

APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA DO SISTEMA CRISPR Cas-9 NO TRATAMENTO DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

Lúcia Helena Martins da Silva¹

Nathalia Félix da Silva²

Leonardo de Figueiredo Vilela³

Resumo

CRISPR sigla que se refere ao Conjunto de Repetições Palindrômicas Regularmente Espaçadas, é composto por sequências do DNA de bactérias, herdadas de vírus predadores e permite a elas reconhecer e se defender de novos ataques. Este sistema é capaz de silenciar os genes do vírus invasor e impedir sua replicação. Uma enzima presente no sistema de defesa das bactérias chamada Cas9, é eficiente em fazer alterações precisas no DNA, portanto trata-se de uma ferramenta hábil na edição genética. Um dos aspectos de maior destaque dessa metodologia tem sido seu potencial de cura para a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids), doença provocada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). O sistema tem a capacidade de promover a eliminação do vírus tanto durante a fase de infecção aguda quanto no estágio de latência. Um grande avanço dessa abordagem é a possibilidade de remoção do genoma viral em células que atuam como reservatórios latentes do vírus, isto é, em células em que o vírus HIV permanece 'silenciado' no genoma humano, sem se manifestar e fora do alcance de terapias antirretrovirais. Sendo assim, pode representar um passo que substitui o uso de coquetéis antirretrovirais e se aproxima da cura permanente da AIDS. O presente trabalho buscar por meio de revisões bibliográficas analisar o potencial da utilização do sistema CRISPR/CAS9 na edição de genes contendo o vírus HIV, bem como suas limitações e riscos.

Palavras-Chaves: HIV. Tratamento. Tecnologia. CRISPR/CAS9.

APPLICATION OF CRISPR Cas-9 SYSTEM TECHNOLOGY IN THE TREATMENT OF THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS

¹Graduada em Biomedicina pelo UGB/FERP.

²Graduada em Biomedicina pelo UGB/FERP.

³Doutor em Bioquímica pela UFRJ.

Abstract:

CRISPR is an acronym that stands for a set regularly spaced palindromic repetitions, made of sequences of DNA of inherited bacteria or predatory viruses that allows them to defend themselves from novel attacks. This system has the ability to switch off genes in the invading pathogen and stop it from replicating. An enzyme called Cas9 present in the system defends from bacteria and is efficient in making precise changes to DNA, therefore it is an effective tool for genetic editing. One of the most promising aspects of this method is its potential to treat and cure AIDS (Acquired Immune Deficiency Virus), the disease caused by HIV (Human Immunodeficiency Virus). The system has the ability to promote the elimination of the virus both during the infection phase, and during the non-latency period. A big advance in this method is the possibility of getting rid of the viral genome in cells that act as later reservoirs for the virus, that is, in cells that the HIV virus remains deactivated in the human genome without manifesting, and beyond the reach of antiretroviral therapies. To summarize, it can represent a step that replaces the use of antiretroviral cocktails and makes headway towards the permanent cure of AIDS. This current work attempts to search through bibliographic reviews to analyze the potential of using this CRISPR/Cas9 system in the editing of genes that carry the HIV virus, as well as its drawbacks and risks.

Keywords: HIV. Treatment. Technology. CRISPR/Cas9.

Introdução

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (2017), HIV é a sigla em inglês que se refere ao vírus da imunodeficiência humana, que tem como alvo o sistema imunológico e enfraquece os sistemas de defesa das pessoas contra infecções e alguns tipos de câncer. A função imunológica é medida pela contagem de células CD4. A imunodeficiência resulta em um aumento da suscetibilidade a várias infecções e doenças que um sistema imune saudável pode combater.

De acordo com o UNAIDS (2019), mais de 32 milhões de pessoas morreram de doenças relacionadas à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), desde o início da epidemia até o fim de 2018, estima-se que mais de 36,7 milhões de pessoas

em todo o mundo estão infectadas com o vírus da imunodeficiência humana tipo um (HIV-1) e 5.000 pessoas em todo o mundo são infectadas a cada dia.

Durante a evolução da epidemia da AIDS, diante de suas proporções foram necessárias a implantação de políticas públicas e a reorganização dos serviços assistenciais implicando nos cuidados de saúde em especial no que se refere ao tratamento. A eficácia dessa reorganização delimitou a característica atual da AIDS ser considerada uma doença crônica gerenciável, embora não forneça uma cura se tornando necessário, em decorrência disso, a utilização permanente de medicações antirretrovirais (LANGENDORF *et al.*, 2016).

Segundo Dash *et al.* (2019) a terapia anti-retroviral (TARV) restringe a infecção viral ao interromper várias etapas do ciclo de vida viral. No entanto, a TARV não consegue eliminar as cópias integradas do DNA proviral do HIV-1 do genoma do hospedeiro. Como tal, o vírus persiste em um estado latente dentro de reservatórios infecciosos; e a interrupção do TARV leva prontamente à reativação viral e progressão da doença para a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

Os inúmeros efeitos colaterais dos medicamentos, que variam de alterações metabólicas e neurológicas a desordens psiquiátricas (SILVA *et al.*, 2009), além de dificuldades relacionadas aos fatores sociais, como o estigma (UNAIDS, 2020), o que dificulta a adesão ao tratamento, podendo provocar falha na terapia medicamentosa e controle da doença, diminuindo a qualidade de vida das pessoas que vivem com HIV causando-lhes sofrimento.

O sistema de edição de genoma desenvolvido recentemente, chamado CRISPR/Cas9, também conhecido como tesoura genética, corta e introduz mudanças em determinados locais do genoma, é o mecanismo imunológico adaptativo que muitas células apresentam, capaz de detectar o DNA viral e destruí-lo rapidamente, desativar o DNA latente integrado do HIV-1 e pode servir como uma via para a cura (ZHU *et al.*, 2015).

Uma das ferramentas desse sistema é uma proteína, a Cas9, que tem a capacidade de localizar, clivar e degradar o DNA do vírus de forma específica. Com base nesse mecanismo os cientistas descobriram que há a possibilidade de usar a

Cas9 como tecnologia da engenharia genética, para apagar ou inserir genes específicos do DNA humano (DIAS; DIAS, 2018, p.8).

A técnica é um avanço no combate a AIDS, visto que o experimento possibilita que seja feita apenas uma intervenção genética para acabar com a reprodução das células infectadas, enquanto os métodos já conhecidos, como os tratamentos com coquetéis antirretrovirais, trazem muitas vezes efeitos colaterais e precisam ser utilizados regularmente, durante vários anos (NETO *et al*, 2017).

Essa nova ferramenta de edição genética proporciona uma oportunidade única para realizar a aplicação da mesma em terapia de células humanas, sendo possível fazer a correção de defeitos em células progenitoras, doenças genéticas e vários outros tratamentos, esse sistema tem se mostrado bastante eficaz na eliminação dos vírus de células infectadas (CAETANO *et al.*, 2018).

O interesse pelo estudo sobre o sistema CRISPR/Cas9 tem aumentado, levando em conta vantagens que a técnica oferece, como a alta versatilidade, eficácia, especificidade e a facilidade de uso da técnica, que representa um passo importante no que concerne a eliminação do HIV das células hospedeiras, representando uma nova visão de futuro para tratamento dessa doença (KAMISNKI *et.al*, 2016).

Testes foram realizados em culturas de células T CD4+, que são as que abrigam o vírus, a fim de observar a eficácia do CRISPR-Cas/9 na remoção do HIV dessas células. Através de um Lentivírus, o CRISPR foi carregado e com isso, conseguiu diminuir a replicação do vírus em culturas primárias de células T CD4+ infectadas, reduzindo consideravelmente em *ex vivo*, a carga viral das células dos pacientes infectados (KAMISNKI *et.al*, 2016).

Com isso, o uso da ferramenta de edição genética tem de fato um grande potencial para não somente curar o HIV, mas como outras doenças, o futuro das terapias para erradicar o vírus HIV-1 está caminhando para uma resolução a partir da tecnologia do CRISPR/Cas9, ou seja, utilizando esse mecanismo para evitar a proliferação do vírus do HIV nas células, as pesquisas ainda estão em testes animais, porém com ótimos resultados (BATISTA; NUNES, 2019).

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo geral demonstrar por meio de revisão de literatura a aplicação da tecnologia do Sistema CRISPR CAS/9 no tratamento do vírus da Imunodeficiência Humana e como objetivos específicos conceituar CRISPR CAS/9, compreender os mecanismos de ação do HIV e elucidar a utilização da técnica CRISPR no tratamento do HIV.

Metodologia

Para a produção do artigo foi realizada uma revisão de literatura de caráter descritivo e exploratório, a respeito do tema tecnologia CRISPR/ Cas9 aplicada a combater a infecção por HIV.

A pesquisa foi realizada por meio de livros didáticos, artigos científicos, dissertações, livros, entre outros, as bases de dados utilizadas foram: Scientific Electronic Library Online (SCIELO), PUBMED e Google Acadêmico nos idiomas inglês, português e espanhol.

Foram incluídos artigos e periódicos que evidenciaram o assunto para o estudo de revisão, considerando o objetivo proposto no trabalho e como critério de exclusão os artigos que não abordassem o assunto proposto e publicações de caráter não científico.

Na pesquisa foram utilizadas 51 referências utilizando dados qualitativos e quantitativos para embasamento da pesquisa que foi realizada durante o período de março a novembro de 2020.

Vírus da imunodeficiência humana

A história da infecção pelo HIV é marcada por dois períodos – antes e após 1996. No primeiro período, o que se buscava, desde a descoberta da infecção em 1981, era o diagnóstico precoce e o tratamento das doenças oportunistas. Após 1996,

com a introdução da terapêutica anti-retroviral combinada (HAART – Highly Active Antiretroviral Therapy), foram obtidos ganhos significativos no combate à infecção, com aumento da sobrevivência e melhora da qualidade de vida dos infectados (HAJJAR *et al.*, 2005).

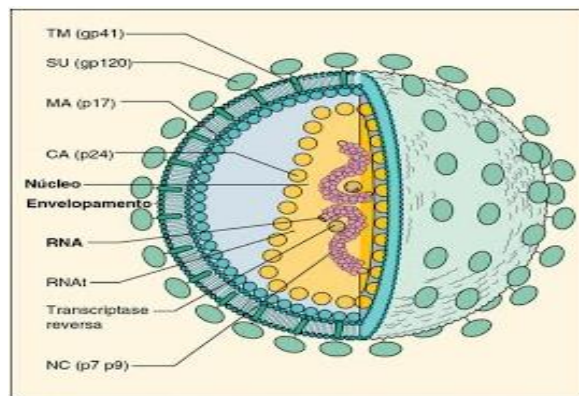
O vírus da imunodeficiência humana (HIV), pertencente à família Retroviridae, gênero *Lentivirus*, produz a base patológica da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) que permanece como um problema de saúde mundial de dimensões sem precedentes (FERREIRA; RIFFE; SANTANA, 2010).

A contaminação se dá somente no sangue, esperma, secreção vaginal e leite materno o vírus do HIV aparece em quantidade suficiente para causar a moléstia. Para haver a transmissão, o líquido contaminado de uma pessoa tem que penetrar no organismo de outra. Isso pode acontecer durante a relação sexual, ao se compartilhar seringas, agulhas e objetos cortantes infectados, na transfusão de sangue contaminado, no momento do parto e até durante a amamentação (CUNICO; GOMES; VELLASCO JUNIOR, 2008).

Patogênese

O HIV é um vírus e, como tal, é um germe microscópico que, devido a sua incapacidade de auto-reprodução (replicação), precisa infectar uma célula que servirá como hospedeira para a produção de novos vírus. O vírus HIV tem como material genético RNA e sua estrutura é composta por capsídeo e envelope fosfolipídico conforme a figura 1, é chamado de retrovírus por fazer parte da classificação de vírus cujo material genético consiste de RNA, e o seu processo de reprodução é um pouco mais complexo que o dos vírus compostos de DNA (CUNICO; GOMES; VELLASCO JUNIOR, 2008).

Figura 1. Corte transversal do vírus da Imunodeficiência Humana.



Fonte: Murray PR, Pfaller MA, Rosenthal KS, Microbiologia Médica. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010 (Cap 62).

Segundo o Ministério da Saúde o ciclo de vida do vírus se divide em nove etapas são elas:

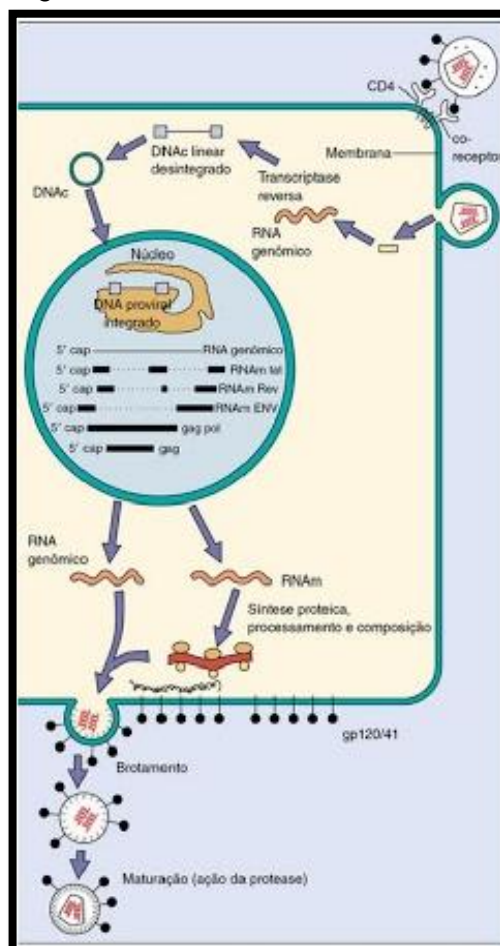
1. Ligação de glicoproteínas virais (gp120) ao receptor específico da superfície celular (principalmente linfócitos T-CD4); a infecção inicial ocorre nas células T CD4. A partícula viral aproxima-se das células e as gp120 do vírus ligam-se nos receptores CD4, conforme é possível observar na figura 2. Essa ligação desestabiliza a gp120 e expõe sua alça V3, que interage com um co receptor denominado CCR5. À medida em que a infecção progride, outras células são infectadas como, por exemplo, os linfócitos T que apresentam receptores CD4 e co receptores CXCR4, conforme figura 3;

2. Fusão do envelope do vírus com a membrana da célula hospedeira;
 3. Liberação do "core" do vírus para o citoplasma da célula hospedeira;
 4. Transcrição do RNA viral em DNA complementar, dependente da enzima transcriptase reversa;

5. Transporte do DNA complementar para o núcleo da célula, onde pode haver integração no genoma celular (provírus), dependente da enzima integrase, ou a permanência em forma circular, isoladamente;

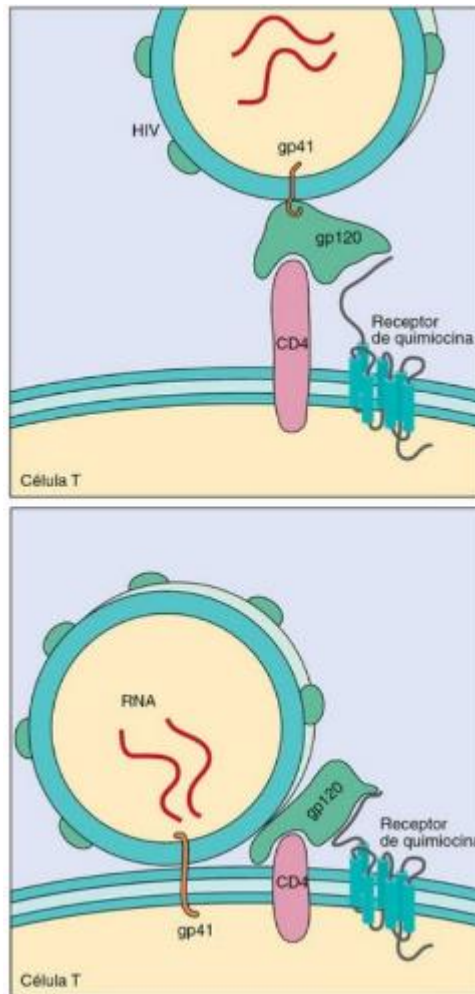
6. O provírus é reativado, e produz RNA mensageiro viral, indo para o citoplasma da célula;
7. Proteínas virais são produzidas e quebradas em subunidades, por intermédio da enzima protease;
8. As proteínas virais produzidas regulam a síntese de novos genomas virais, e formam a estrutura externa de outros vírus que serão liberados pela célula hospedeira;
9. O vírion recém-formado é liberado para o meio circundante da célula hospedeira, podendo permanecer no fluído extracelular, ou infectar novas células.

Figura 2. Ciclo de vida do vírus.



Fonte: Murray PR, Pfaller MA, Rosenthal KS, Microbiologia Médica. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010 (Cap 62).

Figura 3. Ligação do vírus da Imunodeficiência Humana a célula alvo

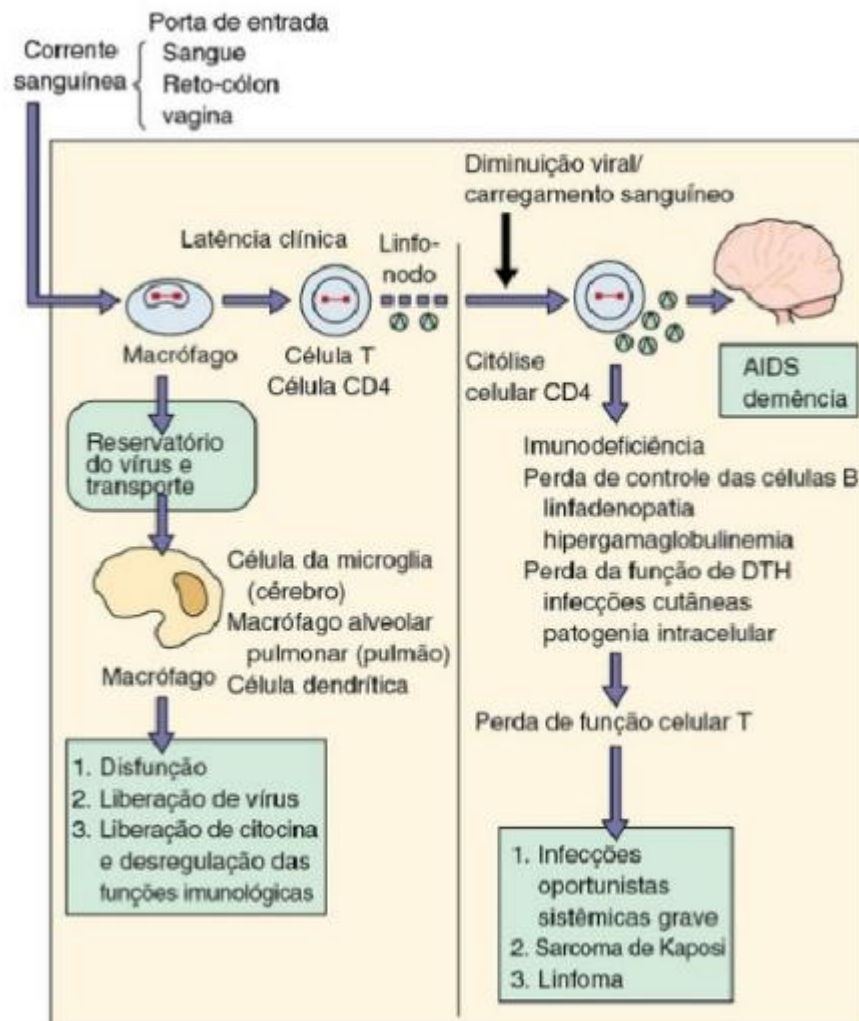


Fonte: Murray PR, Pfaller MA, Rosenthal KS, Microbiologia Médica. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010 (Cap 62)

O principal determinante na patogênese e doença causadas pelo HIV é o tropismo do vírus por células T que expressam CD4 e células mielóides (p. ex., monocitos, macrófagos, macrófagos alveolares pulmonares, células dendríticas e células microgliais do cérebro). O vírus causa a infecção lítica de células T CD4 permissivas e induz apoptose de células T CD4 não permissivas, gera infecção persistente pouco produtiva e infecção latente de células da linhagem mielóide e células T de memória, promove a formação de sincícios em células expressando grande quantidade de antígeno CD4 (células T) e subsequente lise celular e causa

redução das células T CD4, TCD8 e macrófagos conforme se observa na figura 4.(MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2010, p. 1028).

Figura 4. Patogênese do vírus da Imunodeficiência Humana



Fonte: Murray PR, Pfaller MA, Rosenthal KS, **Microbiologia Médica**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010 (Cap 62).

Tratamento

Em 1996, foi promulgada a lei que garante o acesso à terapia antirretroviral por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), que até o presente momento disponibiliza

21 medicamentos para o controle da infecção pelo HIV. A primeira linha de tratamento consiste no esquema terapêutico prescrito logo após o diagnóstico, caso não haja sucesso na supressão viral e restauração da imunidade, a segunda linha deve ser prescrita, e assim por diante (BROJAN *et al.*, 2020).

Inibidores de fusão: Para que o HIV complete o seu ciclo reprodutivo, é necessária a fusão com um linfócito T, onde deposita a sua informação genética. Sem conseguir entrar na célula de defesa, o vírus não tem como se replicar. Para se ter uma idéia, a multiplicação do VIH dentro de um organismo se repete 2,5 bilhões de vezes por dia. É essa capacidade de reprodução que debilita a defesa do organismo depois de algum período (SOUZA, 2005).

Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa: Uma vez ocorrida a fusão, a parte interior do vírus, composta pelo RNA e algumas enzimas importantes, é absorvida pela célula humana. Em seguida, a enzima viral denominada transcriptase reversa recodifica o material genético do HIV, convertendo-o de RNA para DNA (CUNICO; GOMES; VELLASCO JUNIOR, 2008).

Os inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa são drogas que atuam como falsos nucleosídeos, visto que a enzima não consegue diferenciar um nucleosídeo verdadeiro (que existe naturalmente dentro das células) de um falso (medicamento), não ocorrendo então, a formação efetiva da molécula de DNA que seria integrado ao DNA humano (RESENDE *et al.*, 2013).

Por outro lado, os fármacos inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa agem através da ligação a sítios alostéricos específicos da enzima, comprometendo sua estrutura e reduzindo efetivamente a eficácia com que ela sintetiza a fita dupla de DNA a partir do RNA viral (CRUZ *et al.*, 2014).

Inibidores de protease: Ainda dentre os fármacos utilizados no coquetel para o tratamento do HIV/AIDS, estão os fármacos inibidores da protease viral, uma enzima responsável pela clivagem das proteínas produzidas pelo DNA viral em produtos específicos para a “montagem” de novos vírus, o bloqueio desta enzima não inibe a síntese das proteínas do vírus, no entanto, as tornam ineficientes para a síntese de uma nova partícula, interrompendo o ciclo (LV *et al.*, 2015).

Inibidores da integrase: A integrase catalisa o processamento da extremidade 3' e o DNA viral e a transferência da fita, os inibidores de integrase têm como alvo a reação de transferência de fita de integrase. O efeito seletivo na transferência de fita é resultado de um mecanismo de ação bem definido, no qual o inibidor se liga apenas ao complexo específico entre a integrase e o DNA viral e interage com os dois cofatores de íons metálicos de magnésio essenciais no sítio ativo da integrase e também no DNA. Portanto, são compostos de dois componentes essenciais: um farmacóforo de ligação a metal, que sequestra os magnésio do sítio ativo, e um grupo hidrofóbico, que interage com o DNA viral, bem como com a enzima do complexo (GROBLER *et al.* 2002).

CRISPR/Cas-9

Em seu texto CAETANO (2019 p.96) diz que a técnica CRISPR pode ser definida como Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interpaçadas, oriunda do termo em inglês Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. SANTOS (2016 p.96) ressalta que CRISPR é uma ferramenta que possui um potencial muito importante, por ser um método muito preciso, eficiente e que possui um custo relativamente menor em comparação às outras técnicas.

Bactérias e vírus sempre travaram uma batalha ao longo da evolução das espécies, alguns vírus bacteriófagos entram na bactéria e podem levar a sua lise, todavia, foram descobertas algumas bactérias que possuem um mecanismo de defesa que conseguem salvar o próprio material genético dos vírus em seu DNA em um espaço do código do DNA chamado CRISPR, ele então é armazenado até que a bactéria é atacada pelo mesmo vírus ela produz uma cópia do material em forma de RNA no qual ativa uma proteína chamada Cas9 que compara o material genético do Vírus com o RNA, quando ela o encontra, ela corta essa parte do material e torna o vírus inútil, protegendo a bactéria do ataque viral (KURZGESAGT, 2016, p.91).

Essa proteína é encontrada na *Streptococcus Pyogenes*, uma bactéria conhecida por causar infecção na garganta, e através do estudo dessa proteína, Cas9, perceberam que poderiam usá-la como ferramenta para edição de genomas (CAETANO 2019 p.97).

Kurzgesagt (2016, p.92) diz que partindo desse pressuposto está sendo aplicada tal técnica em humanos, ou seja, aplicando pedaços de DNA que se quer mudar em uma “célula viva”.

Deng *et al.*, (2018,p.92) comenta que “em relação ao vírus HIV alguns avanços foram notados como em 2013 uma aplicação de CRISPR para cortar com sucesso o Chemokine Receptor 5 (CCR5), este é um dos maiores co receptores do HIV que ajudam o vírus a entrar na célula alvo”.

Kurzgesagt (2016, p.92) menciona que “em 2015 cientistas provaram que era possível retirar o vírus HIV em células em laboratório, um ano depois fora feito um estudo em ratos no qual fora injetado CRISPR nesses ratos com HIV e fora retirado mais de 50% do vírus no organismo dele”.

No ano de 2017, pesquisadores mostraram que o DNA do HIV podem ser eliminados no genoma em modelos de animais vivos, eles utilizaram 3 tipos de animais, todos foram ratos, e um deles foi humanizado, ou seja, foram transplantados células humanas fisiológicas infectadas com o HIV, os pesquisadores inativaram geneticamente com o sistema CRISPR, eles testaram esse sistema em ratos que tinham uma infecção aguda por Eco-HIV que é o HIV dos ratos e é muito semelhante com o dos humanos eles conseguiram a eficiência em 96% em bloquear a replicação viral e prevenir a infecção sistêmica, com apenas um uso dessa técnica, todas as células humanas que estavam no ato humanizado foram eliminadas (YIN Z, 2017, p.92)

Aplicações da técnica CRISPR no tratamento contra HIV

CRISPR, em sua função nativa, fornece imunidade adaptativa em bactérias, introduzindo mutações de DNA em vírus patogênicos e plasmídeos. Um avanço veio em 2012 com o desenvolvimento de componentes CRISPR modificados compreendendo um RNA guia simples quimérico curto (sgRNA) e uma nuclease Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. Parece agora que este sistema simplificado pode ser adaptado para segmentar qualquer sequência de DNA a partir de qualquer organismo, assim, expandir grandemente a sua função e utilidade (SAAYMAN *et al.*, 2015).

O DNA proviral também foi direcionado por endonucleases que podem ser projetadas para reconhecer sequências de DNA específicas, incluindo nucleases de dedo de zinco (ZFN), nucleases efetoras semelhantes a ativador de transcrição (TALEN) e endonucleases homing (MANJUNATH *et al.*, 2013).

Essas nucleases projetadas também foram usadas para clivar genes celulares envolvidos na replicação do HIV, como o gene que codifica o receptor CCR5 que facilita a infecção pelo HIV-1. As quebras de DNA de fita dupla induzidas por nuclease são reparadas pela via de junção de extremidade não homóloga (NHEJ) propensa a erros, que frequentemente introduz mutações (principalmente inserções e deleções; indels) que prejudicam a função do DNA alvo (SAAYMAN *et al.*, 2015).

Mais recentemente, o sistema CRISPR-Cas9 tem sido amplamente empregado em estratégias anti-HIV. Este sistema é derivado do sistema CRISPR-Cas que funciona como sistema imune adaptativo baseado em ácido nucleico em bactérias e arqueias, detectando e silenciando ácidos nucleicos estranhos de vírus e plasmídeos invasores (MAKAROVA *et al.*, 2011).

Segundo Xiao-Jie *et al.* (2015), os componentes principais de CRISPR-Cas9 são uma nuclease Cas9 compreendendo dois domínios ativos catalíticos RuvC e HNH, e um único RNA guia (sgRNA) que é derivado de RNA CRISPR (crRNA) e RNA CRISPR de ação trans. Na presença de um motivo adjacente ao protoespaçador (PAM) na fita oposta, sgRNA direciona Cas9 para o local alvo por emparelhamento de bases, resultando em quebras de fita dupla de DNA específicas do local geradas por

Cas9 (DSBs) que são subsequentemente reparadas por reparo dirigido homólogo (HDR) se as sequências homólogas estiverem disponíveis ou de outra forma por união de extremidade não homóloga (NHEJ).

A alta flexibilidade e especificidade do sistema CRISPR-Cas9, em combinação com sua alta eficiência de clivagem, levou à ampla aplicação do sistema, não apenas na edição do genoma, mas também em aplicações antivirais. Cas9 tem dois locais cataliticamente ativos (domínios HNH e semelhantes a RuvC) e introduz uma quebra de fita dupla no DNA alvo. A inativação de um dos sítios catalíticos criou nickases que causam uma quebra de DNA de fita simples (GASIUNAS *et al.*, 2012, JINEK *et al.*, 2012).

A mutação de ambos os locais rendeu um Cas9 cataliticamente inativo que reteve a afinidade de ligação de DNA específica mediada por gRNA. Essa variante "morta" de Cas9 (dCas9) pode ser usada para reprimir a expressão de genes direcionados interferindo com o alongamento da transcrição, ligação de RNA polimerase ou ligação de fator de transcrição (QI *et al.*, 2013).

A Fusão da proteína Cas9 para transcrição de domínios repressores ou ativadores produziram fatores de transcrição direcionados por gRNA que permitem a modulação da transcrição em células eucarióticas, esses sistemas baseados em CRISPR-Cas são amplamente aplicados como ferramenta para modificação do genoma e modulação do transcriptoma, tanto de células quanto de seus vírus invasores (GILBERT *et al.*, 2013).

Estratégias anti-HIV baseadas em CRISPR-Cas9

As novas ferramentas de edição do genoma podem ser usadas para modificar as células hospedeiras de forma que elas não sejam mais suscetíveis à infecção pelo HIV. Na última década, vários estudos focaram na inativação do receptor CCR5 ou CXCR4 para a entrada do HIV. O HIV entra nas células hospedeiras através da ligação da proteína do envelope viral ao CD4 e ao receptor CCR5 ou CXCR4. Na

maioria dos casos, um HIV usando CCR5 está envolvido na infecção primária. Em fases posteriores da infecção, mutações na proteína do envelope podem alterar o tropismo para o uso do CXCR4 (SAAYMAN *et al.*, 2015).

Uma deleção de ocorrência natural de 32 nt no gene CCR5 foi descrita (CCR5 Δ 32) que impede a expressão de CCR5 na superfície celular. Os indivíduos homozigotos para este genótipo CCR5 Δ 32 foram considerados altamente resistentes à infecção pelo HIV, enquanto a mutação não tem outros efeitos fenotípicos (DEAN *et al.*, 1996). Além disso, foi descrito que a replicação do vírus foi suprimida em um paciente infectado pelo HIV que se submeteu a um transplante de células-tronco alogênico com substituição completa de suas células-tronco por células-tronco periféricas CCR5 Δ 32 / Δ 32 CD34 + (HUTTER *et al.*, 2009).

Essas observações sugerem que a interrupção do CCR5 pode levar à cura do HIV. Como os doadores homozigotos CCR5 Δ 32 adequados para transplante de células-tronco são escassos, várias estratégias de edição de genoma, incluindo o sistema CRISPR-Cas9, têm sido empregadas para nocaute ou nocaute a expressão de CCR5 (ALLERS; SCHNEIDER, 2015).

No entanto, a inativação do CCR5 não protegerá contra o HIV que usa o CXCR4 e pode desencadear mutações no envelope que mudam o uso do receptor viral do CCR5 para o CXCR4 (FATKENHEUER *et al.*, 2008), o que pode até aumentar a patogenicidade do vírus. Estratégias semelhantes podem ser usadas para bloquear a expressão do receptor CXCR4 (DIDIGU *et al.*, 2014) ou outros fatores celulares envolvidos na replicação do HIV (HULTQUIST *et al.*, 2016), mas o knockout ou knockdown dessas proteínas pode ter efeitos fenotípicos indesejáveis.

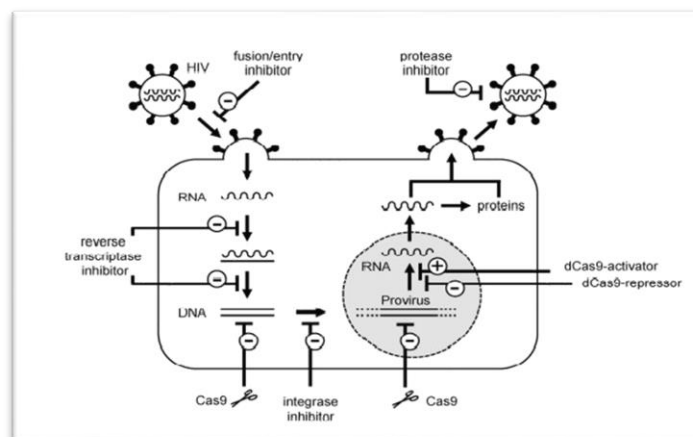
O sistema CRISPR-Cas9 foi usado em vários estudos anti-HIV que objetivam curar células infectadas ou prevenir a infecção de células não infectadas. Na primeira abordagem, a nuclease Cas9 e gRNAs com complementaridade de sequência ao HIV são introduzidos em células infectadas para atacar o DNA proviral estabelecido. Na segunda abordagem, Cas9 e os gRNAs são introduzidos de forma estável em células não infectadas e devem aguardar e atacar imediatamente o DNA viral transcrito

reverso que é produzido em uma infecção futura, funcionando assim como defesa intracelular contra a infecção por vírus (SAAYMAN *et al.*, 2015).

Liao *et al.*, 2015, também demonstrou que a segmentação de vários locais do genoma do HIV-1 pode aumentar a eficiência da excisão e interrupção do genoma proviral não integrado (LIAO *et al.*, 2015). Além disso, a combinação de dois sgRNAs eficazes para atingir diferentes regiões do genoma do HIV pode prevenir a replicação viral e o escape (LEBBINK *et al.*, 2017). Recentemente, Wang *et al.* também demonstraram que *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9)/gRNAs em um vetor lentiviral all-in-one poderia excisar o pró-vírus do HIV-1 latente e suprimir a reativação do pró-vírus (WANG *et al.*, 2018). Além disso, os SaCas9 / gRNAs combinados mostraram maior eficiência na interrupção do genoma do HIV-1 do que a edição de SaCas9 mediada por sgRNA único (WANG. *et al.*, 2018).

CRISPR /Cas9 pode ser combinado com outras terapêuticas anti-HIV, como drogas antivirais ou moléculas de RNAi, como é possível observar na figura 4 durante ciclo de replicação o uso de inibidores de fusão, protease, transcriptase reversa e integrase, atuando juntamente com a Cas9. Essa abordagem reduzirá ainda mais o nível de replicação do vírus, mas também aumentará o limite genético para que ocorra o escape do vírus. Um ataque combinado de CRISPR-Cas9 e RNAi ao HIV, visando tanto o DNA quanto o RNA viral, de fato inibiu a replicação do HIV de forma mais duradoura do que as monoterapias correspondentes (SAAYMAN *et al.*, 2015).

Figura 4. Ciclo de replicação do HIV-1 e terapia antiviral.



Fonte: 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>.

Benefícios da aplicação do sistema CRISPR

Segundo Ding *et al.* (2014), algumas das principais aplicações do sistema CRISPR/Cas9 na pesquisa incluem a criação de mutações da linha germinal e geração de animais modelos transgênicos com eficiência e velocidade significativa, transplantes baseados em modelos “in vivo”, em que as células estaminais ou células progenitoras são modificadas por CRISPR e transplantados para receptores, e a adaptação mais popular onde uma técnica de administração “in vivo” direta é utilizada, tais como microinjeção de CRISPR através de vírus adeno-associado em tecido (*apud* DIAS; DIAS, 2018).

Acerca deste tema, vários estudos têm sido propostos. Em estudos com ratos que apresentavam doença cardiovascular, foi sugerido que a terapia de genes por CRISPR/Cas9 foi capaz de alterar permanentemente o gene mutante e restaurar a função natural do produto do gene. Outro estudo recente em primatas demonstrou que a injeção de um sistema CRISPR/Cas9 em um embrião de uma célula é capaz de atingir simultaneamente dois genes em um passo, com elevada especificidade e fora do alvo de mutagênese (NIU *et al.*, 2014).

Apesar de seu elevado potencial na engenharia genética, o sistema CRISPR, não vem sendo aplicado nessa área devido questões éticas. Aplicações emergentes incluem o desenvolvimento de vacinas, prevenção e tratamento de infecções, engenharia microbiana, terapia celular e medicina regenerativa, produção de biocombustíveis e engenharia de genomas (HEIDARI, 2015).

O sistema CRISPR/Cas9 surgiu com uma proposta inovadora que concilia praticidade, objetividade e especificidade. Suas aplicações não estão limitadas apenas a área médica, para manipulações genéticas ou desenvolvimento de novas drogas, estende-se a biotecnologia, onde pode ser manipulado a fim de produzir

combustíveis e alimentos; além destas, na área biológica o sistema é capaz de manipular genes de animais e a variação genética de microrganismos (HSU *et al.*, 2014).

Limitações da técnica

A tecnologia de edição CRISPR oferece oportunidades inigualáveis no combate a doenças genéticas e modificação de genomas dos organismos vivos, humanos e outros. Os esforços dos cientistas na engenharia genética atingiram um pico quando CRISPR apareceu como uma tecnologia rápida, direta e de baixo custo, acessível quase em qualquer configuração básica de laboratório. Contudo, os riscos desconhecidos e os potenciais benefícios relativos a esta poderosa tecnologia de edição de gene precisam de uma investigação substancial e uma discussão aberta para permitir uma avaliação minuciosa de aspectos científicos, éticos e sociais desse problema (HEIDARI, 2015).

Discussões éticas no uso do sistema CRISPR

A perspectiva de que CRISPR pode ser utilizada para modificar a linha genética humana tem estimulado debates internacionais (LANDER, 2016).

Como uma tecnologia emergente, o sistema CRISPR/Cas9 está sujeito a um debate aquecido, apesar do seu elevado potencial de aplicação, e desenvolvimento de medicações terapêuticas, ferramentas de diagnóstico e melhoria de bioprodutos. A principal contribuição do sistema CRISPR à biomedicina está na engenharia genética e em reprogramação de células para modificar caminhos patológicos ou aumentar/reformar sua função biológica de várias formas, que anteriormente não existiam na natureza (HEIDARI, 2015).

Tentativas recentes por cientistas chineses para editar embriões humanos

usando CRISPR (LIANG *et al.*, 2015) causaram muita controvérsia ética e legal. Comitês de cientistas e bioeticistas manifestaram a sua preocupação sobre o estado imaturo de CRISPR em relação aos seus efeitos adversos, destacando a necessidade de uma investigação mais aprofundada de questões de segurança e eficácia antes de qualquer tentativa de engenharia do genoma humano (BALTIMORE *et al.*, 2015).

Da mesma forma, o National Institutes of Health/EUA (NIH) reafirmou que não financiará qualquer uso de tecnologias de edição de gene em embriões humanos, de acordo com a emenda Dickey-Wicker (1996), que proíbe o uso de fundos federais para a criação, destruindo ou conscientemente ferindo embriões humanos. O Food and Drug Administration/EUA (FDA) funciona como árbitro final da aplicação clínica da terapia genética, mas tais decisões estão sujeitas a revisão pela Comissão de Recombinant DNA Advisory (RAC) do NIH. Em 2013, nas suas revisões sobre orientações para a investigação envolvendo moléculas recombinantes/ sintéticos de ácidos nucleicos, NIH declarou que “não apoiará propostas de alteração da linha germinal, mas vai considerar propostas que envolvam a transferência de genes de células somáticas”.

A interferência com a composição genética da linha germinal tem sido um assunto socialmente sensível desde os primórdios da engenharia genética, uma vez que aumenta a intervenção biológica para uma perspectiva altamente ética. Por exemplo, o artigo 1º da Declaração Universal sobre o Genoma Humano e os Direitos Humanos (1997) declara que “o genoma humano subordina a unidade fundamental de todos os membros da família humana, bem como o reconhecimento de sua inerente dignidade e diversidade”, em um sentido simbólico, é o patrimônio da humanidade (UNESCO, 1997).

A declaração da UNESCO classifica o genoma humano como patrimônio mundial, que deverá ser inerentemente protegido e conservado para as gerações futuras. Embora a UNESCO considere a integridade do genoma humano que evolui, desenvolve mutações e expressa diferentes potencialidades de cada indivíduo, permanece vaga se as deficiências genéticas e deficiências que causam doenças graves são consideradas como variações do genoma humano com um propósito

evolutivo e, portanto, sujeitos à proteção e conservação, ou se são erros biológicos que podem ser eticamente corrigidas por meio de tecnologia.

A visão da Comissão Europeia sobre a terapia genética é refletida na Diretiva 2009/120/CE, que se refere à terapia genética, terapia com células somáticas e engenharia de tecidos como terapia avançada. No entanto, devido às complicações técnicas dos dispositivos médicos e o aspecto interdisciplinar de terapia avançada, uma comissão especial foi formada para organizar uma investigação caso a caso para as tecnologias emergentes que possam cair sobre terapias avançadas (EUROPEAN COUNCIL, 2001).

O Comitê das Terapias Avançadas (COMMITTEE FOR ADVANCED THERAPIES, CAT) é o órgão autorizado para comercialização centralizada que é responsável pela avaliação de novos produtos de terapia avançada e regulamentação técnica das respectivas tecnologias. De acordo com a CAT, um medicamento de terapia genética "(A) contém uma substância ativa que contém ou é constituído por um ácido nucleico recombinante usado ou administrado em seres humanos visando à regulação, reparação, substituição, adição ou exclusão de uma sequência genética; (B) o seu efeito terapêutico, profilático ou de diagnóstico está diretamente relacionada com a sequência de ácido nucleico recombinante que contém, ou com o produto da expressão genética desta sequência" (EUROPEAN COUNCIL, 2001).

Embora a terapia genética em células somáticas parecesse ter a aprovação condicional da legislação da União Europeia, qualquer interferência no material genético da linha germinativa é proibida, tal como indicado na Convenção sobre Direitos Humanos e Biomedicina do Conselho Europeu, que permite engenharia genética só por razões preventivas, de diagnóstico ou terapêuticas, e apenas quando não tem por objetivo alterar a composição genética dos descendentes de uma pessoa (EUROPEAN COUNCIL, 1997).

O sistema CRISPR levanta questões através de um espectro dinâmico da ciência, ética e política. Embora reconheçamos o princípio de "não prejudicar", um diálogo coerente entre ciência e ética pode equilibrar a posição de tais tecnologias em decisões políticas e elaboração de legislação. No entanto, como um pré-requisito da

legislação democrática, precisamos envolver efetivamente a voz pública neste procedimento. Um risco relativo à percepção pública das tecnologias de ponta, e em particular os relacionados com a saúde humana, e a validade das informações acessíveis ao público. Meios de comunicação, por vezes, deturpam a ciência ao público, e a linha tênue entre ciência e ficção deve ser levada a sério quando se discute edição de genoma, para evitar equívocos em torno de suas implicações médicas e sobre os riscos potenciais. Por outro lado, pode-se argumentar que os cientistas não são eleitos pelo povo e não necessariamente representam os valores da sociedade. Uma política transparente onde a vantagem realista e desvantagem de tais tecnologias são comunicadas ao público, certamente, deve servir para alcançar o objetivo (SAREWITZ 2015).

Considerações Finais

A partir da análise dos artigos selecionados para esta revisão sistemática, se torna evidente que o futuro das terapias para erradicar o vírus HIV-1 está caminhando para um resolução a partir da tecnologia de CRISPR/ CAS9, através da utilização deste mecanismo para evitar a proliferação do vírus do HIV nas células, até o presente momento os experimentos estão sendo feitos em modelos animais e apresentam ótimos resultados.

Com isso, essa ferramenta desempenha um papel crucial de pesquisa, uma vez que se trata de uma técnica relativamente simples em relação às demais, pois utiliza de pequenos RNA's guias associados a enzima Cas9, o que facilita o seu acesso a determinada sequência gênica. Diante disso, o CRISPR-Cas9, representa uma visão de futuro no campo biológico, melhorando a perspectiva não somente dos pesquisadores, como também dos pacientes que serão beneficiados com as vantagens da técnica.

Ademais, a edição do genoma do provírus do HIV-1 pode de ser vista além de uma terapia de cura única, pode ser usada como abordagem adicional em uma terapia

combinada, os vetores CRISPR/Cas9 podem ser administrados durante a continuação do TARV, alternativamente, estudos de edição do genoma CRISPR do provírus em combinação com siRNA mostraram que essas tecnologias podem ser aditivas na prevenção da replicação do HIV-1 em linhas celulares.

As limitações dessa técnica são variadas, como a dificuldade de enviar CRISPR a célula alvo sem provocar reação inflamatória, visto que nosso organismo ataca bactérias ou vírus invasores que são usados para levar o CRISPR, no entanto com a rapidez que as pesquisas têm avançado, a perspectiva é que soluções sejam encontradas para as limitações e a técnica seja amplamente aplicada na edição genética.

Referências

ALLERS, K.; SCHNEIDER, T.. CCR5Delta32 mutation and HIV infection: basis for curative HIV therapy. **Curr. Opin. Virol**, [S.L.], p. 24-29, 2015.

BALTIMORE, D.; BERG, P.; BOTCHAN, M.; CARROLL, D.; CHARO, R. A.; CHURCH, G., et al. Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. **Science**, v. 348, p. 36-38, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4394183/>> Acesso em: 05 ago. 2020.

BATISTA, Fellipe C. C.; NUNES, Carlos P.. CRISPR CAS9: ATUAIS APLICAÇÕES NO TRATAMENTO DO HIV. **Revista de Medicina de Família e Saúde Mental**, [S. L.], v. 1, n. 1, p. 91-92, 2019. Disponível em: file:///C:/Users/Iney/Downloads/1609-5636-1-PB.pdf. Acesso em: 06 ago. 2020.

Kurzgesagt IAN. Genetic Engineering Will Change Everything Forever – CRISPR. 2016 (16m03s). Disponível em: Acesso em: 28 nov. 2018.

BROJAN, Lucas Eduardo Fedaracz *et al.* Uso de antirretrovirais por pessoas vivendo com HIV/AIDS e sua conformidade com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. **Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein**, São Paulo, v. 18, n. 5, p. 4-5, fev. 2020. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082020000100237&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 13 set. 2020.

CAETANO, Gisdênilton Carlos Gonzaga *et al.* TÉCNICA CRISPR-CAS9 E SUA UTILIZAÇÃO NA ÁREA LABORATORIAL. **Revista Brasileira de Cirurgia e**

Pesquisa Clínica, Minas Gerais, v. 25, n. 2, p. 23-24, 22 nov. 2018. Disponível em: https://www.mastereditora.com.br/periodico/20190103_214255.pdf. Acesso em: 10 abr. 2020.

CRUZ, Maria LS et al. Viral suppression and adherence among HIV-infected children and adolescents on antiretroviral therapy: results of a multicenter study. **Jornal de pediatria**, v. 90, n. 6, p. 563-571, 2014.

CUNICO, Wilson; GOMES, Claudia R. B.; VELLASCO JUNIOR, Walcimar T.. HIV - recentes avanços na pesquisa de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 23-24, out. 2008. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000800035. Acesso em: 16 ago. 2020.

DEAN, M. *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. **Science**, New York, p. 1856-1857, maio 1996.

DIAS, Camila Almeida de Paula; DIAS, Janice Maria Ribeiro. O SISTEMA CRISPR/CAS COMO UMA NOVA FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA NA EDIÇÃO DE GENOMAS: APLICAÇÕES E IMPLICAÇÕES. **Ambiente Acadêmico**, Espírito Santo, v. 4, n. 1, p. 10-11, jun.2018. Disponível em: <file:///C:/Users/Iney/Downloads/revista-ambiente-academico-v04-n01-artigo01.pdf>. Acesso em: 09 abr. 2020.

DIDIGU, C.A. *et al.* Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors ccr5 and cxcr4 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. **Blood**, [S. L.], p. 61-69, 2014.

EUROPA. European Council. Council of the European Union. **Convention on human rights and biomedicine**: Convention for the protection of human rights and dignity of the human being with regard to the application of biology and medicine. Oviedo, 1997. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol1/dir_2001_20/dir_2001_20_en.pdf. Acesso em: 22 jun. 2020.

EUROPA. European Council. Council of the European Union. **Directive 2001/20/EC of the european parliament and of the council**: on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the member states relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use. 2001. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol1/dir_2001_20/dir_2001_20_en.pdf> Acesso em: 22 jun. 2020.

ESTIGMA E DISCRIMINAÇÃO.UNAIDS, 2020.Disponível em:<<https://unids.org.br/estigma-e-discriminacao/#:~:text=Discrimina%C3%A7%C3%B5es%20relacionadas%20ao%20HIV%20normalmente,o%20HIV%20e%20grupos%20marginalizados>> Acesso em: 11 nov 2020.

FATKENHEUER, G. *et al.* Subgroup analyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection. **N. Engl. J. Med.**, [S. L.], p. 1442-1455, 2008.

FERREIRA, Roberta Costa Santos; RIFFE, Alessandro; SANT'ANA, Antônio Euzébio Goulart. HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 8, p. 44-45, ago. 2010. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422010000800023&script=sci_arttext. Acesso em: 16 ago. 2020.

GASIUNAS, G. *et al.* Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, [S. L.], p. 2579-2586, abr. 2014.

GILBERT, L.A. *et al.* **Genome-Scale** CRISPR-Mediated control of gene repression and activation. *Cell*, [S. L.], p. 647-661, mar. 2014.

Grobler JA, Stillmock K, Hu B, Witmer M, Felock P, Espeseth AS, Wolfe A, Egbertson M, Bourgeois M, Melamed J, et al. 2002. Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: Implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes. **Proc Natl Acad Sci**, v. 99, n. 10, p. 6662, 2002.

HAJJAR, Ludhmila Abrahão *et al.* Manifestações cardiovasculares em pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 85, n. 5, p. 15-16, nov. 2005. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0066-782X2005001800013&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 06 ago. 2020.

HEIDARI, Raheleh; SHAW, David Martin; ELGER, Bernice Simone. CRISPR and the Rebirth of Synthetic Biology. **Science and Engineering Ethics**. p 1–13. Dezembro/2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11948-016-9768-z>> Acesso em: 05 ago. 2020.

HSU, Patrick D.; LANDER, Eric S.; ZHANG, Feng. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. **Cell**, Alemanha, p.157, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4343198/> Acesso em: 18 jun. 2020.

HULTQUIST, J.F. *et al.* A Cas9 ribonucleoprotein platform for functional genetic studies of HIV-host interactions in primary human T cells. **Cell Rep.**, [S. L.], p. 1438-1452, 2016.

KAMINSKI, Rafal *et al.* Elimination of HIV1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. **Scientific Reports**, Nova York, v.6, n. 22.555, 2016.

Kurzgesagt IAN. Genetic Engineering Will Change Everything Forever – CRISPR. 2016 (16m03s). Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=jAhjPd4uNFY>> Acesso em 28 nov. 2018.

LANDER, Eric S. **The Heroes of CRISPR**. Cell, Alemanha, v. 164, p.18-28, jan/2016. Disponível em: <https://translate.googleusercontent.com/translate_c?depth=1&hl=ptBR&prev=search&rurl=translate.google.com.br&sl=en&u=https://www.broadinstitute.org/files/news/pdfs/PIIS0092867415017055.pdf&usg=ALkJrhh2xDZpyoy1hn36UxAuIAE30RVv7w>. Acesso em: 17 jun. 2016.

LANGENDORF, Tassiane Ferreira *et al.* Profilaxia da transmissão vertical do HIV: cuidado e adesão desvelados por casais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [S.L.], v. 69, n. 2, p. 275-281, abr. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0034-7167.2016690210i>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672016000200275&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 23 out. 2020.

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, n. 1, p. 10-11, fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep41968>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28176813/>. Acesso em: 23 out. 2020.

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. 10-11, 10 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7413>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25752527/>. Acesso em: 23 out. 2020.

LIANG, P.; XU, Y.; ZHANG, X.; DING, C.; HUANG, R.; ZHANG, Z.; *et al.* CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tri pro nuclear zygotes. **Protein and Cell**, v.6(5), p. 363–372. Maio/2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4417674/>> Acesso em: 05 ago. 2020.

LV, Zhengtong; CHU, Yuan; WANG, Yong. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. **HIV/AIDS (Auckland, NZ)**, v. 7, p. 95, 2015

MANJUNATH, N *et al.* Novas tecnologias de edição de genes para terapia genética de HIV. **Vírus**, [S. L.], p. 10-11, 14 out. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24284874/>. Acesso em: 08 set. 2020.

MAKAROVA, K.s. *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. **Nat. Rev. Microbiol.**, [S. L.], p. 467-477, jun. 2011.

Murray PR, Pfaller MA, Rosenthal KS, **Microbiologia Médica**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010 (Cap 62).

NETO, Souza *et al.* A EVOLUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA EM PROL DO COMBATE AO VÍRUS DA AIDS. **Universo Recife**, Recife, v. 4, n. 2, p. 13-14, abr. 2017. Disponível em: <
<http://revista.universo.edu.br/index.php?journal=1UNICARECIFE2&page=article&op=viewArticle&path%5B%5D=4539>: 10 jun. 2020.

NIU, Y. *et al.* Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. **Cell**, Alemanha, v.156, p. 836–843, fevereiro/2014. Disponível em: < [http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(14\)00079-8](http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(14)00079-8) > Acesso em: 22 jun. 2020.

Organização Pan-Americana de Saúde, nov. de 2017. Disponível em: <
https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5666:folha-informativa-hivaids&Itemid=812#:~:text=O%20v%C3%ADrus%20da%20imunodefici%C3%A2ncia%20humana,v%C3%ADrus%20se%20tornam%20gradualmente%20imunodeficientes.>. Acesso em: 09 de abr. de 2020.

Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV / AIDS. Disponível em: <
[https://unaid.org.br/estatisticas/#:~:text=ESTAT%C3%8DSTICAS%20GLOBAIS%20SOBRE%20HIV%202019&text=770%20000%20%5B570%20000%E2%80%94,at%C3%A9%20o%20fim%20de%202018\).>](https://unaid.org.br/estatisticas/#:~:text=ESTAT%C3%8DSTICAS%20GLOBAIS%20SOBRE%20HIV%202019&text=770%20000%20%5B570%20000%E2%80%94,at%C3%A9%20o%20fim%20de%202018).>). Acesso em: 09 de abr. de 2020.

QI, L.s. *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. **Cell**, [S. L.], p. 1173-1183, maio 2013.

RESENDE, Renata Cunha *et al.* Adesão ao tratamento antirretroviral de pacientes vivendo com HIV/AIDS atendidos pelo Sistema Único de Saúde doi: <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrv.2012.102.186201>. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 2, p. 186-201, 2013.

SAAYMAN, Sheena *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>.
MAKAROVA, Ks *et al.* Evolução e classificação dos sistemas CRISPR-Cas. **Nat. Rev. Microbiol.**, [S. L.], v. 6, n. 9, p. 467-477, jun. 2011.

Santos SLF, Alves HHS, Prado RMS, Barros KBNT. CRISPR uma nova era na Biologia molecular; **Revista Biotecnologia & Ciência**. 2016; 5(2):40-48
Doudna ,Chargentier E.The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science . 2014; 3469(213). DOI: 10.1126/science.1258096.

Santos SLF, Alves HHS, Prado RMS, Barros KBNT. CRISPR uma nova era na Biologia molecular; **Revista Biotecnologia & Ciência**. 2016; 5(2):40-48
Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. **Hospital Israelita Albert Einstein**, São Paulo, SP, Brasil. DOI: 10.1590/S1679-45082017RB4024. Einstein. 2017; 15(3):369-75.

SAREWITZ, D. **CRISPR: Science can't solve it**. Nature Comments, v. 522, p. 413–414. Junho/2015. Disponível em: Acesso em: 22 jun. 2020.

SILVA, Ana Lúcia Cardoso Nogueira da *et al.* Adesão e não-adesão à terapia anti-retroviral: as duas faces de uma mesma vivência. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [S.L.], v. 62, n. 2, p. 213-220, abr. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-71672009000200007>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672009000200007&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 10 nov. 2020.

SOUZA, Marcus Vinícius Nora de. Fármacos Inibidores de Fusão:: uma nova estratégia no combate à replicação do vírus vih. **Acta Farm. Bonaerense Acta**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 293-294, set. 2005. Disponível em: http://www.latamjpharm.org/trabajos/24/2/LAJOP_24_2_6_2_H4JJ04IZ7O.pdf. Acesso em: 10 set. 2020.

UNESCO. (1997). Universal declaration on the human genome and human rights. Disponível em: Acesso em: 21 junho 2020.

WANG, Xiaoling *et al.* Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 175-178, 19 jan. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3127>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6439341/#B139>. Acesso em: 23 out. 2020.

XIAO-JIE, Lu *et al.* CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. **Journal Of Medical Genetics**, [S.L.], v. 52, n. 5, p. 289-296, 24 fev. 2015. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102968>. Disponível em: <https://jmg.bmj.com/content/52/5/289.long>. Acesso em: 23 out. 2020.

Yin Z, et al. In vivo excision of HIV-1 Provirus saCAS9 and Multiplex SingleGuide RNAs in Animal Modes. **Molecular Therapy** Vol. 25 No 5. 2017

ZHU, Weijun *et al.* The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. **Biomed Central**: Med Virol, [S. L.], p. 3-7, 27 Feb. 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/s12977-015-0150-z.pdf>. Acesso em: 15 maio 2020.