

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

GABRIEL FRANCISCO POZO DE MATTOS PEREIRA

**USO DO SISTEMA CRISPR-CAS9 COMO TERAPIA NO COMBATE AO HIV: UMA
REVISÃO CRÍTICA**

Porto Alegre - Rio Grande do Sul
2018

Artigo redigido e formatado com base nas normas da revista Revista de Epidemiologia
e Controle de Infecção - ISSN 2238-3360

GABRIEL FRANCISCO POZO DE MATTOS PEREIRA

**USO DO SISTEMA CRISPR/Cas9 COMO TERAPIA NO COMBATE AO HIV: UMA
REVISÃO CRÍTICA**

Orientador: Prof. Dr Tiago Degani Veit

Trabalho de Conclusão de Curso do
Bacharelado em Ciências Biológicas

Porto Alegre, 3 de dezembro de 2018

Uso do sistema CRISPR-Cas9 como terapia no combate ao HIV: uma revisão crítica

RESUMO – A infecção pelo HIV-1 atinge 37 milhões de pessoas e 2 milhões de pessoas são infectadas por ano pelo vírus HIV mundialmente. A terapia antirretroviral atual é capaz de levar os níveis de HIV a níveis indetectáveis, mas não é capaz de curar a doença. Na última década, outras estratégias surgiram na tentativa de erradicar o vírus utilizando ferramentas de edição genética. Em 2007, foi descoberto um sistema de imunidade adaptativa em bactérias e arqueobactérias denominado CRISPR/Cas9. O CRISPR/Cas9 protege esses organismos de elementos de DNA exógenos, matando bacteriófagos e plasmídeos em uma reexposição. No ano de 2013, esse sistema apresentou a capacidade de editar o DNA de células eucarióticas e desde então é bastante estudado como uma alternativa para tratar diversas doenças incluindo a infecção pelo HIV. As estratégias anti-HIV desenvolvidas a partir do sistema CRISPR/Cas9 incluem a inativação do genoma pró-viral, excisão do genoma pró-viral, inibição da replicação, alteração da expressão dos co-receptores CCR5 e CXCR4 e reversão do estado latente. Nessa revisão serão discutidos os resultados obtidos com o sistema CRISPR/Cas9, abordando limitações e perspectivas futuras a respeito da aplicação dessa ferramenta como terapia no combate ao HIV.

Palavras-chave: HIV, Terapia gênica, CRISPR

ABSTRACT – The HIV-1 infection reaches 37 million people and 2 million people are infected each year with the HIV virus worldwide. Current antiretroviral therapy (ART) is able to bring HIV levels to undetectable levels, but it is not able to cure the disease. Therefore, new strategies have emerged trying to eliminate the virus through gene editing tools. In 2007, an adaptive immune system was discovered in bacteria and archaeobacteria called CRISPR/Cas9. CRISPR/Cas9 protects these living organisms against exogenous DNA elements killing bacteriophages and plasmids when they reinfect a bacterium or archaeobacteria. This system has shown ability to edit DNA of eukaryotic cells and since then it has been studied as a new alternative for the treatment of several diseases including the HIV infection. CRISPR/Cas9 anti-HIV strategies are inactivation of pro viral genome or full excision of the provirus from infected cells, replication inhibition, gene editing of CCR5 and CXCR4, latency reversing. In this review we will focus in the results obtained among these different approaches, discuss about limitations and future perspectives about the CRISPR/Cas9 system as an effective tool against the HIV.

Keywords: HIV, Gene therapy, CRISPR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida do HIV e as diferentes estratégias empregadas pelo sistema CRISPR/Cas9 para eliminação da infecção. a) Alteração da expressão dos co-receptores CCR5 e CXCR4 fechando as portas de entrada do vírus; b) inativação/excisão do genoma pró-viral impede a replicação do HIV e c) reversão da latência expulsa o vírus dos reservatórios expondo-o ao efeito da terapia antirretroviral e ao ataque das células T CD8 provocando a morte das células infectadas.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAV – Adeno-Associated Virus
AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome
Cas9 – Endonuclease associada ao CRISPR
CCR5 – Co-receptor celular
CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CXCR4 – Co-receptor celular
EBV – Epstein Barr Virus
GFP – Green Fluorescent Protein
gRNA – Guide RNA
ART – Antiretroviral Therapy
hCas9 – humanized Cas9
HDAC – Hystone Deacetylase
HIV – Human Immunodeficiency Virus
Jurkat, GHOST, HeLa, HEK293T, SupT1, CHME5, 2D10, TZM-bL – linhagens celulares
LRA – Latency Reversal Agent
LTR – Long Terminal Repeat
NHEJ – Non Homologous End Joining
ORF – Open Reading Frame
PBMC – Peripheral Blood Mononuclear Cells
saCas9 – *Staphylococcus aureus* Cas9
SAHA – Suberoylanilide hydroxamic acid
SAM – Synergistic Activation Mediator
sgRNA – Single Guide RNA
TALEN – Transcription Activator Like Effector Nuclease
TAR – Trans-Activation Response Element
TNF-A – Tumor Necrosis Factor Alpha
ZFN – Zinc Finger Nuclease

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	07
O sistema CRISPR/Cas9	09
METODOLOGIA	11
RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
Inativação do genoma pró-viral	12
Inibição da infecção pelo ataque ao DNA viral	17
Alteração da expressão dos co-receptores de entrada do HIV	18
Reversão da latência viral	20
Discussão	22
CONCLUSÃO	25
AGRADECIMENTOS	26
REFERÊNCIAS	26

INTRODUÇÃO

Desde o início da epidemia causada pelo vírus HIV-1 (“*Human immunodeficiency virus*”) há 3 décadas, 77.3 milhões de pessoas já foram infectadas e 35.4 milhões morreram devido à AIDS (“*Acquired ImmunoDeficiency Syndrome*”) no mundo. Dados de 2017 divulgados pela UNAIDS indicam que 36.7 milhões de pessoas vivem com o HIV e 1.8 milhões de novas infecções ocorreram no ano passado ¹. Até o momento, não existe uma cura para o vírus e os pacientes são submetidos à terapia antirretroviral (ART - *Antiretroviral Therapy*) que é capaz de reduzir a carga viral e recuperar a população de células T CD4⁺⁺; dessa maneira a infecção deixa de ser fatal e torna-se uma doença crônica tratável ². Entretanto, o vírus não é eliminado e permanece em um estado latente em reservatórios bastante heterogêneos - além das células T CD4⁺⁺, o vírus pode infectar outros tipos celulares como macrófagos, células dendríticas, adipócitos e astrócitos - que são estabelecidos após o início da infecção ³. Após a interrupção do tratamento antirretroviral, o vírus deixa o estado latente e volta a multiplicar-se. Isso exige que o paciente mantenha essa terapia para o resto de sua vida. Outro grande problema que os pacientes enfrentam durante o tratamento é a necessidade de troca de medicamentos, devida à aquisição de resistência pelo vírus contra as drogas devido à sua alta taxa de mutação, ou pelos vários efeitos colaterais associados. Portanto, o desenvolvimento de estratégias capazes de eliminar os reservatórios virais e de gerar proteção contra a infecção fechando a porta de entrada para o HIV se fazem necessárias. Até o momento, há o registro de apenas um caso de cura da infecção HIV, do paciente Timothy Ray Brown, também conhecido como “o paciente de Berlim”, que recebeu um transplante de medula óssea de um doador homocigoto para o polimorfismo CCR5 Δ 32 (esse polimorfismo em homocigose confere resistência ao vírus HIV e sua frequência é de cerca de 5% na população caucasiana) ⁴. Tentativas no sentido de repetir esse experimento não obtiveram sucesso ⁵.

Já houve diferentes tentativas na eliminação da infecção pelo HIV, porém nenhuma com sucesso clínico. A erradicação dos reservatórios virais nos diversos tipos celulares é o principal passo a ser dado para atingirmos a cura da infecção pelo HIV, tendo em vista que, mesmo iniciando cedo a terapia antirretroviral, os reservatórios estão sendo formados, entretanto; em menor tamanho. A estratégia “shock and kill” busca expulsar o vírus desses reservatórios, expondo-o a terapia antirretroviral e ao ataque dos linfócitos T citotóxicos. Apesar de bastante agressiva, essa estratégia mostrou-se insuficiente para promover a morte

de todas as células infectadas, resultando em uma pequena redução dos reservatórios ⁶. O uso de anticorpos neutralizantes específicos para as proteínas do envelope viral obteve sucesso moderado *in vitro* e a combinação desses anticorpos garantiu proteção completa contra o vírus HIV em macacos ^{7,8}. Entretanto, em um teste clínico, a combinação de diferentes anticorpos monoclonais foi incapaz de garantir proteção, pois houve escape viral e os pacientes tiveram que retomar a terapia antirretroviral ^{9,10}.

A aplicação da terapia gênica como uma forma de combate à infecção pelo HIV ganhou espaço após as tentativas frustradas em reproduzir o experimento que levou à cura do paciente de Berlim; a variante mais dominante do vírus HIV-1 é a R5, que utiliza como co-receptor de entrada o receptor de quimiocina CCR5. Indivíduos homozigotos para o alelo CCR5Δ32 são resistentes a infecção. Os esforços da terapia gênica buscaram, inicialmente, promover a disrupção desse gene impedindo a expressão do co-receptor CCR5 na superfície celular. Ao longo do tempo, as ferramentas de edição gênica sofreram modificações, possibilitando o estudo de novas abordagens anti-HIV, como a eliminação do genoma pró-viral das células infectadas, e a reversão da latência, buscando expulsar o vírus dos reservatórios. Diferentemente do tratamento convencional contra a infecção, a terapia gênica fornece a possibilidade da alteração de fatores de risco que corroboram para entrada do vírus; além disso, a eliminação/excisão do genoma pró-viral em células infectadas por meio das técnicas de edição de DNA pode significar um grande passo para a erradicação do vírus e já começou a ser testada ¹¹.

Exemplos de ferramentas de edição gênica já empregadas no combate ao HIV incluem as Cre-recombinases, as nucleases “dedo de zinco” (*Zinc Finger Nuclease - ZFN*) e as TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nuclease*). A terapia que se encontra em estágio mais avançado no momento envolve o emprego das ZFN na modificação genética de células T CD4+ retiradas de pacientes soropositivos. Tebas e colaboradores ¹² promoveram a modificação de linfócitos T CD4+ de pessoas soropositivas através das ZFN. No estudo de fase I, 12 pacientes receberam linfócitos T CD4+ com o gene CCR5 inativado; foi observado uma rápida redução na carga viral e aumento da população dos linfócitos T CD4+ nas primeiras semanas. As células modificadas exibiram vantagem adaptativa em comparação as células não modificadas, porém como somente uma pequena parcela de células T CD4+ apresentou a disrupção do gene CCR5, o pool de células T CD4+ permaneceu em declínio (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03617198>).

Uma outra técnica de terapia gênica que promete ser importante em estratégias contra o HIV é o sistema CRISPR/Cas9. O sistema CRISPR/Cas9 é um importante mecanismo de defesa utilizado por bactérias e arqueobactérias contra genomas invasores, vírus e plasmídeos, capaz de reconhecer sequências específicas de DNA e clivá-las a partir de um RNA guia que direciona a enzima Cas9 - uma endonuclease que realiza a quebra de dupla-fita de DNA - até o sítio de clivagem. Após a clivagem da sequência alvo, o DNA dupla-fita é reparado pelo mecanismo de união de extremidades não homólogas (do inglês NHEJ – *Non Homologous End Joining*). Esse sistema de reparo é sujeito a erros, causando inserções ou deleções (indels) que desestabilizam o DNA culminando na produção de polimorfismos e, frequentemente na inativação de genes ¹³. Desde 2013, diferentes grupos de pesquisa têm empregado estratégias de combate à infecção pelo HIV que incluem o complexo CRISPR/Cas9 na tentativa de inativação ou eliminação do vírus impedindo processos como a replicação, transcrição e expressão de proteínas virais ¹⁴. O sistema CRISPR também vem sendo usado tendo como alvo os co-receptores de entrada do vírus nas células com o objetivo de evitar a infecção das mesmas e para a reversão do estado latente, a fim de reativar a expressão viral para reconhecimento e morte das células infectadas. Nesta revisão, serão abordados as diferentes estratégias do emprego do sistema CRISPR/Cas9 no combate ao HIV e os sucessos e limitações do emprego da técnica em cada estratégia.

O sistema CRISPR/Cas9

A sigla "CRISPR" vem do inglês "*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*" e significa “repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas”. Este sistema riboproteico é derivado do sistema imune adaptativo desenvolvido por bactérias e arqueobactérias contra material genético invasor como o de bacteriófagos e plasmídeos. As bactérias e arqueobactérias adquirem resistência integrando um fragmento do genoma invasor ao locus do CRISPR. A transcrição do locus gera transcritos de RNA, também conhecidos como crRNA (RNA CRISPR) ou gRNA (RNA guia), que irão associar-se à endonuclease Cas9 e guiá-la até o sítio específico, por complementaridade, para clivar o DNA exógeno. As sequências CRISPR foram descobertas em 1987, quando o grupo de pesquisa do Dr. Atsuo Nakata identificou inúmeras sequências repetidas em *E.coli* ¹⁵; no entanto, estas sequências só foram denominadas CRISPR 15 anos após sua descoberta. Os genes das endonucleases associadas ao sistema CRISPR,

reconhecidos como Cas (*CRISPR-associated*), foram identificados no mesmo período. O avanço da biologia molecular permitiu a revelação da função dos CRISPR em 2007, porém o enorme potencial biotecnológico desse sistema levou mais alguns anos até ser explorado. Em 2012, Jinek e colegas ¹⁶ induziram a clivagem de DNA através de sequências de RNA programadas com CRISPR, e no ano seguinte, Mali e colaboradores ¹⁷ realizaram a edição de células de mamíferos com o sistema CRISPR/Cas9. Desde então, houve um enorme progresso no desenvolvimento de novas aplicações para o sistema CRISPR, revolucionando o campo da biologia molecular.

Antes da "era CRISPR", as principais ferramentas de edição genética eram as ZFN e TALEN. Ambas são endonucleases de restrição compostas com um domínio para o reconhecimento do alvo e outro domínio de atividade catalítica. Diversas estratégias anti-HIV já foram realizadas com o auxílio destas técnicas, porém um fator limitante é a acomodação dessas proteínas em alguns vetores além da dificuldade de gerar os construtos devido ao anelamento incorreto dos nucleotídeos (observada nas TALEN). O sistema CRISPR/Cas9 é considerado bastante flexível comparado aos demais devido à facilidade em gerar os constructos de gRNA possibilitando a edição de mais de um gene ao mesmo tempo. O pequeno tamanho das proteínas associadas ao CRISPR permite a inserção desse sistema em vetores virais, que apresentam capacidade limitada no que diz respeito ao tamanho da sequência a ser incorporada.

O dano ao DNA causado pela Cas9 pode ser reparado por dois tipos de mecanismos conforme a fase do ciclo celular. A recombinação não homóloga, chamada de união de extremidades não homólogas (NHEJ), é propensa a erros e introduz mutações - principalmente, inserções e deleções - que podem levar à disrupção de um gene alvo. O mecanismo de recombinação homóloga acontece somente quando há uma sequência homóloga de DNA no núcleo sendo restrita às fases S e G2 do ciclo celular.

Existem diferentes tipos de Cas9 vindas de dois gêneros principais de bactérias, *Streptococcus* e *Staphylococcus*. A função da endonuclease é a mesma, entretanto o peso molecular entre elas difere. Atualmente, o sistema CRISPR/Cas9 possui 3 variantes: a Cas9 clássica, a Cas9D10A e a dCas9, a seguir descritas:

- A Cas9 clássica provoca quebras na dupla fita de DNA ativando o mecanismo de NHEJ suscetível a erro, levando à introdução de indels que inativam um gene.

- A variante Cas9D10A é uma *nickase*, ou seja, uma nuclease que cliva apenas uma das fitas de DNA e, dessa maneira, o mecanismo de reparo de DNA por NHEJ não é ativado. Porém, para que o mecanismo de recombinação homóloga aconteça é necessária a presença de um molde com homologia para sequência clivada ¹⁸. Essa variação permite a correção de uma sequência de interesse ou a inserção de uma mutação de ponto.
- Mutações em ambos os sítios catalíticos da enzima Cas9 tornam-na incapaz de realizar clivagens no DNA (dCas9), mas ela ainda retém a capacidade de ligar-se ao DNA e, quando direcionada pelo gRNA até a região alvo, atrai fatores de transcrição, formando um domínio efetor podendo ativar ou silenciar um gene específico. Dessa forma, o uso da dCas9 pode ser empregado na modulação da expressão gênica.

A transferência do sistema CRISPR/Cas9 é mediada por vetores não virais, como plasmídeos, ou virais, como lentivírus, adenovírus ou adeno-associados (AAV). A eficiência da transfecção e da expressão do gRNA/Cas9 podem variar conforme o sistema de transferência e o tipo celular a ser transfectado.

O emprego do sistema CRISPR vem sendo amplamente estudado para o tratamento de doenças infecciosas, câncer, desordens genéticas, distúrbios neurológicos (doença de Huntington e Alzheimer) e doenças autoimunes (revisado por Khan *et al.*) ¹⁹. Particularmente, no que diz respeito às infecções virais, o sistema CRISPR tem sido empregado com sucesso em ensaios celulares. Células doadas por um paciente com linfoma de Burkitt e com infecção latente do vírus Epstein-barr (EBV) apresentaram declínio da carga viral, assim como redução da proliferação após o tratamento com CRISPR ²⁰. No caso do HPV, a edição genética dos oncogenes *E6* e *E7* através do sistema CRISPR introduziu mutações que inativaram-nos e promoveu a ativação de genes antitumorais como o *p53* e *Rbp* ²¹. Em um trabalho recente, o vírus da hepatite B foi alvo da terapia com CRISPR. Zhen *et al.*, realizaram um experimento em cultura de células e “in vivo” com gRNA multiplex afetando as regiões HbsAg e HBx do vírus; a expressão desses antígenos foi reduzida, assim como a quantidade do DNA viral circulante ²².

METODOLOGIA

Será feita uma análise crítica da literatura atual sobre o uso do sistema CRISPR/Cas9 no combate ao HIV como estratégia curativa e preventiva. A revisão de artigos de dados permite verificar o andamento de estudos que utilizam o sistema CRISPR/Cas9 em diferentes fases da infecção viral. Os artigos de revisão permitem uma comparação mais detalhada perante as diferentes estratégias desenvolvidas para o combate ao HIV, abordando também suas limitações e implicações da técnica. As questões éticas envolvidas, no debate do uso clínico de técnicas de engenharia genética, serão avaliadas a partir de artigos editoriais e de revisão. As diferentes estratégias serão classificadas conforme o mecanismo de ação, comparadas quanto aos resultados obtidos entre os diferentes mecanismos e serão avaliados e ponderados os riscos/benefícios associados a cada estratégia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estratégias de combate ao HIV pelo emprego do sistema CRISPR podem envolver diversas variações tais como a inativação do genoma pró-viral, com ou sem excisão parcial ou completa do mesmo, a alteração da expressão dos co-receptores de entrada do vírus nas células e a reativação do genoma pró-viral, também chamada de reversão de latência (buscando expulsar o vírus para fora dos reservatórios e tornando-o vulnerável ao tratamento antirretroviral e ao sistema imune). Todas essas estratégias foram testadas com maior ou menor sucesso e serão detalhadas a seguir (Figura 1).

Inativação do genoma pró-viral

A eliminação do reservatório viral das células infectadas em estado latente é o maior obstáculo para que uma cura funcional para a infecção pelo HIV seja alcançada. Vários grupos de pesquisa vêm utilizando o sistema CRISPR/Cas9 para promover uma disrupção do genoma pró-viral e, conseqüentemente, a sua inativação. Nesses estudos, as regiões-alvo do tratamento incluem as LTR (do inglês “*Long Terminal Repeat*”) e genes estruturais (como os genes *gag* e *pol*) porque são regiões bastante conservadas - mesmo entre diferentes subtipos do HIV-1 – e a introdução de mutações nestas regiões específicas compromete a replicação viral. O fato de o DNA pró-viral conter LTRs em ambas as extremidades do genoma viral integrado permite o desenho de estratégias baseadas em CRISPR para promover a excisão completa dos genes entre as LTRs. A excisão do genoma pró-viral pode ocorrer de maneira completa ou seja, a clivagem em ambas LTRs provoca a deleção da sequência entre as

extremidades 5' e 3' do genoma do HIV. Alternativamente, a introdução de hipermutação pode levar à inativação viral, tornando o vírus incapaz de realizar a replicação²³.

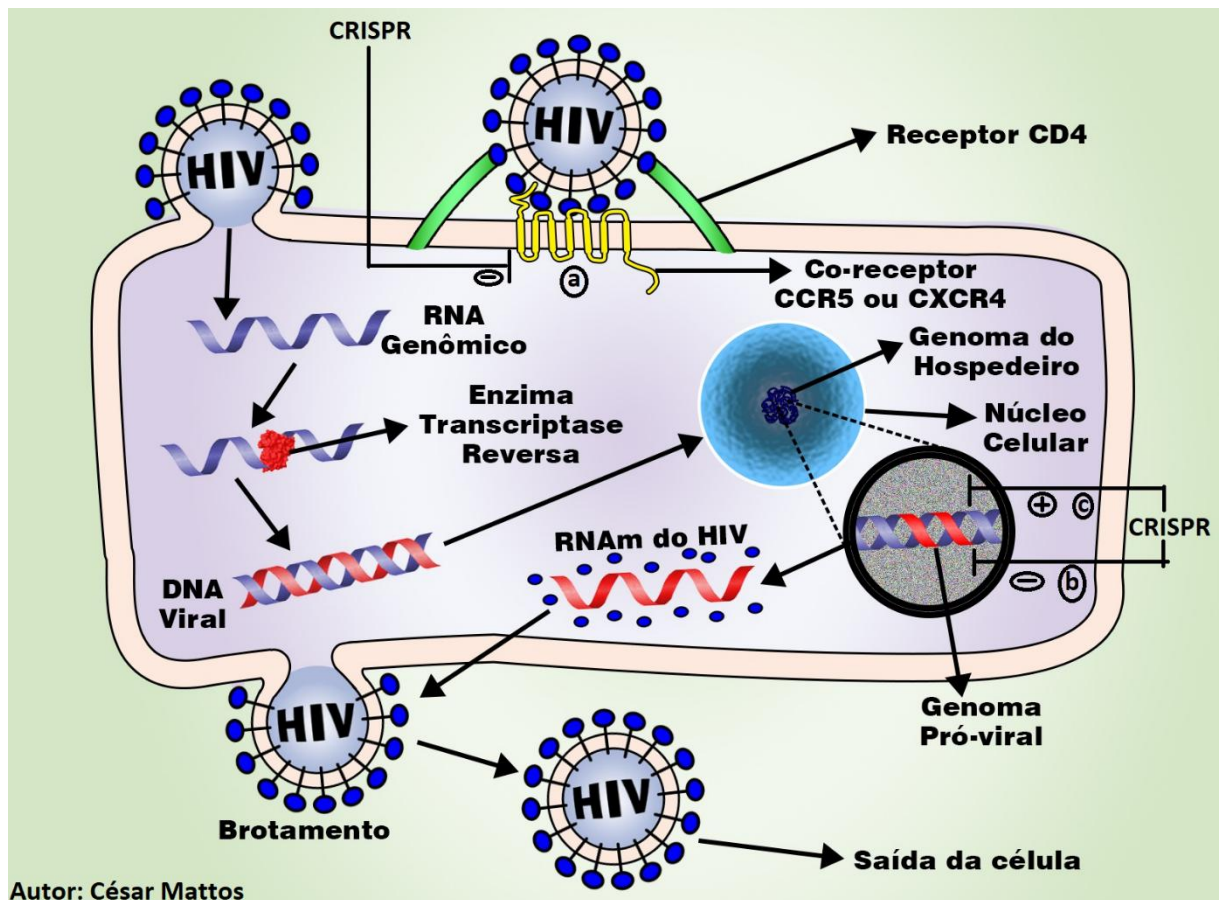


Figura 1 – Ciclo de vida do HIV e as diferentes estratégias empregadas pelo sistema CRISPR/Cas9 para eliminação da infecção. a) Alteração da expressão dos co-receptores CCR5 e CXCR4 fechando as portas de entrada do vírus; b) inativação/excisão do genoma pró-viral impede a replicação do HIV e c) reversão da latência expulsa o vírus dos reservatórios expondo-o ao efeito da terapia antirretroviral e ao ataque das células T CD8+ provocando a morte das células infectadas.

Ebina *et al.* realizaram o primeiro trabalho utilizando o sistema CRISPR/Cas9 em modelos celulares de infecção pelo HIV. As linhagens HeLa e 293T foram infectadas com um constructo pró-viral expressando as proteínas Tat e GFP sob o controle do promotor localizado nas LTR, mimetizando uma infecção verdadeira pelo HIV. Essas linhagens foram posteriormente transfectadas com plasmídeos contendo dois gRNAs e um terceiro plasmídeo contendo o gene para a enzima Cas9 humanizada (hCas9). Os gRNAs desenvolvidos possuíam alvos dentro da LTR – a região TAR (“Trans-activation response element”) e o sítio de ligação de NF-κB (fator de transcrição do hospedeiro que promove a replicação viral); o sistema CRIPR produziu indels nestas regiões levando à disrupção da expressão do vírus

HIV-1, o que foi demonstrado pela redução no número de células GFP positivas e uma menor intensidade de fluorescência em cada célula. O sequenciamento da região TAR indicou a presença de mutações, as quais foram introduzidas pelo mecanismo de reparo suscetível a erro (NHEJ) após a quebra do DNA viral pela enzima hCas9. Os autores também foram capazes de inibir a reativação do genoma pró-viral em células Jurkat C5 e C19, duas linhagens que mimetizam o estado latente da infecção. O efeito foi maior com sucessivas transfecções dos plasmídeos com a Cas9 e os gRNA. Adicionalmente, os autores testaram a capacidade de empregar o sistema CRISPR para a excisão do genoma viral. Nesse experimento, células Jurkat infectadas por um HIV-1 alterado, sem a região U3 e com um fator de alongação para GFP, receberam plasmídeos contendo gRNAs contra a LTR e hCas9. Houve uma redução no número de cópias do DNA de EGFP após o tratamento, e a excisão do genoma pró-viral foi confirmada através de PCR. Apesar de em nenhum dos experimentos ter se observado inativação/excisão completa do genoma viral, esse trabalho foi importante para demonstrar o conceito do sistema CRISPR como uma ferramenta de combate à infecção por HIV ¹⁴.

Em uma estratégia semelhante, Hu *et al.* testaram o sistema CRISPR/Cas9 em linhagens celulares mieloides (CHME5 é um modelo de infecção latente em células da microglia, e a célula U1 é um modelo do estágio latente em macrófagos e monócitos), que são tipos celulares primários para persistência do vírus no cérebro. O sistema CRISPR foi capaz de promover a excisão do genoma pró-viral, protegendo as células tratadas contra a reativação da expressão viral após a exposição à histona-desacetilase tricostatina A. Além disso, os autores demonstraram que as células que mantiveram os plasmídeos com Cas9 e os gRNA exibiram proteção contra a reinfecção por variantes do HIV ²⁴. Liao *et al.* trataram células 293T e células Jurkat 10.6 com gRNAs combinados e sozinhos, e foi observado a introdução de indels nas regiões-alvo das LTRs - R e U3 - além da excisão do genoma pró-viral. As culturas de células tratadas por dois gRNAs exibiram maior eficiência na clivagem do genoma pró-viral comparadas às culturas que receberam apenas um único gRNA ²⁵; outros grupos obtiveram o mesmo resultado ^{26, 27}.

Zhu e colaboradores utilizaram células da linhagem Jurkat contendo o genoma viral (J-Lat 10.6) como modelo da infecção latente, já que, nessa linhagem, a região promotora da LTR é pouco acessível à maquinaria de transcrição. O tratamento com TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias ativaram o fator de transcrição NF-kB, que possui dois sítios de ligação na LTR viral, resultando na ativação da expressão gênica viral. Após essa reversão da latência, as células foram tratadas com CRISPR/Cas9 contra a LTR viral, exibindo uma

redução da expressão gênica viral e, conseqüentemente, uma menor produção do vírus. O efeito observado foi atribuído à introdução de mutações na região alvo promovida pelo sistema CRISPR/Cas9, que incluía o sítio de ligação do NF- κ B, o que reduziu o efeito estimulante promovido pelo TNF- α ²⁸.

Trabalhos mais recentes obtiveram a excisão do genoma pró-viral em culturas de células e modelos animais. Kaminski *et al.* demonstraram a excisão do genoma pró-viral em 100% das células 2D10, uma linhagem de células linfocíticas, sem nenhum sinal de transposição. Os gRNAs criados dirigiram a clivagem pela enzima Cas9 nas duas extremidades do genoma pró-viral e, essa clivagem levou a introdução de indels nas regiões codificantes entre as extremidades 5' e 3'. Também foi observada uma supressão da infecção em células T CD4+ preparadas de pessoas saudáveis. Os autores inseriram o sistema CRISPR em um vetor lentiviral. Nesse experimento, as células T CD4+ foram infectadas por uma variante X4 e, depois de detectada a infecção, essas células receberam o gRNA/Cas9 por um vetor lentiviral. A expressão do gRNA/Cas9 suprimiu a infecção, resultado de um declínio do número de cópias do HIV nas células T CD4+ tratadas. Dentro do mesmo estudo, os autores demonstraram o efeito do sistema CRISPR/Cas9 nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células T CD4+ de quatro pacientes sob terapia antirretroviral. Em dois dos quatro pacientes, as células que expressaram o gRNA/Cas9 tiveram uma redução significativa do número de cópias do vírus – a redução foi de 81% e 92% para as PBMC. Para as células T CD4+, esses mesmos dois pacientes apresentaram uma redução de 92% e 56% no número de cópias virais. A quantidade da proteína p24, proteína do capsídeo viral, também apresentou redução nas células T CD4+, de 71% a 39% ²⁹.

Estudos *in vivo* utilizando o camundongo transgênico Tg26, que possui parte do genoma viral, revelaram a excisão do genoma pró-viral quando tratados com o gRNA/saCas9 (Cas9 da bactéria *Staphylococcus aureus*) via um vetor viral adeno-associado. Após o término do tratamento, os animais foram sacrificados, e os linfócitos T extraídos de diferentes órgãos (coração, pulmões, fígado, rins, sangue, medula e cérebro) foram analisados. A amplificação do DNA dos linfócitos registrou a presença de um fragmento truncado e o sequenciamento confirmou a excisão de uma sequência de DNA entre o gRNA-LTR e o gRNA-gag. A excisão do genoma viral nos linfócitos foi acompanhada da observação da redução da carga viral nos animais de aproximadamente 80% ³⁰. Yin e colegas também promoveram a excisão parcial do genoma pró-viral em camundongos de diferentes linhagens. Neste trabalho, houve excisão parcial do genoma pró-viral nos animais que receberam um vetor AAV contendo gRNA

duplex ou quadruplex e a endonuclease Cas9, levando a uma supressão da infecção em diversos órgãos. Um screening revelou a presença de várias indels e excisões de fragmentos do genoma pró-viral³¹.

Apesar dos resultados satisfatórios, outros estudos utilizando a mesma estratégia do uso do CRISPR para a inativação do genoma pró-viral observaram escape viral. Wang Z *et al.* avaliaram a replicação a longo termo do vírus em uma linhagem de células linfocíticas SupT1, Jurkat e TZM-bl. Foram construídos 2 sgRNAs, um deles específico para região ORF dos genes gag/pol e outro específico para região ORF dos genes env/rev, dois domínios bastante conservados entre diferentes subtipos do HIV-1. Depois da transfecção com plasmídeos contendo os sgRNAs, as culturas de células foram infectadas pela variante X4 do HIV-1. Inicialmente, houve uma redução do número de células infectadas. As culturas tratadas tiveram seu DNA coletado, amplificado e sequenciado. O sequenciamento destes produtos identificou o surgimento de diversas mutações no sítio de clivagem de Cas9 que levaram ao escape viral após 14 dias. O acúmulo de mutações no sítio de clivagem da endonuclease impossibilitam um novo reconhecimento pelo gRNA usado indicando resistência ao tratamento, o que favoreceu a seleção de cepas resistentes. As regiões essenciais para replicação apresentaram mais substituições do que deleções e o contrário foi observado em regiões pouco conservadas ou de menor importância para replicação viral³². Em um modelo semelhante com as mesmas linhagens, Wang *et al.* atingiram a inibição da replicação por um período de tempo um pouco maior. Diversos sgRNAs combinados foram capazes de introduzir indels nos domínios altamente conservados como as LTR, genes gag, pol, env, tat e rev; entretanto, não evitaram o escape viral. Novamente, as mutações acumularam-se próximas ao sítio de clivagem de Cas9 após 21 dias de cultura³³. Em sua revisão, Liang *et al.* sugeriu o uso de novas variantes de Cas9 que sejam capazes de clivar fora da região alvo, o que permitiria a preservação do reconhecimento do sítio definido pelo gRNA, permitindo múltiplos rounds da ação do CRISPR evitando assim a resistência viral³⁴. No entanto, até o momento, essa abordagem não foi tentada por nenhum grupo de nosso conhecimento.

Outros grupos (Yoder & Bundschuh (2016) e Lebbink *et al.*, (2017)) também desenvolveram sgRNAs combinados tanto contra regiões LTR quanto contra os genes gag e pol com o objetivo de promover a inativação do genoma viral, todas com sucesso limitado. As células tratadas, quando desafiadas pelo vírus, apresentaram proteção apenas em uma fase inicial da infecção^{35, 36}. Mesmo atacando as LTRs, Yoder & Bundschuh (2016) não

observaram o mesmo mecanismo de excisão relatado em outros estudos ^{35, 23}. Foram identificadas substituições de bases nestas regiões sem comprometimento da fase de leitura.

Ophinni *et al.* realizaram um experimento com vários gRNAs em um mesmo vetor tendo como alvo as proteínas tat e rev, que são essenciais para manutenção da latência e da transcrição. Células J-Lat 10.6 foram usadas como modelo. O complexo gRNA multiplex/Cas9 foi capaz de suprimir a replicação das células em estado latente sem uma ativação prévia do genoma proviral, porém a inibição não foi total. A seleção de mutações não deletérias ao vírus induzidas pelo sistema CRISPR/Cas9 contribuíram para o escape viral nesse modelo ².

Em conjunto, esses resultados demonstraram a capacidade do HIV adquirir resistência ao tratamento com esse sistema quando sequências pouco conservadas são atacadas. O acúmulo de mutações próximo ao sítio de clivagem impossibilita o reconhecimento da sequência alvo pelo gRNA desenvolvido. Quanto mais conservada for a sequência alvo, maiores são as chances de uma inibição prolongada da replicação viral; outro ponto importante a ser destacado é a alta taxa de mutação do HIV que é proporcionada pela baixa fidelidade da transcriptase reversa, a qual não possui mecanismo “proofreading”. Assim sendo, uma estratégia mais segura para o combate ao vírus seria uma abordagem indireta, proporcionando proteção às células evitando a entrada do vírus.

Inibição da infecção pelo ataque ao DNA viral

O complexo CRISPR/Cas9 pode fornecer uma defesa intracelular contra o HIV através de gRNAs com alta atividade antiviral, conferindo prevenção e inibição da integração do genoma viral no DNA da célula do hospedeiro. Diversos estudos demonstraram redução da expressão gênica do HIV, pois o complexo CRISPR é capaz de atacar o DNA viral antes da sua integração no genoma da célula hospedeira.

Guo *et al.* promoveram a inibição da integração viral em um modelo *in vitro* utilizando um complexo diferente de CRISPR, substituindo a endonuclease Cas9 por uma endoribonuclease chamada Cys4. A endoribonuclease Cys4 liga-se a uma proteína viral acessória (VPR) que direciona o complexo CRISPR/Cys4 até o vírus e impede a infecção em dois estágios diferentes: a transcrição de RNA em cDNA e a integração do cDNA ao genoma do hospedeiro. As linhagens linfocíticas 293T e GHOST receberam um vetor lentiviral contendo Cys4 e um gRNA com especificidade para a LTR; após a transfecção do vetor plasmidial, a cultura foi infectada pelo HIV-1. As células tratadas apresentaram um bloqueio

quase total da infecção viral; também a montagem das proteínas virais foi reduzida em um modelo de empacotamento viral conduzido pelo mesmo grupo. Uma limitação desse estudo é que, não obstante os resultados positivos, não houve avaliação de longo prazo do efeito da abordagem ³⁷.

Alteração da expressão dos co-receptores de entrada do vírus HIV

A capacidade do sistema CRISPR/Cas9 de editar células do hospedeiro pode ser usada para tornar as células normalmente infectáveis pelo HIV resistentes à infecção pelo vírus. O vírus utiliza, além do CD4+, um de dois co-receptores para entrar na célula hospedeira – os receptores de quimiocina CCR5 e CXCR4. A ocorrência natural de um polimorfismo no gene *CCR5* na população (*CCR5Δ32*) confere resistência à infecção, pois o co-receptor de entrada do vírus HIV nas células deixa de ser funcional, impedindo assim a entrada do vírus R5, que tem tropismo pelo receptor CCR5. A indução de mutações no gene *CCR5* a partir do sistema CRISPR/Cas9 seria uma alternativa viável ao combate do HIV. Entretanto, com o avanço da infecção, observam-se formas virais com tropismo para o CXCR4 (X4) e para ambos os receptores (X4R5). Até o momento, foram testadas abordagens envolvendo CRISPR tanto para a edição de um dos receptores quanto contra ambos os receptores simultaneamente.

Wang e colaboradores induziram a disrupção do gene *CCR5* em células linfocíticas TZM e células T CD4+ primárias, que passaram a não expressar o co-receptor CCR5 e apresentaram uma vantagem adaptativa durante a infecção HIV por uma variante R5 em comparação às demais células que expressavam CCR5. As células CCR5-negativas adquiriram resistência ao vírus ³⁸. O efeito do silenciamento do gene na resistência ao HIV foi confirmado por um estudo independente, utilizando um outro gRNA para silenciar o gene ³⁹. A indução da mutação *CCR5Δ32/Δ32* foi testada em um modelo animal de camundongos e conferiu resistência ao HIV (queda significativa na carga viral), proporcionando também a reconstituição da população de células T CD4++ nos animais tratados ⁴⁰.

Além da existência de uma variante HIV-X4, em estágios mais avançados da infecção, variantes HIV-R5 podem vir a utilizar também o co-receptor CXCR4 de maneira alternativa para invadir as células do hospedeiro, tornando mais agressivo o quadro de infecção do paciente. Logo, o emprego da técnica CRISPR/Cas9 tendo como alvo o gene *CXCR4* seria uma alternativa viável para conferir resistência ao vírus. Para manipulação de *CXCR4* nas células Jurkat e nas células T CD4+, Hou *et al.* projetaram 2 sgRNAs com alto escore de especificidade para o *CXCR4* na busca de evitar o risco de efeitos *off-target* que pudessem

comprometer a viabilidade das células. A inativação do gene *CXCR4* garantiu resistência ao HIV: A produção de p24 diminuiu 64% nas células tratadas em comparação ao grupo controle, indicando uma proteção parcial ⁴¹.

Sabendo da importância de *CXCR4* para a diferenciação tímica, a migração e o *homing* de células hematopoiéticas, a alteração de expressão desse gene pode promover efeitos indesejáveis. Esta foi a razão para a indução de uma mutação pontual em *CXCR4* sem alterar sua expressão ⁴². O sistema CRISPR/Cas9 foi usado para provocar uma mutação em uma região codificadora, no códon 191 do gene *CXCR4* (P191A), por recombinação homóloga. A substituição da prolina original pela alanina nessa posição diminuiu a atividade de co-receptor para o HIV, impedindo a ligação e a sinalização dependente de cálcio que permite a entrada do vírus na célula. Células que apresentavam a mutação 191A resistiram à infecção por uma variante X4.

Apesar de resultados promissores terem sido observados com a edição de um ou outro receptor, parece evidente que estas estratégias isoladas não são suficientes para produzir uma proteção completamente efetiva contra a infecção em indivíduos infectados. Assim sendo a mutação de ambos co-receptores se faz necessária para garantir proteção contra o vírus HIV. Antes do CRISPR, outras abordagens envolvendo edição gênica foram testadas com o intuito de bloquear ambos os receptores. Especificamente, Tebas *et al.* modificaram o gene *CCR5* *ex vivo* em células T CD4⁺ autólogas de pacientes infectados com HIV usando ZFN. As células modificadas apresentaram vantagem adaptativa em comparação as células não modificadas. Pelo fato de as células T CD4⁺ modificadas constituírem uma minoria do pool de células T, a população total de células T CD4⁺ seguiu decaindo após a reinfusão ¹².

Liu *et al.* promoveram o primeiro estudo envolvendo um *knockout* em ambos os co-receptores *CCR5* e *CXCR4* em linhagens linfocíticas usando CRISPR. Dois gRNAs específicos para cada co-receptor foram inseridos juntos em um único plasmídeo; células GHOST foram utilizadas como modelo, por expressarem ambos os co-receptores em altos níveis. Após o tratamento com o sistema CRISPR/Cas9, as células GHOST apresentaram uma redução parcial na expressão dos co-receptores na superfície celular e, quando desafiadas pelas variantes R5 e X4, exibiram proteção parcial, devido à incapacidade do propocolo em promover a disrupção dos genes na maioria das células. A seguir, foi testada a disrupção desses co-receptores em células T CD4⁺ primárias; pouquíssimas células foram mutadas devido ao método de transfecção empregado (eletroporação), mas mesmo assim as células mutadas demonstraram resistência à infecção ⁴³. Songlin *et al.* também realizaram um

knockout simultâneo nos co-receptores. Novamente, o tratamento com CRISPR/Cas9 em linhagens celulares induziu a mutação em ambos os genes *CXCR4* e *CCR5* garantindo proteção parcial contra o vírus. Porém, na tentativa de realizar a disrupção desses dois genes em células T CD4+ primárias, o vetor lentiviral contendo os gRNAs e a endonuclease Cas9 foi incapaz de promover a incorporação do sistema CRISPR/Cas9⁴⁴.

A tecnologia CRISPR/Cas9 apresenta uma estratégia mais factível para garantir a resistência ao HIV em comparação à realização do transplante de medula óssea de indivíduos homocigotos para *CCR5* Δ 32/ Δ 32 devido aos riscos enfrentados pelo procedimento, como incompatibilidade e rejeição. No entanto, as limitações impostas pelo sistema CRISPR/Cas9 precisam ser vencidas, incluindo a utilização de vetores seguros e mais eficientes para obtenção de melhores resultados. Os potenciais efeitos off-target também são um desafio para aplicação dessa tecnologia em fatores celulares, principalmente pela homologia observada entre os genes *CCR5* e *CCR2*, assim como os possíveis efeitos adversos resultantes do *knockout* do co-receptor *CXCR4*.

Reversão da latência

No período da infecção latente, a região promotora das LTRs encontra-se menos acessível à maquinaria de transcrição, pois múltiplos fatores - histonas desacetilases (HDAC) e outras enzimas modeladoras da cromatina - estão interagindo com essa região; esse estado condensado da cromatina leva ao silenciamento da transcrição do genoma viral. A reativação da expressão do HIV-1 constitui-se em uma estratégia de combate à infecção, na medida em que expõe estas células que estavam “escondidas” do sistema imune e da terapia antirretroviral, tornando-as alvo para a ação da resposta imune. Já existem fármacos conhecidos, como os LRAs (“Latency Reversing Agents”), que inibem as histonas desacetilases, tornando a estrutura da cromatina mais frouxa, e outros que ativam a proteína quinase C, que estimula a via de transcrição do NF- κ B e outras citocinas pró-inflamatórias, levando a ativação das células T. Entretanto, este tipo de tratamento afeta a expressão gênica em amplo espectro e apresenta efeitos genotóxicos, ao passo que o complexo CRISPR permite uma abordagem mais específica, diminuindo drasticamente as chances de efeitos inespecíficos em regiões não-alvo.

Zhang *et al.*, (2015) investigaram a capacidade do sistema CRISPR/Cas9 de ativar a expressão gênica viral mediada pela ativação da região LTR. Neste estudo, foi utilizada uma variante da enzima Cas9, a dCas9, uma enzima com mutação em ambos os sítios catalíticos.

A dCas9 é incapaz de clivar o DNA, mas pode ser associada a vários fatores que regulam a transcrição, podendo ativar ou silenciar genes alvos. Diversos modelos celulares de latência foram tratados com o sistema CRISPR utilizando diferentes vetores, e os resultados da reativação da expressão viral variaram entre as linhagens utilizadas, principalmente conforme o vetor utilizado para o *delivery* gênico. As células receberam também um gene repórter para avaliar a reversão do estado latente: quando a LTR era ativada, as células exibiam fluorescência a qual podia ser avaliada em quantidade e intensidade. A retomada da expressão viral na linhagem TZM-bl permaneceu por 21 dias e, mesmo depois de 3 passagens, estas células continuavam produzindo proteínas virais. Já a reversão da latência nas linhagens CHME5, um modelo de latência em células microgliciais, e 2D10, uma linhagem linfocítica, provocou a apoptose das células reativadas com eficiência variada (percentual de 80% nas células CHME5 e entre 10-28% para as células 2D10). A ativação da LTR levou à transcrição e expressão de proteínas virais tóxicas para o metabolismo celular; isso não afetou a sobrevivência das células vizinhas não infectadas, indicando que a apoptose foi decorrente do tratamento ⁴⁵.

Saayman *et al.* testaram a reativação da expressão viral com a variante dCas9-VP64 (construto incluindo a dCas9 e um complexo que recruta fatores de transcrição remodeladores de cromatina) e dois sgRNA contra regiões diferentes dentro da LTR do vírus HIV-1. O sistema utilizado como repórter foi o LTR-mCherry-IRES-Tat, em que a reversão do estado latente viral é observado através da expressão de mCherry, uma proteína fluorescente. Nesse experimento, apenas o sgRNA específico para o sítio de ligação do NF- κ B promoveu a reativação da expressão viral de maneira efetiva. O sgRNA induziu a expressão de mCherry em 85% das células da linhagem linfocítica CEM, obtendo sucesso apenas abaixo do grupo que foi tratado com a citocina TNF- α (90%), que ativa a via de sinalização do NF- κ B. Em contrapartida, células 293T que receberam o sgRNA antes de serem estimuladas pelo TNF- α não exibiram fluorescência, ou seja, não foram ativadas. Isso ocorreu pela competição pelo sítio de ligação entre sgRNA e NF- κ B e fortalece a ideia de que o sistema CRISPR/dCas9 age como um ativador da LTR independente do NF- κ B ⁴⁶.

A combinação do sistema CRISPR com agentes reversores de latência (LRA) provocou um aumento da atividade da LTR. Limsirichai *et al.* testaram duas variações do sistema CRISPR/Cas9 contendo complexos ativadores de transcrição – dCas9-VP64 e dCas9-SAM. Ambos os sistemas agem de maneira semelhante, atraindo fatores de transcrição e proteínas remodeladoras de cromatina. O sistema dCas9-VP64 proporcionou um pequeno

aumento da atividade da LTR, enquanto o dCas9-SAM obteve uma ativação mais robusta da LTR ⁴⁷. O uso de sgRNAs combinados atacando a LTR, observado anteriormente por Zhang *et al.*, produziu uma ativação maior da LTR ⁴⁵, todavia, em outros estudos, a combinação de sgRNAs não ativou ou exibiu uma pequena ativação da LTR ⁴⁶. Para análise de uma atuação sinérgica entre o complexo CRISPR e LRA, células J-Lat foram expostas aos inibidores de desacetilases SAHA e prostratina antes de receberem o sgRNA. SAHA é um inibidor de diferentes isotipos de histonas de classe 1 e que, durante um teste clínico, mostrou-se seguro e bem tolerado pelos pacientes, apesar de não manter a expressão viral a longo termo ⁴⁸. A reativação do HIV-1 foi de 70-80% em células J-Lat tratadas com SAHA e sgRNA. Combinação entre sgRNA, SAHA e prostratina induziu a ativação da LTR em 80% das células; entretanto, quando as células foram tratadas com sgRNA e prostratina, a ativação foi menor. O sgRNA se sobrepõe aos sítios de ligação de NF-κB na LTR e esta competição produziu esta menor ativação da expressão. Em uma abordagem semelhante, Ji *et al.* induziram a reativação da expressão viral em linhagens celulares (Jurkat, TZM-bI) com dois complexos: dCas9-VP64 e dCas9-SunTag-VP64. Ambos complexos promoveram a reversão do estado latente através do aumento da atividade da LTR estimulado por 2 gRNAs distintos. A combinação desses dois gRNAs não levou à reativação da expressão ⁴⁹.

Em resumo, comparado aos LRAs, o sistema CRISPR/Cas9 exibiu maior capacidade de reversão da latência, com a vantagem de apresentar atividade específica contra o genoma pró-viral e menores efeitos sobre a modulação da expressão gênica global. Entretanto, alguns dos problemas relacionados a essa estratégia são: a) nem todas as células infectadas são competentes para a replicação viral após a reversão da latência; b) o reservatório viral não é eliminado em 100% das vezes; c) a expulsão do vírus para fora do reservatório possibilita a infecção de novas células e d) conforme relatado por trabalhos anteriores envolvendo a reversão da latência, a mesma não é acompanhada de uma atividade citotóxica suficiente por parte das células T CD8+. ²⁹.

Discussão

O sistema CRISPR/Cas9 é uma potente ferramenta de edição genética que possui um amplo espectro de aplicação na infecção HIV. Os resultados até agora obtidos são bastante promissores, pois mesmo tendo sido descoberta após as outras técnicas de edição genética como as Cre-recombinases, ZFN e TALEN, o sistema CRISPR/Cas9 já foi capaz de obter

efeitos semelhantes contra o HIV em um intervalo menor de tempo. A criação dos construtos com o sistema CRISPR/Cas9 é mais flexível, possibilitando gerar mais de um gRNA para diferentes regiões, aumentando a eficiência da clivagem. Além disso, o tamanho do gene da enzima Cas9 é pequeno, o que facilita a inserção em diferentes vetores. Entretanto, o CRISPR/Cas9 apresenta limitações, como possíveis efeitos *off-target*, o fato de nem todas as células incorporarem ou expressarem o gRNA/Cas9 e, por fim, a limitação do tamanho do construto a ser incorporado em vetores virais, ainda que menor do que os outros sistemas.

O caso do paciente de Berlim impulsionou o desenvolvimento de estratégias anti-HIV a partir da terapia gênica visando a disrupção do gene *CCR5*. A variante HIV-R5 é a mais dominante na população e também a mais transmissível, por isso existe uma maior atenção ao co-receptor *CCR5*; a disrupção do gene *CCR5* não provoca alterações fenotípicas severas, embora seja fatal para a infecção pelo vírus do Oeste do Nilo. Já a modificação do gene *CXCR4* pode vir atrelada a uma série de complicações, pois a expressão desse co-receptor é essencial para a resposta imune⁵⁰. O sistema CRISPR/Cas9 apresentou capacidade de edição de ambos os genes *CCR5* e *CXCR4* (de maneira isolada e combinada) conferindo resistência contra as duas variantes HIV-R5 e HIV-X4, no entanto o impacto promovido por essa edição não saiu como o desejado pelas seguintes razões: a) as células modificadas ainda são minoria em comparação às células não modificadas devido à baixa incorporação do vetor contendo o gRNA/Cas9; b) a proteção contra à variante HIV-R5 é completa somente quando os dois alelos do gene *CCR5* são mutados, que é pouco observada em estudos *in vitro* e *in vivo*; c) para que haja a proteção completa contra à infecção, os 4 alelos devem apresentar mutações⁴⁴. Essas barreiras técnicas impedem a obtenção de resultados mais efetivos; além disso, o risco de efeitos *off-target* preocupa bastante devido a expressão contínua de um sistema de edição de DNA. Como já mencionado anteriormente, a disrupção exclusiva de um co-receptor é incapaz de conferir proteção contra à infecção e a capacidade de troca de tropismo pelo vírus exige uma abordagem mista buscando a inativação simultânea dos co-receptores *CCR5* e *CXCR4*. Efeitos adversos relacionados a deficiência da expressão do co-receptor *CXCR4* podem ser contornados através da indução de uma mutação de ponto, a qual mantém o co-receptor expresso, mas resistente ao vírus HIV. Assim sendo, a disrupção do gene *CCR5* junto da mutação P191A no gene *CXCR4* pode vir a ser uma abordagem viável evitando riscos de efeitos indesejáveis.

O sistema CRISPR/Cas9 é capaz de promover a inativação e até mesmo a excisão do genoma pró-viral. A introdução de indels na LTR viral e em genes-chaves leva à inativação

do vírus HIV, impossibilitando a replicação. A excisão também pode ocorrer através de um ataque à LTR por mais de um gRNA, promovendo a deleção da sequência codificante entre as duas extremidades. Esse sistema tem a vantagem de poder ser direcionado a mais de um alvo dentro do genoma pró-viral, diminuindo, em tese, o risco de escape viral. Entretanto, na prática, isso não tem ocorrido de maneira completa nos diferentes estudos que usaram essa abordagem. Abordagens atacando o HIV diretamente com o sistema CRISPR/Cas9 demonstraram a capacidade de resistência ao tratamento e o escape viral não foi prevenido. Grande parte dessa ineficiência no tratamento pode ser devida à alta taxa de mutação do vírus, resultado da incorporação de 1 nucleotídeo errado a cada 10.000 durante a transcrição reversa do RNA genômico viral em cDNA viral pela enzima transcriptase reversa, devido a ausência de *proofreading*. Isso contribui para a alta variabilidade genética do HIV, que já exibiu resistência contra diferentes drogas utilizadas em coquetéis antirretrovirais. A própria clivagem provocada pela endonuclease Cas9 ativa a via de reparo de DNA suscetível a erro, NHEJ, que promove o acúmulo de mutações na região próxima ao sítio de clivagem, impossibilitando o reconhecimento pelo gRNA previamente utilizado. Essa deficiência poderia ser contornada no futuro em parte pelo uso de enzimas associadas ao CRISPR, como Cpf1, que clivam sequências fora da região reconhecida pelo gRNA, possuindo uma vantagem adicional de apresentar menor tamanho em relação à Cas9.

Tentou-se contornar a resistência adquirida ao tratamento com o sistema CRISPR/Cas9 de forma análoga ao sucesso da terapia antirretroviral (diversas drogas que atacam diferentes fases do ciclo de vida do vírus HIV) através da combinação de diferentes gRNAs contra diferentes regiões do genoma pró-viral e utilizando ferramentas de *screening* funcional identificando regiões altamente conservadas do genoma pró-viral. O sucesso dessa abordagem ainda está longe de ser alcançado devido a complicações técnicas, pelo fato de o HIV já ter demonstrado a capacidade de adquirir resistência induzida pela clivagem da Cas9, o que não garante segurança da eficácia da aplicação dessa estratégia, e éticas expondo o ser humano aos riscos dos efeitos *off-target* (inserção de mutações deletérias diminuindo o *fitness* do indivíduo e a herança destas características) provocados pela introdução de um sistema de edição genômica.

A reversão da latência viral induzida pelo sistema CRISPR/dCas9 oferece uma grande vantagem em comparação aos fármacos LRAs, pois o estímulo é direcionado à LTR do vírus, com menor probabilidade de ocasionar efeitos adversos derivados da desregulação inespecífica associada aos LRA. No entanto, a latência viral é um estado bastante complexo

que é regulado por diversos fatores celulares, principalmente, a estrutura da cromatina. Sendo assim, nem todas as células infectadas irão responder ao tratamento, dificultando a redução do tamanho do reservatório viral. A estratégia “shock and kill” é usada para tentar eliminar a infecção da seguinte maneira: a) promover a reativação da expressão viral; b) seguida da morte das células infectadas pela resposta imune dos linfócitos T citotóxicos e pela terapia antirretroviral. Entretanto, alguns estudos já demonstraram que essa combinação não possui força suficiente para eliminar a infecção.

A extensão do poder associado ao uso das tecnologias de edição de DNA como o CRISPR, não obstante as atuais limitações técnicas, começa a suscitar questões sérias sobre os aspectos éticos do seu emprego. Recentemente, um cientista chinês revelou ter criado os primeiros bebês geneticamente modificados. O pesquisador chinês, He Jiankui, diz ter alterado embriões humanos com a ferramenta CRISPR/Cas9. Os embriões teriam tido o gene *CCR5* editado com o objetivo de gerar indivíduos imunes à infecção HIV (<https://www.nature.com/articles/d41586-018-07573-w>). Esse fato, caso confirmado, configura o início de uma nova página na história do Homem como agente interventor e modificador do seu ambiente em que vive, agora estendendo essa intervenção ao seu próprio genoma. Seria esse fato o prenúncio do universo distópico que nos é apresentado no filme “*Gattaca*”? Essa notícia está tendo grande repercussão, principalmente dentro da comunidade científica, dividindo opiniões diante desse ato precipitado, considerando que a infecção HIV é uma doença tratável atualmente, o que não justifica o uso de uma potente ferramenta de edição genômica considerando-se o impacto gerado por efeitos *off-target*.

CONCLUSÃO

A tecnologia CRISPR/Cas9 apresenta-se como uma ferramenta poderosa de edição genética, com potenciais aplicações futuras no combate à infecção pelo HIV. Entretanto, para que o emprego da técnica reverta em sucesso clínico, diversas limitações devem ser ultrapassadas para uma aplicação com mais segurança e melhores respostas ao tratamento.

- *Screenings* funcionais para identificação de *hotspots* para induzir a inativação ou excisão do genoma pró-viral de maneira eficiente;
- Combinação de diferentes gRNAs para o ataque de regiões conservadas do genoma do HIV-1, evitando o escape viral;

- Combinação entre o sistema CRISPR/Cas9 e a terapia antirretroviral buscando um efeito sinérgico. Os atuais testes clínicos utilizando a terapia gênica planejam uma interrupção na terapia antirretroviral, porém isso é bastante arriscado para os pacientes porque o rebote viral inicia poucas semanas desse intervalo, e a carga viral pode atingir valores próximos ao estágio inicial da infecção;
- Administração de outras drogas que possam regular a expressão da Cas9 no organismo;
- Utilização de vetores capazes de maximizar o número de células atingidas e minimização dos efeitos *off-target*;

É apenas uma questão de tempo para que o sistema CRISPR/Cas9 ultrapasse suas limitações técnicas, porém as questões éticas estarão sempre presentes e deverão ser discutidas e claramente regulamentadas para conter o uso indevido destas práticas de edição genômica incluindo o sistema CRISPR e outros que ainda virão.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais e familiares que me deram bastante apoio e incentivo nessa jornada, principalmente, meu avô Ruy, que apesar de não estar mais entre nós, sempre torceu muito para que eu pudesse realizar meus objetivos. Sou grato ao Prof. Tiago que aceitou encarar esse desafio e por todos ensinamentos e aprendizados adquiridos durante essa jornada. Esse trabalho não teria existido sem a ajuda dessas grandes pessoas.

REFERÊNCIAS

1. **UNAIDS. Global AIDS Update 2017.** (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, Geneva, 2017).
2. Ophinni, Y., Inoue, M., Kotaki, T., & Kameoka, M. (2018). **CRISPR/Cas9 system targeting regulatory genes of HIV-1 inhibits viral replication in infected T-cell cultures.** *Scientific Reports*, 8, 7784.
3. Darcis, G., Das, A. T., & Berkout, B. (2018). **Tackling HIV Persistence: Pharmacological versus CRISPR-Based Shock Strategies.** *Viruses*, 10(4), 157.

4. Timothy Ray Brown (2015). **I am the Berlin Patient: A Personal Reflection**
5. Henrich T.J., Hanhauser E., Marty F.M., Sirignano M.N., Keating S., Lee T.H., Robles Y.P., Davis B.T., Li J.Z., Heisey A., et al. **Antiretroviral-free HIV-1 remission and viral rebound after allogeneic stem cell transplantation: Report of 2 cases.** *Ann. Intern. Med.* 2014;161:319–327. doi: 10.7326/M14-1027.
6. Shan L, Deng K, Shroff NS, et al. **Stimulation of HIV-1-specific cytolytic T lymphocytes facilitates elimination of latent viral reservoir after virus reactivation.** *Immunity.* 2012;36(3):491-501.
7. Hessel, Ann J et al. **“Broadly neutralizing monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 directed against the human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane-proximal external region protect against mucosal challenge by simian-human immunodeficiency virus SHIVBa-L”** *Journal of virology* vol. 84,3 (2009): 1302-13.
8. Pham, H. T., & Mesplède, T. (2018). **The latest evidence for possible HIV-1 curative strategies.** *Drugs in context*, 7, 212522. doi:10.7573/dic.212522
9. Mehandru, S., Vcelar, B., Wrin, T., Stiegler, G., Joos, B., Mohri, H., Boden, D., Galovich, J., Tenner-Racz, K., Racz, P., Carrington, M., Petropoulos, C., Katinger, H., ... Markowitz, M. (2007). **Adjunctive passive immunotherapy in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals treated with antiviral therapy during acute and early infection.** *Journal of virology*, 81(20), 11016-31.
10. Trkola A, Kuster H, Rusert P, Joos B, Fischer M, Leemann C, Manrique A, Huber M, Rehr M, Oxenius A, Weber R, Stiegler G, Vcelar B, Katinger H, Aceto L, Gunthard HF. **Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies.** *Nat Med.* 2005;11:615–22.
11. Sarkar I, Hauber I, Hauber J, Buchholz F. **HIV-1 proviral DNA excision using an evolved recombinase.** *Science.* 2007;316(5833):1912–1915.
12. Tebas P, Stein D, Tang WW, et al. **Gene editing of CCR5 in autologous CD4+ T cells of persons infected with HIV.** *N Engl J Med.* 2014;370(10):901–910.
13. Zhu, W., Lei, R., Le Duff, Y., Li, J., Guo, F., Wainberg, M. A., & Liang, C. (2015). **The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA.** *Retrovirology*, 12, 22.
14. Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., & Koyanagi, Y. (2013). **Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus.** *Scientific Reports*, 3, 2510.
15. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. **Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product.** *J Bacteriol.* 1987;169(12):5429–5433.
16. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. **A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.** *Science.* 2012;337(6096):816–821.
17. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E. **RNA-guided human genome engineering via Cas9.** *Science.* 2013;339(6121):823–826.

18. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N. **Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.** *Science*. 2013;339(6121):819–823.
19. Khan, S., Mahmood, M. S., Rahman, S. U., Zafar, H., Habibullah, S., Khan, Z., & Ahmad, A. (2018). **CRISPR/Cas9: the Jedi against the dark empire of diseases.** *Journal of biomedical science*, 25(1), 29. doi:10.1186/s12929-018-0425-5
20. Yuen KS, Chan CP, Wong NH, Ho CH, Ho TH, Lei T, et al. **CRISPR/Cas9-mediated genome editing of Epstein-Barr virus in human cells.** *J Gen Virol*. 2015;96(Pt 3):626–636.
21. Kennedy EM, Kornepati AV, Goldstein M, Bogerd HP, Poling BC, Whisnant AW, et al. **Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease.** *J Virol*. 2014;88(20):11965–11972.
22. Zhen S, Hua L, Liu YH, Gao LC, Fu J, Wan DY, et al. **Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus.** *Gene Ther*. 2015;22(5):404–412.
23. Wang G, Zhao N, et al. **CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1.** *Virus research*. 2018; 244: 321-332.
24. Hu, Wenhui et al. **“RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection”** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 111,31 (2014): 11461-6.
25. Liao HK, Gu Y, Diaz A, Marlett J, Takahashi Y, Li M, et al. **Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells.** *Nat Commun*. 2015;6:6413.
26. Wang G, Zhao N, Berkhout B, Das AT. **A Combinatorial CRISPR-Cas9 Attack on HIV-1 DNA Extinguishes All Infectious Provirus in Infected T Cell Cultures.** *Cell Rep*. 2016; 13;17(11):2819-2826.
27. Yin C, Zhang T, Li F, et al. **Functional screening of guide RNAs targeting the regulatory and structural HIV-1 viral genome for a cure of AIDS.** *AIDS*. 2016;30(8):1163-74.
28. Zhu W, Lei R, Le Duff Y, et al. **The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA.** *Retrovirology*. 2015;12:22. Published 2015 Feb 27. doi:10.1186/s12977-015-0150-z
29. Kaminski R, Chen Y, Fischer T, et al. **Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing.** *Sci Rep*. 2016;6:22555. Published 2016 Mar 4. doi:10.1038/srep22555
30. Kaminski R, Bella R, Yin C, et al. **Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study.** *Gene Ther*. 2016;23(8-9):690-5.
31. Yin C, Zhang T, Qu X, et al. **In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models.** *Mol Ther*. 2017;25(5):1168-1186.
32. Wang Z, Pan Q, Gendron P, Zhu W, Guo F, Cen S, Wainberg MA, Liang C. **CRISPR/Cas9-derived mutations both inhibit HIV-1 replication and accelerate viral escape.** *Cell Rep*. 2016;15:481–9.

33. Wang G, Zhao N, Berkhout B, Das AT. **CRISPR-Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape.** *Mol Ther.* 2016;24(3):522-6.
34. Liang C, Wainberg MA, Das AT, Berkhout B. **CRISPR/Cas9: a double-edged sword when used to combat HIV infection.** *Retrovirology.* 2016;13(1):37. Published 2016 May 27. doi:10.1186/s12977-016-0270-0
35. Yoder, K. E., & Bundschuh, R. (2016). **Host Double Strand Break Repair Generates HIV-1 Strains Resistant to CRISPR/Cas9.** *Scientific reports*, 6, 29530. doi:10.1038/srep29530
36. Lebbink RJ, de Jong DC, Wolters F, et al. **A combinational CRISPR/Cas9 gene-editing approach can halt HIV replication and prevent viral escape.** *Sci Rep.* 2017;7:41968. Published 2017 Feb 8. doi:10.1038/srep41968
37. Guo, Rui et al. **"Inhibition of HIV-1 Viral Infection by an Engineered CRISPR Csy4 RNA Endoribonuclease"** *PloS one* vol. 10,10 e0141335. 23 Oct. 2015, doi:10.1371/journal.pone.0141335
38. Wang, W., Ye, C., Liu, J., Zhang, D., Kimata, J. T., & Zhou, P. (2014). **CCR5 gene disruption via lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection.** *PloS one*, 9(12), e115987. doi:10.1371/journal.pone.0115987
39. Li C, Guan X, Du T, et al. **Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4⁺⁺ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9.** *J Gen Virol.* 2015; 96(8):2381-93.
40. Xu L, Yang H, Gao Y, et al. **CRISPR/Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo.** *Mol Ther.* 2017;25(8):1782-1789.
41. Hou P, Chen S, Wang S, et al. **Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection.** *Sci Rep.* 2015;5:15577. Published 2015 Oct 20. doi:10.1038/srep15577
42. Liu, Shuai et al. **"HIV-1 inhibition in cells with CXCR4 mutant genome created by CRISPR-Cas9 and piggyBac recombinant technologies"** *Scientific reports* vol. 8,1 8573. 5 Jun. 2018, doi:10.1038/s41598-018-26894-4
43. 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* vol. 7 47. 9 Sep. 2017, doi:10.1186/s13578-017-0174-2
44. Songlin Y, Yongchao Y, Hongkui X, 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.* 2018; 29(1):51-67
45. 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* vol. 5 16277. 5 Nov. 2015, doi:10.1038/srep16277

46. Saayman, Sheena M et al. “**Potent and Targeted Activation of Latent HIV-1 Using the CRISPR/dCas9 Activator Complex**” *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 24,3 (2016): 488-98.
47. Limsirichai, Prajit et al. “**CRISPR-mediated Activation of Latent HIV-1 Expression**” *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 24,3 (2016): 499-507.
48. Archin, N M et al. “**Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy**” *Nature* vol. 487,7408 482-5. 25 Jul. 2012, doi:10.1038/nature11286
49. Ji, Haiyan et al. “**Specific Reactivation of Latent HIV-1 by dCas9-SunTag-VP64-mediated Guide RNA Targeting the HIV-1 Promoter**” *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 24,3 (2016): 508-21.
50. Chung, Soo-Hyun et al. “**CXC chemokine receptor 4 expressed in T cells plays an important role in the development of collagen-induced arthritis**” *Arthritis research & therapy* vol. 12,5 (2010): R188.