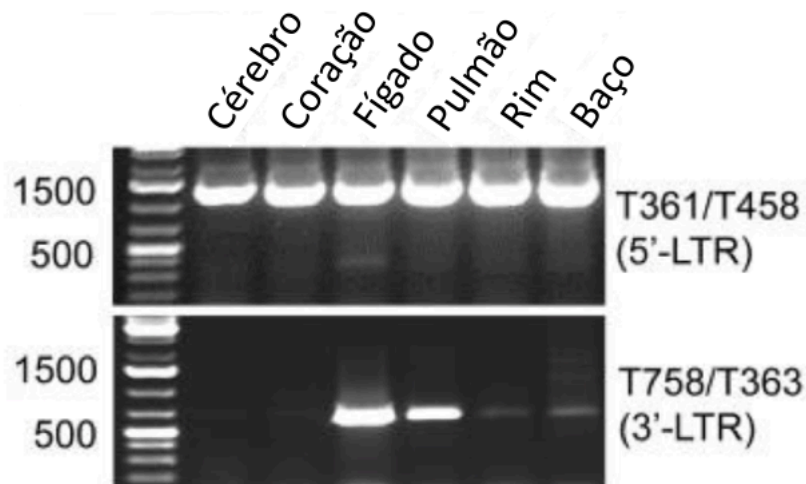
Faixa 2: tecido de camundongo tratado com rAAV9:saCas9/gRNA

Faixa 3: fibroblastos de embrião de camundongo tratados com rAAV9:saCas9/gRNA

Fonte: (KAMINSKI et al., 2016b)

YIN e colaboradores tiveram resultados semelhantes utilizando Gag/3'-LTR e Gag/5'-LTR, onde observaram deleção de fragmento no fígado, pulmão, cérebro e outros órgãos como o rim e o baço de camundongos Tg26 (Figura 28) (YIN et al., 2017).

Figura 28: Excisão de DNA pró-viral do HIV-1 levou à redução robusta na transcrição de RNA do HIV-1 na maioria dos órgãos/ tecidos de camundongos transgênicos Tg26, por meio de sgRNAs/ saCas9 AAV-DJ/8

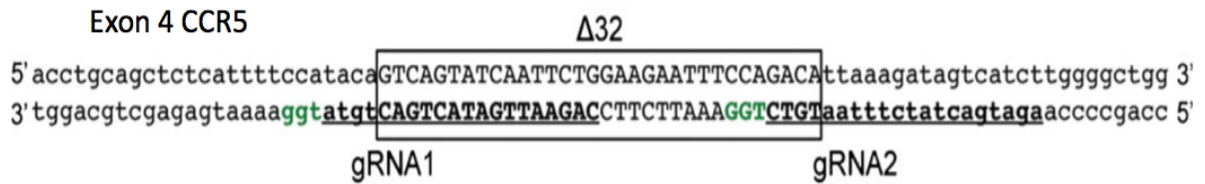


Fonte: (YIN et al., 2017)

Por fim, um grupo de pesquisadores chineses anunciou a edição de genes em embriões humanos não viáveis (triponucleares – 3PN) para torná-los resistentes à infecção por HIV (KANG et al., 2016). Foram coletados 213 óvulos fertilizados entre abril e setembro de 2014, doados por 87 pacientes. De acordo com os autores, essas células eram inviáveis para implantação em procedimento de fertilização *in vitro*, por conter um conjunto extra de cromossomos, sendo destruídos três dias após o experimento (KANG et al., 2016).

CRISPR/Cas9 foi empregado para induzir, em alguns dos embriões, uma mutação no gene CCR5 de células imunológicas. Dois gRNAs foram projetados, cada um tendo como alvo uma extremidade do limite da deleção desejada de 32 bp dentro do exon 4 de CCR5 (Figura 29) (KANG et al., 2016).

Figura 29: Esquema do locus alvo de CCR5

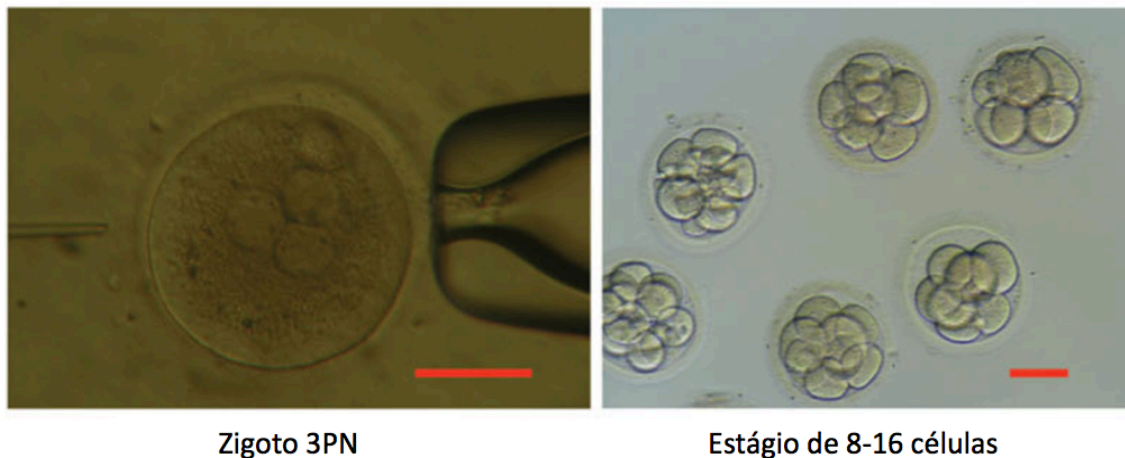


A sequência de 32 pb suprimida no alelo CCR5 $\Delta 32$ de ocorrência natural está indicada pela caixa preta. Os dois gRNAs estão em negrito e sublinhados, e suas regiões PAM estão marcadas em verde

Fonte: (KANG et al., 2016)

Cas9, mRNA e gRNA1 ou gRNA2 foram entregues nos zigotos 3PN por meio de injeção citoplasmática e foram cultivados por 3 dias, até atingirem o estágio de 8-16 células (Figura 30).

Figura 30: Injeção de um zigoto humano 3PN (painel esquerdo) e o desenvolvimento em estágio de 8–16 células *in vitro* (painel direito)



Fonte: (KANG et al., 2016)

Uma análise mais detalhada mostrou que 4 dos 26 embriões foram modificados com sucesso por meio do reparo de NHEJ. Foi observado que entre os 22 restantes, nem todos abrigavam mutação CCR5 $\Delta 32$. Alguns possuíam CCR5 sem modificações e outros adquiriram mutações diferentes da pretendida (KANG et al., 2016).

Um ano antes desse experimento, um outro grupo de pesquisadores chineses anunciou ter modificado de forma eficiente um gene ligado à doença sanguínea β -talassemia também em embriões humanos não-viáveis (LIANG et al., 2015).

Ambos estudos com embriões levantaram questões éticas entre a comunidade científica: apesar da aprovação do comitê local de ética e do consentimento dos doadores dos embriões, há um questionamento em relação à necessidade dessa prova de princípio e do uso de embriões (mesmo não viáveis), sendo visto como uma forma de 'brincar' com essas células (CALLAWAY, 2016). Além do mais, ainda não há um conhecimento sobre efeitos a longo prazo resultantes do uso da técnica *in vivo* (DAI et al., 2016).

No entanto, do ponto de vista contrário, o estudo com embriões humanos serve para analisar tecnologias, estabelecer princípios para modificações genéticas precisas e para reconhecer quaisquer obstáculos técnicos significativos, assim como, aumentar a conscientização sobre os possíveis desafios legais e éticos que a sociedade enfrentará com a crescente acessibilidade das tecnologias de engenharia do genoma (KANG et al., 2016).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da revisão bibliográfica realizada, foi possível concluir que:

- CRISPR/Cas9 é uma das principais alternativas biomoleculares de combate ao HIV-1, e pode não apenas eliminar o vírus das células infectadas de maneira latente, mas tornar as células saudáveis resistentes à infecção, e as curadas, resistentes à reinfecção. Para que ocorra sucesso no primeiro caso, gRNAs devem almejar sequências virais essenciais e altamente conservadas. Para o segundo caso, gRNAs devem ser direcionados a ambos co-receptores CCR5 e CXCR4 presentes na superfície das células do hospedeiro.

- O sistema CRISPR/Cas9 é melhor alternativa de engenharia de genoma que métodos anteriores, como Dedo de Zinco e Enzimas Efetoras de Ativação da Transcrição.

- Ainda é necessário aprimoramento do sistema carreador para entrega efetiva, eficiente, não imunogênica e de ação vitalícia, pois os métodos atuais ainda possuem falhas.

-A associação entre combinações de gRNAs (gRNA multiplex) e outras terapias disponíveis, como TARV e drogas anti-câncer, pode dificultar o escape do HIV-1, resultante de mutações causadas pela própria ação de Cas9, principalmente por meio de união de extremidade não-homóloga (NHEJ).

- Há formas alternativas para o combate ao HIV-1 com base em Cas9, que incluem, principalmente, nickases, dCas9 e modificadores epigenéticos utilizados em conjunto com dCas9.

- Finalmente, já existem experimentos com resultados positivos em camundongos, porém, testes com embriões humanos ainda levantam questionamentos éticos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia: Celular e Molecular**. 6. ed. São Paulo: Elsevier, 2008. 576 p.

ALLERS, K. et al. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 32/ 32 stem cell transplantation. *Blood*, [s.l.], v. 117, n. 10, p.2791-2799, 8 dez. 2010. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-09-309591>.

ARCHIN, Nancie M. et al. Eradicating HIV-1 infection: seeking to clear a persistent pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 12, n. 11, p.750-764, nov. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3352>.

BARRE-SINOUSI, F et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, [s.l.], v. 220, n. 4599, p.868-871, 20 maio 1983. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.6189183>.

BENITEZ, Asiel a. et al. *In Vivo* RNAi Screening Identifies MDA5 as a Significant Contributor to the Cellular Defense against Influenza A Virus. **Cell Reports**, [s.l.], v. 11, n. 11, p.1714-1726, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.032>.

BENJAMINI, Eli; COICO, Richard; SUNSHINE, Geoffrey. **Imunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 288 p.

CALLAWAY, Ewen. Second Chinese team reports gene editing in human embryos. **Nature**, [s.l.], p.1-1, 8 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature.2016.19718>.

CYRANOSKI, David. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. **Nature**, [s.l.], v. 539, n. 7630, p.479-479, 15 nov. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature.2016.20988>.

CONNOR, Ruth I. et al. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. **J Exp Med**, The Rockefeller University Press, v. 185, n. 4, p.621-628, 17 fev. 1997.

CORNU, Tatjana I; MUSSOLINO, Claudio; CATHOMEN, Toni. Refining strategies to translate genome editing to the clinic. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.415-423, abr. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4313>.

CHUN, Tae-wook et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. **Nature**, [s.l.], v. 387, n. 6629, p.183-188, maio 1997. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/387183a0>.

DAI, Wei-jing et al. CRISPR-Cas9 for in vivo Gene Therapy: Promise and Hurdles. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s.l.], v. 5, p.349-351, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mtna.2016.58>.

DEAN, M. et al. Genetic Restriction of HIV-1 Infection and Progression to AIDS by a Deletion Allele of the CKR5 Structural Gene. **Science**, [s.l.], v. 273, n. 5283, p.1856-1862, 27 set. 1996. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.273.5283.1856>.

DELAGRÈVERIE, Héloïse M. et al. Ongoing Clinical Trials of Human Immunodeficiency Virus Latency-Reversing and Immunomodulatory Agents. **Open Forum Infectious Diseases**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.189-199, out. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ofid/ofw189>.

DELTCHEVA, Elitza et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, [s.l.], v. 471, n. 7340, p.602-607, mar. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09886>.

EBINA, Hirotaka et al. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-7, 26 ago. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep02510>.

FISCHER-SMITH, Tracy et al. CNS invasion by CD14+/CD16+ peripheral blood-derived monocytes in HIV dementia: perivascular accumulation and reservoir of HIV infection. **Journal Of Neurovirology**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.528-541, jan. 2001. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1080/135502801753248114>.

FINZI, D. Identification of a Reservoir for HIV-1 in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. **Science**, [s.l.], v. 278, n. 5341, p.1295-1300, 14 nov. 1997. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.278.5341.1295>.

FONFARA, Ines et al. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 42, n. 4, p.2577-2590, 21 nov. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1074>.

GELMANN, E. et al. Proviral DNA of a retrovirus, human T-cell leukemia virus, in two patients with AIDS. **Science**, [s.l.], v. 220, n. 4599, p.862-865, 20 maio 1983. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.6601822>.

GILBERT, Luke a. et al. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. **Cell**, [s.l.], v. 154, n. 2, p.442-451, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>.

GONÇALVES, Giulliana Augusta Rangel; PAIVA, Raquel de Melo Alves. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. **Einstein (São Paulo)**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.369-375, set. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-45082017rb4024>.

HARRIS, Reuben S.; HULTQUIST, Judd F.; EVANS, David T.. The Restriction Factors of Human Immunodeficiency Virus. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 287, n. 49, p.40875-40883, 5 out. 2012. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.r112.416925>.

HERRERA-CARRILLO, Elena; BERKHOUT, Ben. Attacking HIV-1 RNA versus DNA by sequence-specific approaches: RNAi versus CRISPR-Cas. **Biochemical Society Transactions**, [s.l.], v. 44, n. 5, p.1355-1365, 15 out. 2016. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bst20160060>.

HORVATH, P.; BARRANGOU, R.. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. **Science**, [s.l.], v. 327, n. 5962, p.167-170, 7 jan. 2010. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1179555>.

HOU, Panpan et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.155-167, 20 out. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep15577>.

HOU, Z. et al. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 110, n. 39, p.15644-15649, 12 ago. 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1313587110>.

HSU, Patrick d.; LANDER, Eric s.; ZHANG, Feng. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. **Cell**, [s.l.], v. 157, n. 6, p.1262-1278, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>.

HU, Xiaotang. CRISPR/Cas9 system and its applications in human hematopoietic cells. **Blood Cells, Molecules, And Diseases**, [s.l.], v. 62, p.6-12, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmed.2016.09.003>.

HU, W. et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 111, n. 31, p.11461-11466, 21 jul. 2014. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1405186111>.

HUANG, Z et al. Current application of CRISPR/Cas9 gene-editing technique to eradication of HIV/AIDS. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 24, n. 7, p.377-384, 1 jun. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2017.35>.

HÜTTER, Gero et al. Long-Term Control of HIV by CCR5Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New England Journal Of Medicine*, [s.l.], v. 360, n. 7, p.692-698, 12 fev. 2009. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa0802905>.

HUYGHE, Jon; MAGDALENA, Sips; VANDEKERCKHOVE, Linos. Fight fire with fire: Gene therapy strategies to cure HIV. **Expert Review Of Anti-infective Therapy**, [s.l.], v. 15, n. 8, p.747-758, 14 jul. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2017.1353911>.

IMRAN, Muhammad et al. Modern biotechnology-based therapeutic approaches against HIV infection (Review). **Biomedical Reports**, [s.l.], v. 6, n. 7, p.504-507, 24 out. 2017. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/br.2017.1006>.

JANSEN, Ruud. et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 43, n. 6, p.1565-1575, mar. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>.

JERN, Patric et al. Likely Role of APOBEC3G-Mediated G-to-A Mutations in HIV-1 Evolution and Drug Resistance. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.367-379, 3 abr. 2009. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000367>.

JINEK, M. et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, [s.l.], v. 337, n. 6096, p.816-821, 28 jun. 2012. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1225829>.

KAMINSKI, Rafal et al. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. **Nature: Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-14, 4 mar. 2016a. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep22555>.

KAMINSKI, Rafal et al. Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept *in vivo* study. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 23, n. 89, p.690-695, 19 mai. 2016b. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2016.41>.

KANG, Hyunjun et al. CCR5 Disruption in Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9 Provides Selective Resistance of Immune Cells to CCR5-tropic HIV-1 Virus. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s.l.], v. 4, p.268-278, 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mtna.2015.42>.

KANG, Xiangjin et al. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. **Journal Of Assisted Reproduction And Genetics**, [s.l.], v. 33, n. 5, p.581-588, 6 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-016-0710-8>.

KHALILI, Kamel et al. Genome editing strategies: potential tools for eradicating HIV-1/AIDS. **Journal Of Neurovirology**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.310-321, 26 fev. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13365-014-0308-9>.

KIEM, Hans-peter et al. Hematopoietic-Stem-Cell-Based Gene Therapy for HIV Disease. **Cell Stem Cell**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.137-147, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2011.12.015>.

KIM, S. et al. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. **Genome Research**, [s.l.], v. 24, n. 6, p.1012-1019, 2 abr. 2014. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.171322.113>.

KINDT, Thomas J.; GOLDSBY, Richard A.; OSBORNE, Barbara A.. **Imunologia de Kuby**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 704 p.

KLANN, Tyler S; BLACK, Joshua B; A GERSBACH, Charles. CRISPR-based methods for high-throughput annotation of regulatory DNA. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 52, p.32-41, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2018.02.004>.

KORDELAS, Lambros; VERHEYEN, Jens; ESSER, Stefan. Shift of HIV Tropism in Stem-Cell Transplantation with CCR5 Delta32 Mutation. *New England Journal Of Medicine*, [s.l.], v. 371, n. 9, p.880-882, 28 ago. 2014. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). <http://dx.doi.org/10.1056/nejmc1405805>.

LANDER, Eric s.. The Heroes of CRISPR. *Cell*, [s.l.], v. 164, n. 1-2, p.18-28, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041>.

LEBBINK, Robert Jan et al. A combinational CRISPR/Cas9 gene-editing approach can halt HIV replication and prevent viral escape. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 7, p.41968-41978, 8 fev. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep41968>.

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*, [s.l.], v. 96, n. 8, p.2381-2393, 1 ago. 2015. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.000139>.

LIANG, Chen et al. CRISPR/Cas9: a double-edged sword when used to combat HIV infection. *Retrovirology*, [s.l.], v. 13, n. 1, p.37-41, 27 maio 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12977-016-0270-0>.

LIANG, Puping et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein & Cell*, [s.l.], v. 6, n. 5, p.363-372, 18 abr. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13238-015-0153-5>.

LIAO, Hsin-kai et al. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nature Communications*, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-10, 10 mar. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7413>.

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.], v. 7, n. 1, p.47-62, 9 set. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13578-017-0174-2>.

LIU, Rong et al. Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. *Cell*, [s.l.], v. 86, n. 3, p.367-377, ago. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80110-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80110-5).

MAGGIO, Ignazio et al. Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cells. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.105-116, 29 maio 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep05105>.

MALI, P. et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. **Science**, [s.l.], v. 339, n. 6121, p.823-826, 3 jan. 2013. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1232033>.

MALIM, M. H.; BIENIASZ, P. D.. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.137-147, 7 fev. 2012. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006940>.

MANDAL, Pankaj k. et al. Efficient Ablation of Genes in Human Hematopoietic Stem and Effector Cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell*, [s.l.], v. 15, n. 5, p.643-652, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.004>.

MARKETSANDMARKETS.COM. **Genome Editing/Genome Engineering Market by Technology (CRISPR, TALEN, ZFN), Application (Cell Line Engineering, Animal Genetic Engineering, Plant Genetic Engineering), End User (Biotechnology & Pharmaceutical Companies, CROs) - Global Forecast 2022**. 2017. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/genome-editing-engineering-market-231037000.html>>. Acesso em: 11 ago. 2018.

MARUYAMA, Takeshi et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 33, n. 5, p.538-542, 23 mar. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3190>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico HIV/Aids 2017**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do Hiv/aids e das Hepatites Virais, 2017. 64 p.

MOJICA, Francisco J.m. et al. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. **Journal Of Molecular Evolution**, [s.l.], v. 60, n. 2, p.174-182, fev. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>.

MONTAGNIER, L et al. Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines. **Science**, [s.l.], v. 225, n. 4657, p.63-66, 6 jul. 1984. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.6328661>.

MORENO-MATEOS, Miguel et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting *in vivo*. **Nature Methods**, [s.l.], v. 12, n. 10, p.982-988, 31 ago. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3543>.

NALDINI, Luigi. Gene therapy returns to centre stage. **Nature**, [s.l.], v. 526, n. 7573, p.351-360, out. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature15818>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **HIV/AIDS**: Fact sheet, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>>. Acesso em: 4 mar. 2018.

PELED, A.. Dependence of Human Stem Cell Engraftment and Repopulation of NOD/SCID Mice on CXCR4. **Science**, [s.l.], v. 283, n. 5403, p.845-848, 5 fev. 1999. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.283.5403.845>.

POVEDA, Eva. HIV Tropism Shift: New Paradigm on Cell Therapy Strategies for HIV Cure. **Aids Reviews**, Espanha, v. 1, n. 17, p.65-67, jan. 2015.

RAN, F. Ann et al. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. **Cell**, [s.l.], v. 154, n. 6, p.1380-1389, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>.

RAN, F. Ann et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 8, n. 11, p.2281-2308, 24 out. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.

RICHTER, Corinna; CHANG, James T.; FINERAN, Peter C.. Function and Regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR Associated (Cas) Systems. **Viruses**, [s.l.], v. 4, n. 12, p.2291-2311, 19 out. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v4102291>.

ROITT, Ivan M.; DELVES, Peter J.; MARTIN, Seamus J.; BURTON, Dennis R. **Roitt fundamentos de imunologia**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 552 p. -- ISBN 978-85-277-2142-4.

SAAYMAN, Sheena M. et al. The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. **Expert Opinion On Biological Therapy**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.819-830, 12 abr. 2015. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.2015.1036736>.

SAAYMAN, Sheena M. et al. Potent and Targeted Activation of Latent HIV-1 Using the CRISPR/dCas9 Activator Complex. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.488-498, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2015.202>.

SHAN, Liang et al. Stimulation of HIV-1-Specific Cytolytic T Lymphocytes Facilitates Elimination of Latent Viral Reservoir after Virus Reactivation. **Immunity**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.491-501, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.014>.

SHIRAKAWA, Kotaro et al. Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.277-285, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.02.005>.

SHUI, Bing et al. The Rise of CRISPR/Cas for Genome Editing in Stem Cells. **Stem Cells International**, [s.l.], v. 2016, p.1-17, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8140168>.

SMITH, Phillip D. et al. Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir. **Journal Of Leukocyte Biology**, [s.l.], v. 74, n. 5, p.642-649, nov. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0503219>.

SILICIANO, Janet D et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.727-728, 18 maio 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm880>.

VAN LINT, Carine; BOUCHAT, Sophie; MARCELLO, Alessandro. HIV-1 transcription and latency: an update. **Retrovirology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.67-79, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-10-67>.

WANG, Gang et al. A Combinatorial CRISPR-Cas9 Attack on HIV-1 DNA Extinguishes All Infectious Provirus in Infected T Cell Cultures. **Cell Reports**, [s.l.], v. 17, n. 11, p.2819-2826, dez. 2016b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.057>.

WANG, Gang et al. CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. **Virus Research**, [s.l.], v. 244, p.321-332, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.020>.

WANG, Gang et al. CRISPR-Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.522-526, mar. 2016a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2016.24>.

WANG, Qiankun et al. Genome modification of CXCR4 by Staphylococcus aureus Cas9 renders cells resistance to HIV-1 infection. **Retrovirology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.51-63, 15 nov. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12977-017-0375-0>.

WANG, Zhen et al. CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. **Cell Reports**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.481-489, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.042>.

WESTERHOUT, E. M.. HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.796-804, 19 jan. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki220>.

WILKIN, T. J. et al. HIV Type 1 Chemokine Coreceptor Use among Antiretroviral-Experienced Patients Screened for a Clinical Trial of a CCR5 Inhibitor: AIDS Clinical Trial Group A5211. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.591-595, 15 fev. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/511035>.

YAMANO, Takashi et al. Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA. **Cell**, [s.l.], v. 165, n. 4, p.949-962, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.003>.

YE, Lin et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 111, n. 26, p.9591-9596, 9 jun. 2014. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1407473111>.

YIN, Chaoran et al. *In Vivo* Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.1168-1186, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.012>.

YIN, Lijuan et al. CRISPR/Cas9 Inhibits Multiple Steps of HIV-1 Infection. **Human Gene Therapy**, [s.l.], p.1-40, maio 2018. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2018.018>.

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.], v. 29, n. 1, p.51-67, jan. 2018. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2017.032>.

YUAN, Jinyun et al. Zinc-finger Nuclease Editing of Human cxcr4 Promotes HIV-1 CD4+ T Cell Resistance and Enrichment. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.849-859, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2011.310>.

ZHANG, Yonggang et al. CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.16277-16291, 5 nov. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep16277>.

ZHENG, Xiang; XING, Xin-hui; ZHANG, Chong. Targeted mutagenesis: A sniper-like diversity generator in microbial engineering. **Synthetic And Systems Biotechnology**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.75-86, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.synbio.2017.07.001>.

ZHOU, Jiankui et al. Dual sgRNAs facilitate CRISPR/Cas9-mediated mouse genome targeting. **Febs Journal**, [s.l.], v. 281, n. 7, p.1717-1725, 26 fev. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.12735>.

ZHU, Weijun et al. The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. **Retrovirology**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.22-29, 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12977-015-0150-z>.

ZIMMERMAN, P. A. et al. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. **Molecular Medicine**, Xxx, v. 3, n. 1, p.23-36, jan. 1997.