

## **Terapia Gênica: nova perspectiva no avanço à cura da infecção pelo HIV**

### **Gene therapy: a new perspective in the advance towards a cure for HIV infection**

DOI:10.34117/bjdv7n6-462

Recebimento dos originais: 07/05/2021

Aceitação para publicação: 19/06/2021

#### **Pedro Barboza de Morais**

Graduando em Biomedicina

Instituição: Centro Universitário do Sul de Minas - UNIS/MG

Endereço: Avenida Alzira Barra Gazzola, 650, Aeroporto, Varginha – MG, Brasil

Email: pedrobarbozamorais@hotmail.com

#### **Priscila Moraes Henrique Paiva**

Doutora - UFTM

Instituição: Centro Universitário do Sul de Minas - UNIS/MG

Endereço: Rua Francisco de Souza Pinto, 330. Pq São José - Varginha- MG

Email: prihenrique@yahoo.com.br

#### **Thiago Franco Nasser**

Mestre em Patologia Experimental

Instituição: Centro Universitário do Sul de Minas - UNIS/MG

Endereço: Praça Delfim Moreira, 58 - Centro - Campestre-MG

Email: thiago.nasser@unis.edu.br

### **RESUMO**

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi descrito pela primeira vez em 1981 e apesar do tratamento aumentar a sobrevivência dos infectados, milhões de pessoas ainda morrem em decorrência da doença. No entanto, grandes avanços têm sido realizados na busca de sua cura, em especial estudos utilizando a terapia gênica, que consiste na transferência de material genético para dentro da célula com o objetivo de conferir benefício terapêutico. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo analisar o avanço para a cura da infecção pelo HIV com a utilização da terapia gênica mediante a uma revisão de literatura. Os estudos mostraram que a técnica apresenta-se promissora, com resultados positivos, entretanto ainda realizada apenas em culturas de células e camundongos, sendo necessárias mais pesquisas para que a mesma possa ser utilizada em seres humanos.

**Palavras-chave:** Terapia gênica, HIV.

### **ABSTRACT**

The human immunodeficiency virus (HIV) was first described in 1981 and, despite the treatment increasing the survival of those infected, millions of people still die from the disease. However, great advances have been made in the search for a cure, especially studies using gene therapy, which consists of the transfer of genetic material into the cell in order to confer therapeutic benefit. Thus, the present study aimed to analyze the

progress towards the cure of HIV infection using gene therapy through a literature review. The studies showed that the technique is promising, with positive results, however, still performed only in cell cultures and mice, requiring further research before it can be used in humans.

**Keywords:** Gene therapy, HIV.

## 1 INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) atualmente consta com 38 milhões de pessoas infectadas por todo o mundo, contando com 690 mil mortes relacionadas à AIDS até o fim de 2019 e 1,7 milhão de novas infecções. O HIV é uma doença que há tratamento, contudo não há cura. Existem trabalhos que obtiveram grande avanço para curá-la. Através da utilização da terapia gênica, que pode ser definida como a transferência de material genético para dentro das células de um indivíduo, com o objetivo de conferir um benefício terapêutico. O HIV é um vírus de RNA que utiliza as proteínas CCR5 e CXCR4 como co-receptor para entrar nas células de defesa como linfócitos T CD4 e macrófagos, e através dessa entrada, multiplicar-se e destruir as células de defesa que geram imunodepressão no paciente. Com a utilização da terapia gênica, vários estudos mostraram grande eficácia em editar o genoma, e fazer mudanças precisas e direcionadas ao genoma de células vivas, onde consiste em eliminar os 32 pares de bases nitrogenadas da cadeia de DNA que codifica o gene, contribuindo para que a proteína CCR5 seja não funcional. Como essa proteína é o sítio primário de ligação do vírus HIV com as células T, sem o receptor exposto na membrana, o vírus não consegue infectar a célula, resultando na diminuição da carga viral e em seguida, eliminando todas as células infectadas e sucedendo a cura ao paciente. Portanto, estudos sobre este tema é de grande relevância, pois apesar de haver tratamento muitos ainda morrem devido ao avanço da infecção, que gera a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Mediante a isso, este artigo desenvolve-se a partir de uma busca bibliográfica em sites como SciELO, PubMed, Science, Google Scholar e objetiva avaliar argumentações propostas por autores entre os anos de 1993 e 2020.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 HISTÓRIA DO HIV

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) teve início na década de 80, contando com os primeiros casos na África e nos Estados Unidos, a partir da identificação de um

número elevado de pacientes homossexuais que haviam comprometimento do sistema imune. Todos os fatos convergiram para a conclusão de que se tratava de uma nova doença, ainda não classificada, de etiologia provavelmente infecciosa e transmissível, em 1981 o agente etiológico foi identificado como um retrovírus humano, atualmente denominado HIV (FORATTINI, 1993).

Nos dias atuais, há muito conhecimento sobre esta doença, portanto a evolução do HIV para AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), e até mesmo a morte, é baixa em relação ao passado, pois cerca de 25,4 milhões de pessoas possuem acesso à terapia antirretroviral tendo assim uma melhor expectativa de vida.

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

O HIV é uma infecção sexualmente transmissível (IST) que acomete o mundo inteiro, dados mostram que em 2020 o número total de pessoas vivendo com HIV era de 38 milhões onde 70% das pessoas que possuem HIV vivem na África, foi mostrado também que 690.000 pessoas morreram de doenças relacionadas à AIDS até o fim de 2019. Cerca de 75,7 milhões de pessoas foram infectadas desde o início da epidemia e mais de 32,7 milhões morreram. A mortalidade relacionada a AIDS diminuiu 39% desde 2010 (UNAIDS, 2020).

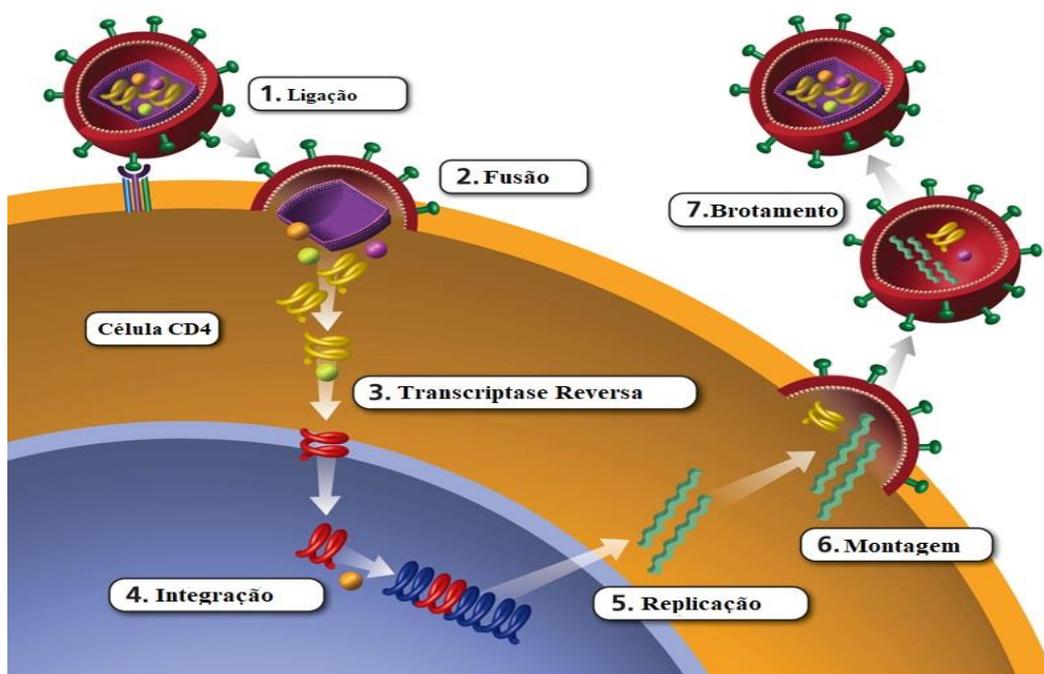
Dos 38 milhões cerca de 20,6 milhões vivem na África Oriental e Austral. A América Latina ocupa a quarta posição em número de infectados no mundo. O Brasil é o país que possui o maior número de casos de HIV na região (UNAIDS, 2018). No Brasil, de 1980 até junho de 2011, 608.230 casos de aids foram notificados. Em 2010, houve o registro de 34.218 novos casos da doença e a taxa de incidência de AIDS no país chegou a 17,9 casos por 100.000 habitantes (SCARPELLINI, 2011).

## 2.3 HIV ETIOLOGIA E PATOGENIA

O HIV é um retrovírus com genoma RNA. É pertencente ao grupo de retrovírus citopáticos não oncogênicos que necessitam de uma enzima chamada transcriptase reversa para poderem se multiplicar, esta enzima é responsável por transcrever o RNA em DNA, podendo então integrar-se ao genoma do hospedeiro e se multiplicar, provocando infecção latente a longo e curto prazo, ocasionando de forma progressiva e fatal síndromes debilitantes acompanhadas de degeneração do Sistema Nervoso Central (SNC) (RODRIGUES et al., 2018).

O HIV, uma vez presente na corrente sanguínea, ataca as células responsáveis pela defesa do nosso corpo, que pode se desenvolver para Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) se não tratado. Prioritariamente, a infecção pelo HIV ocorre nos macrófagos e linfócitos T CD4+, e com o passar do tempo infecta as células T CD4+ de memória. Através de alterações no DNA dessa célula que o HIV faz cópias de si mesmo e, depois de se multiplicar, rompe os linfócitos em busca de outros para continuar a infecção, seguindo um ciclo interminável (Figura 1) (RODRIGUES et al., 2018).

Figura 1 – Ciclo do HIV



Fonte: Fernandes (2017)

O vírus possui algumas características próprias. Dentre elas, a existência de uma camada mais externa, o envelope, formado por glicoproteínas. As proteínas virais encontradas no envelope são as glicoproteínas 120 (gp120) e 41 (gp41). A gp120 é a mais externa, responsável pela ligação do vírus com as células hospedeiras resultando na exposição da gp41, facilitando a fusão vírus-célula (GINESTE et al., 2002).

Foi identificado dois principais co-receptores para a entrada do HIV nas células, o CXCR4 e CCR5. Especificamente, o CXCR4 é usado pelo vírus em linhagens de células T, o CCR5 em linhagens de macrófagos. Porém outros co-receptores já foram identificados, como por exemplo, o CCR3, que é uma quimiocina expressa em eosinófilos e células da microglia, e é usado por algumas cepas de HIV para a infecção da microglia (BITANTE; FILHO, 2017).

## 2.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico para a infecção do HIV é feito em princípios por meios sorológicos. O teste por ELISA é altamente sensível para a presença de anticorpos anti-HIV e foi o primeiro desenvolvido para detectar a presença desses anticorpos em doações de sangue. Hoje ele é rotineiramente utilizado em diagnósticos desenvolvidos para a infecção pelo HIV (GINESTE et al., 2002; apud BENJAMINI et al., 1996). A confirmação do resultado positivo é realizada por Western Blot, que detecta a presença de anticorpos para várias proteínas do HIV; especialmente para p24 ou p31, gp41 e gp120/gp160. A presença de anticorpos para estas proteínas virais é considerada uma comprovação da infecção (GINESTE et al., 2002).

Os primeiros antirretrovirais (ARV) surgiram em 1987, e com o decorrer dos anos foram fabricados outros mais eficazes. Eles agem inibindo a multiplicação do HIV no organismo e, conseqüentemente, evitam o enfraquecimento do sistema imunológico. São vários remédios usados para o tratamento, como: Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa, essa classe de medicamento atua sobre a enzima transcriptase reversa, tornando defeituosa a cadeia de DNA que o vírus cria dentro das células de defesa. Essa ação impede que o vírus se reproduza; Inibidores de protease, medicamentos que atuam na enzima protease, bloqueando sua ação e impedindo a produção de novas células infectadas com HIV; Inibidores da integrase, medicamentos que bloqueiam a atividade da enzima integrase, responsável pela inserção do DNA do HIV ao DNA humano. Assim, inibe a replicação do vírus e sua capacidade de infectar novas células (SOUZA; ALMEIDA, 2003; MELO, 2006).

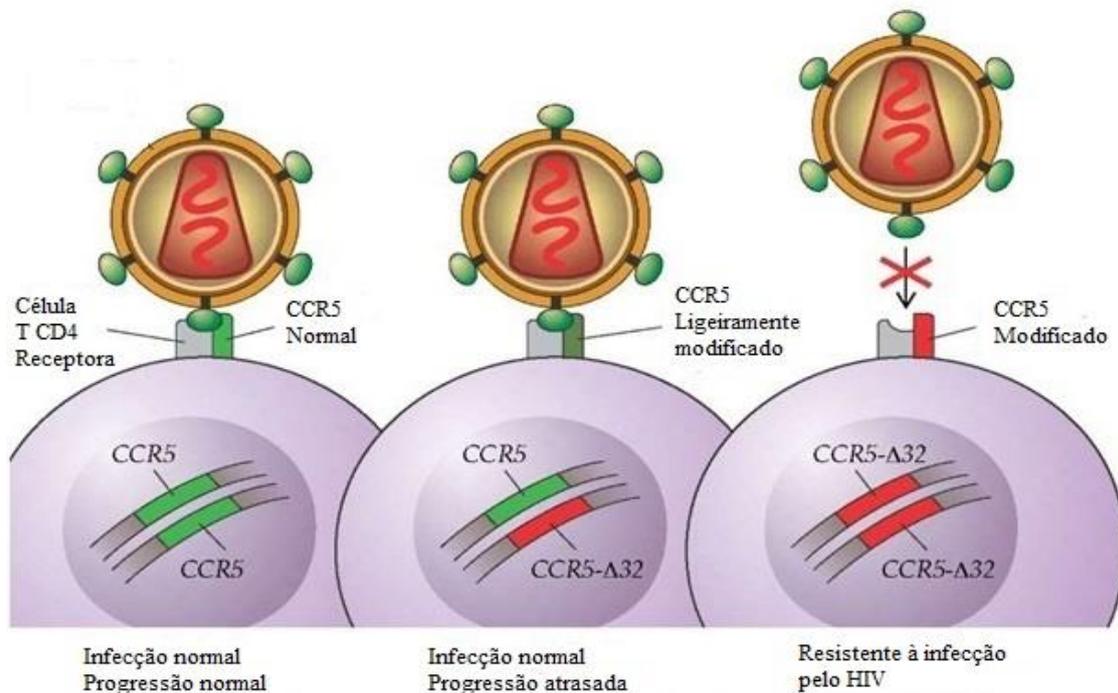
## 2.5 MUTAÇÃO DO CCR5

O receptor da quimiocina CCR5 serve como um co-receptor para o HIV, permitindo que o vírus entre nas células T CD4 humanas e macrófagos. Na ausência do CCR5 o vírus não consegue iniciar a infecção com sucesso. Estudos já relataram mutações naturais do gene CCR5 onde eram deletados 32 pares de bases conhecido como CCR5 Delta 32, indivíduos portadores dessa mutação apresentam resistência à infecção pelo HIV (NI et al., 2018; AGRAWAL et al., 2004).

A mutação CCR5 Delta 32 causa uma mudança de quadro com um códon de parada prematuro e gera uma forma incompleta de CCR5, a proteína incompleta não é expressa na superfície celular e, portanto, a ligação viral ao receptor é impedida. Sendo assim, indivíduos homocigotos para CCR5 Delta 32 foram protegidos contra o HIV

(Figura 2) (RONCARD et al., 2019). Com essa descoberta, muitos cientistas tentam utilizar esta mutação com a terapia gênica.

Figura 2: Mutação do gene CCR5 mostrando a incapacidade do HIV de se ligar na célula.



Fonte: what-when-how.com (2016).

## 2.6 TERAPIA GÊNICA

O termo terapia gênica pode ser definido como a transferência de material genético para dentro das células de um indivíduo com o objetivo de conferir um benefício terapêutico. O princípio da terapia gênica baseia-se no entendimento de que um gene ou vários genes estão defeituosos ou mutados. Este defeito acarreta a produção descontrolada ou a supressão de uma proteína essencial para o funcionamento normal das células. A terapia gênica é a esperança de tratamento de um grande número de doenças até hoje consideradas incuráveis por métodos tradicionais (SILVA et al, 2001).

De acordo com Linden (2010), existem vários vetores para a terapia gênica, como os plasmídeos que são sequências de DNA, eficazes para expressão de genes, nas quais é possível inserir um gene terapêutico por técnicas de DNA recombinante. Os vetores virais os vírus são micro-organismos especializados exatamente em invadir células e nelas introduzir material genético, essa propriedade é explorada para introduzir genes terapêuticos nas células, por meio de tecnologias de DNA recombinante. E também há os

vetores nanoestruturados esta forma está sendo desenvolvida para introduzir DNA a partir de preparados obtidos por técnicas avançadas de nanotecnologia.

Dentre as centenas de ensaios clínicos de terapia gênica já encerrados, a maioria destinou-se a testar a segurança do procedimento. Em certos casos, a identificação precoce de efeitos adversos durante o estudo foi suficiente para encerrar imediatamente o teste, evitando risco de agravamento. Mas, em muitos casos, o procedimento empregado foi considerado seguro quando os efeitos adversos foram ocasionais, discretos e toleráveis (LINDEN, 2010).

Sucessos pontuais já solidificam a viabilidade de tratamentos por terapia gênica na prática clínica, sendo uma forma alternativa para pacientes com doenças congênitas ou desordens monogênicas e câncer, especialmente quando remédios ou cirurgias não apresentam bons resultados (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

### **2.6.1 Terapia gênica aplicada ao HIV**

Estudos demonstram o uso da terapia gênica para infecção por HIV, agindo no genoma viral ou por indução de proteção do hospedeiro com mutações terapêuticas nas células humanas. O estabelecimento de reservas do HIV requer a integração do DNA do vírus no genoma celular do hospedeiro. Portanto, teoricamente, deletar ou desativar o DNA proviral poderia eliminar as reservas virais latentes e ser uma ferramenta de cura da AIDS (BITANTE; FILHO, 2017).

Um estudo com Matsuura (2017) cientistas modificaram o DNA de células-tronco hematopoiéticas (células responsáveis pela formação dos componentes do sangue) utilizando uma molécula sintética que altera os genes de células que irão produzir linfócitos T resistentes à penetração do HIV, e as injetaram em primatas. Dois anos depois do experimento os animais continuavam a produzir linfócitos T capazes de conferir resistência à penetração do vírus HIV.

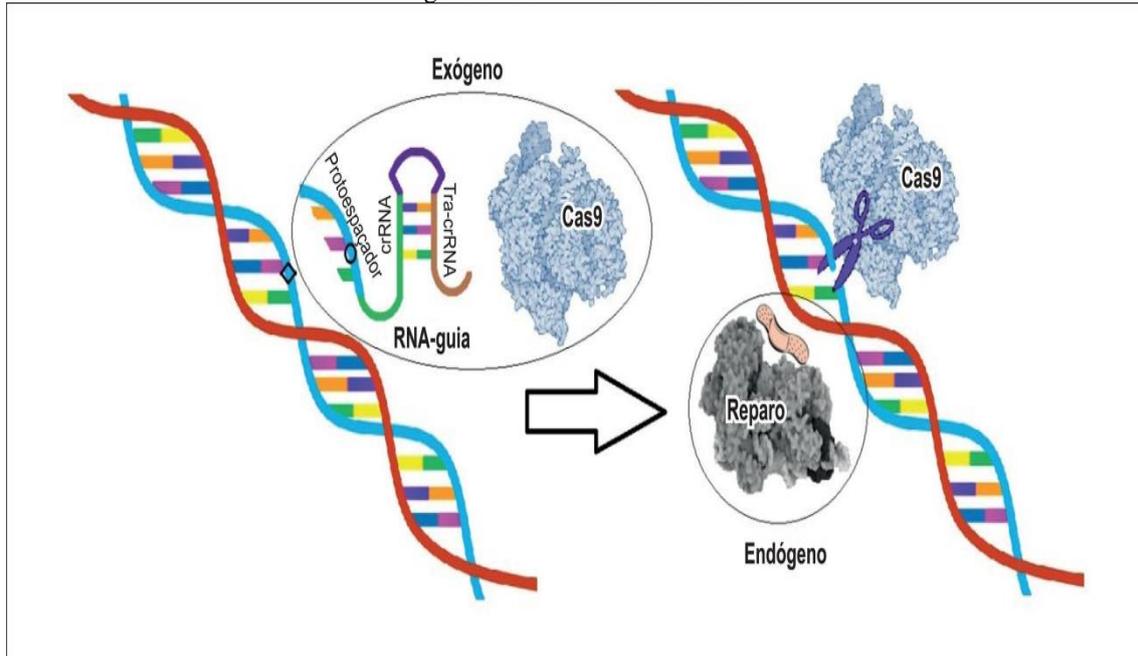
A ZFN (Nucleases de dedo de zinco) e CRISPR/Cas9 são ferramentas versáteis para disrupção de genes que têm o potencial para revolucionar o campo da terapia gênica contra o HIV. Elas fornecem meios significativos para interromper fatores necessários para a infecção pelo vírus, bem como para eliminar o genoma do HIV integrado ao hospedeiro, sendo considerado um meio para erradicar a latência viral.

A ZFN é uma classe de fatores de transcrição eucarióticos que se ligam ao DNA e que atuam em conjunto com fatores específicos de restrição para clivagem de sítios deste DNA. Assim, cada módulo reconhece pares de bases restritas na fita genética da

célula. Uma vez que cada par ZFN é projetado especificamente para reconhecer uma determinada sequência de pares de bases, pode, teoricamente, ser projetado para torná-lo único e altamente específico para o gene alvo, levando à sua ruptura. Como resultado poderia estimular os mecanismos de reparo do DNA e alterar funções celulares, através de inserções de nucleotídeos, supressão ou mutação gênica (DIDIGU et al., 2014).

Porém, a terapia mais estudada e usada para o HIV atualmente é o CRISPR, uma maquinaria encontrada em bactérias, que consiste em pequenas proporções de DNA bacteriano composta por repetições de nucleotídeos. Cada uma dessas repetições encontra-se adjacente a um “espaçador de DNA”, que corresponde a uma região não-codificante inserida no DNA bacteriano após o contato com genomas invasores de bacteriófagos ou plasmídeos. A transcrição locus CRISPR resulta em pequenos fragmentos de RNA com capacidade de reconhecer um DNA exógeno específico e atuar como um guia de modo a orientar a nucleasse Cas, que irá promover a clivagem e consequentemente a eliminação do DNA invasor caso este entre em contato novamente com a bactéria. Sendo assim é capaz de editar o genoma fazendo mudanças precisas e direcionadas ao genoma de células vivas (Figura 3) (BATISTA; NUNES, 2019. SALSMAN; DELLAIRE, 2017). O CRISPR também possui maior vantagem sobre o ZFN pois o seu tamanho é menor, sendo mais fácil de inserir em construções lentivirais, tem um risco menor de clivagem fora do alvo, menos caro e demonstrou maior eficiência (OPHINNI et al., 2018).

Figura 3: Sistema CRISPR/Cas9



Fonte: Arend (2017)

Com o CRISPR / Cas9 é possível interromper genes como o CCR5 ou CXCR4 que é um co-receptor da infecção pelo HIV que ajuda a entrada viral nas células CD4 + humanas por ligação à proteína do envelope (gp120), o gene CXCR4 humano é eficientemente interrompido pela edição do genoma mediada por CRISPR / Cas9, levando à resistência ao HIV-1 das células T CD4 + primárias humanas (HOU et al., 2015).

Com esta ferramenta, houve um avanço muito significativo no combate ao HIV, pois promove a eliminação do vírus na fase aguda quanto no estágio de latência. Genes codificando a endonuclease Cas9 e RNAs guias contendo como alvo o DNA viral, quando inseridos em um adenovírus inócuo ao animal, mas que é capaz de infectar várias células possui a capacidade de reduzir a carga viral radicalmente a níveis indetectáveis (FUSCO, 2017).

De acordo com Kaminski (2016) a edição de DNA CRISPR / Cas9 guiado por RNA conseguiu remover com precisão todo o genoma do HIV-1 de células T CD4+ humanas infectadas, conseguindo assim proteger contra novas infecções pelo HIV-1. Foi visto também que o CRISPR / Cas9 entregue por lentivírus diminuiu significativamente a replicação do HIV-1 em culturas de células T CD4+ primárias infectadas e também reduziu radicalmente a carga viral na cultura *ex vivo* de pacientes infectados, mostrando então como o sistema CRISPR / Cas9 pode servir como um meio favorável para alcançar curas funcionais. Em um estudo Kaminski conseguiu modificar o sistema CRISPR/Cas9

para permitir o reconhecimento de sequências de DNA específicas posicionadas dentro do promotor de HIV-1 abrangendo a sequência terminal longa 5'. Usando este sistema, eles conseguiram eliminar completamente a produção viral de uma linha de células T infectadas com HIV-1 latente através da inibição da histona desacetilase (HDAC).

### **3 ESTUDOS EM ORDEM CRONOLÓGICA DE PUBLICAÇÕES REFERENTES À TERAPIA GÊNICA APLICADA AO HIV**

O avanço para a cura do HIV vem sendo cada vez maior e mais significativos, muitos estudos já conseguiram realizar em cobaias e culturas de células a diminuição e até a erradicação do HIV. Holt e colaboradores (2010) mostrou que, com a utilização da técnica nuclease de dedo de zinco (ZFN) permitiu interromper o gene CCR5 em células-tronco hematopoiéticas (HSPCs), através disso os camundongos tratados obtiveram uma alta diminuição do HIV, mostrando que o uso de células-tronco hematopoiéticas autólogas modificadas por ZFN pode ser uma abordagem clínica para o tratamento do HIV.

Em outro estudo utilizando a ZNF para modificar células T CD4 autólogas, mostrou que 12 pacientes HIV positivo, que foram atribuídos ao estudo mostraram um declínio do DNA do HIV no sangue na maioria dos pacientes, e em 1 dos pacientes o RNA do vírus tornou-se indetectável (TEBAS et al., 2014).

Outros estudos utilizando o CRISPR / Cas9 também obtiveram sucesso em conferir resistência ao HIV. Kaminski et al., (2016) empregaram um sistema de edição de DNA CRISPR / Cas9 guiado por RNA para remover com precisão todo o genoma do HIV-1 abrangendo entre 5' e 3' LTRs de cópias integradas de DNA pró-viral do HIV-1 de células T CD4 + humanas infectadas de forma latente. A coexpressão persistente de Cas9 e os RNAs de guia de direcionamento específico em células T erradicadas de HIV-1 protegeram-nas contra nova infecção pelo vírus.

Bialek e colaboradores (2016) exploraram dois sistemas ativadores derivados de CRISPR / Cas9 como abordagens direcionadas para induzir DNA proviral de HIV-1 dormente. Esses sistemas recrutam vários domínios de ativação transcricional para a repetição terminal longa 5' do HIV (LTR), para a qual foi identificada uma região alvo ideal dentro da sequência LTR U3. Usando esta região alvo, demonstraram a ativação transcricional de genomas provirais através do complexo mediador de ativação sinérgica em vários sistemas de modelo de cultura para a latência do HIV. Os níveis de indução

observados foram comparáveis ou mesmo mais elevados do que o tratamento com LRAs estabelecidos.

Wang e colaboradores, em 2016 mostraram que embora o sistema CRISPR / Cas9 dirigido por RNA guia (gRNA) possa ser usado para o ataque específico de sequência no DNA proviral, o HIV-1 pode escapar de um único gRNA antiviral por mutação da sequência alvo. Contudo utilizando as combinações de dois gRNAs antivirais atrasam o escape viral e identificaram duas combinações de gRNA que bloqueiam a replicação do vírus de forma duradoura. Foi mostrado que quando o escape viral é evitado, a clivagem repetida de Cas9 leva à saturação das principais mutações nas sequências alvo conservadas que codificam proteínas críticas. Esta hipermutação coincide com a perda de vírus competente para replicação, conforme classificado em co-culturas sensíveis com células desprotegidas, demonstrando a inativação completa do vírus. Estes resultados fornecem uma prova de princípio de que as células infectadas com HIV-1 podem ser curadas funcionalmente por tratamento CRISPR / Cas9 com gRNA duplo.

Xu e colaboradores (2017) também utilizaram o CRISPR / Cas9, para editar células-tronco hematopoiéticas e transplantaram em camundongos. Nesse estudo interromperam de forma eficiente o gene CCR5 humano, projetando e rastreando racionalmente uma série de RNAs de guia único (sgRNAs) direcionados ao locus desde o início do primeiro exon até o local de mutação  $\Delta 32$  no gene CCR5 humano, com isso um efeito de resistência ao HIV-1 foi observado, indicado pela redução significativa da titulação do vírus e enriquecimento de células T CD4 + humanas. Evidenciando com sucesso um sistema de ablação de CCR5 mediado por CRISPR / Cas9 em células-tronco hematopoiéticas que confere resistência ao HIV in vivo.

Lebbink e colaboradores (2017) demonstraram que o direcionamento CRISPR / Cas9 de loci único de HIV, inibe apenas parcialmente a replicação do HIV e facilita o escape viral rápido no local alvo. Através disso eles utilizaram uma abordagem combinatória de dois gRNAs fortes direcionados a diferentes regiões do genoma do HIV podendo anular completamente a replicação viral e prevenir o escape viral. No estudo avaliaram a capacidade de gRNAs expressos de forma estável para direcionar e editar o DNA do HIV. Duas sequências de gRNAs projetadas para atingir a região LTR do HIV-1 foram co-expressas em um vetor lentiviral com a endonuclease Cas9. Além disso, os gRNAs foram projetados para atingir a proteína estrutural da matriz viral, protease, transcriptase reversa e integrase, todas essenciais para a replicação viral. Eles infectaram células Jurkat contendo uma cópia quase completa do HIV com os lentivírus contendo

um gRNA direcionado à região LTR (LTR6), a matriz de proteína estrutural (MA3) ou a enzima integrase (IN5). A análise de sequência profunda mostrou eventos específicos de edição do genoma no local alvo correspondente em 100%, 76% e 90,1% das sequências para os gRNAs LTR6, MA3 e IN5, respectivamente. Foi visto que variantes mais frequentemente observadas continham inserções ou deleções no local alvo em comparação com a sequência de tipo selvagem.

Os inibidores da entrada do HIV são altamente eficazes no controle da replicação do vírus. Em um estudo conseguiram desenvolver um vetor lentiviral que expressa um inibidor de entrada secretado, chamado CD4 solúvel (sCD4), que se liga às glicoproteínas do envelope do HIV e inativa o vírus. O sCD4 foi secretado a partir de células T CD4 + modificadas por genes, bem como de células-tronco hematopoéticas / progenitoras CD34 + derivadas de sangue do cordão umbilical humano (HSPCs) e protegeu células-alvo HIV não modificadas da infecção *in vitro*. Para investigar a aplicação *in vivo*, foi injetado HSPCs modificados por genes em camundongos, os hospedeiros suportaram a diferenciação multi-linhagem de HSPCs modificados por genes humanos. Camundongos humanizados capazes de secretar sCD4 demonstraram uma redução da carga viral ao longo do tempo em comparação com camundongos humanizados de controle. Em contraste com as abordagens de terapia gênica que tornam resistentes à infecção apenas células-alvo do HIV modificadas por gene, esta abordagem também mostrou proteção de células T CD4 + não modificadas no sangue periférico e nos tecidos (FALKENHAGEN, 2017).

Xiao; Guo e Chen em 2019 realizaram uma pesquisa utilizando CRISPR / Cas9 onde foi projetado como uma tecnologia de edição de genes eficaz com potencial para tratar HIV-1 / AIDS. Mostrando que pode ser usado para atingir co-fatores celulares ou genoma do HIV-1 para reduzir a infecção pelo HIV-1 e limpar o provírus, bem como para induzir a ativação transcricional do vírus latente em reservatórios virais latentes para eliminação. Esta tecnologia versátil de edição de genes foi aplicada com sucesso à prevenção e redução do HIV-1 / AIDS em células humanas e modelos animais.

Utilizando o CRISPR / Cas12a, Gao e colaboradores (2020), mostrou uma grande eficácia em inibir o HIV em infecções de cultura de células com um único RNA guia (gRNA). Este novo sistema de endonuclease guiada por RNA CRISPR / Cas12a pode fornecer uma ferramenta mais promissora para a engenharia do genoma com atividade e especificidade aumentadas. Eles compararam a Cas12a com o sistema Cas9 original para inativação do genoma de DNA de HIV integrado. A atividade antiviral superior é relatada

para Cas12a, que pode atingir a inativação total do HIV com apenas um único gRNA (chamado crRNA).

Chung e colaboradores (2020) demonstraram a eficiência do sistema CRISPR no HIV-1, a qual foi examinada em células mononucleares de sangue periférico derivadas de pacientes (PBMCs) *ex vivo* e em camundongos humanizados *in vivo* usando gRNAs direcionados tanto ao LTR quanto à proteína estrutural principal gag. Contudo, um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento da terapia anti-HIV-1 usando o sistema CRISPR guiado por RNA foi a variabilidade da sequência nos locais-alvo designados dentro do reservatório do HIV. Para estimar a variabilidade da sequência em uma população de variantes de sequência, eles utilizaram as sequências LTR do subtipo B do HIV-1 depositadas no Laboratório Nacional de Los Alamos (LANL) como uma representação do reservatório do HIV-1 intra e interpaciente. A região com a menor diversidade ocorreu no elemento TAR do LTR, com isso os gRNAs com melhor classificação nesta região mostraram ser muito eficazes na redução da transcrição do HIV-1.

Perdigão e colaboradores (2020) apresentaram uma abordagem alternativa para estimular a expressão latente do HIV-1 por meio da entrega direta de proteínas de ativadores de dedo de zinco (ZFAs) que penetram nas células. As Cys 2 -His 2dedos de zinco, fundidos a um domínio de ativação da transcrição, foram projetados para reconhecer o promotor do HIV-1 e induzir a transcrição viral direcionada. Após a conjugação com várias repetições de sinal de localização nuclear carregada positivamente (NLS), a entrega de proteína de um único ZFA internalizou eficazmente os linfócitos T infectados de forma latente com HIV-1 e estimulou especificamente a expressão viral. Indicando que o tratamento de curto prazo com esta proteína ZFA induz níveis mais elevados de reativação viral em modelos de linha celular de latência de HIV-1 do que aqueles observados com a entrega do gene.

Ophinni e colaboradores (2020) propuseram múltiplos ataques concentrados de gRNA contra genes reguladores do HIV-1 para bloquear o escape viral. As linhas de células T foram transduzidas com gRNAs únicos e múltiplos direcionados a Tat de HIV-1 e Rev usando CRISPR/Cas9 à base de lentivírus, seguido por desafio replicativo de HIV-1 *in vitro*. O rebote de p24 viral foi observado para quase todos os gRNAs, mas a multiplexação de três gRNAs direcionados a Tat manteve a supressão de p24 e a viabilidade celular, indicando a inibição do escape viral. Os Tat multiplexados de gRNAs inibiram a replicação viral aguda na 2ª rodada de infecção, e aboliram a transmissão

associada para células T desprotegidas e mantiveram a proteção por 45 dias, pós-infecção após uma dose mais alta de infecção por HIV-1. Os autores descreveram pela primeira vez a montagem de vetores lentivirais completos contendo três e seis gRNAs visando Tat e Rev . Através da pesquisa mostrou que construto de direcionamento de Tat de vetor único mostrou não inferioridade em relação ao multivetor de direcionamento de Tat na infecção por HIV-1 de baixa dose.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em 1996 foi descoberta uma mutação genética onde resulta a proteção das células contra o HIV, chamada de CCR5 delta 32, que consiste na deleção de 32 pares de bases nitrogenadas. Como o CCR5 é uma proteína de sítio primário de ligação do vírus HIV com as células T, sem o receptor exposto na membrana o vírus não consegue infectar as células, tornando a pessoa com esse alelo em homozigose imune ao HIV. Através deste conhecimento muitos cientistas tentam a partir da terapia gênica alterar o DNA, tentando obter sucesso deletando os 32 pares de base para obter a ,mutação no CCR5, e conseguir tornar as células de hospedeiros de HIV imunes, e que as células sejam capazes de combater o vírus HIV.

Embora os estudos obtiveram sucesso apenas em culturas de células e camundongos, a terapia gênica mostra-se promissor para conseguir deletar os 32 pares de bases. A partir desta revisão bibliográfica foi possível observar que estudos a respeito deste tema mostra que os cientistas estão cada vez mais próximos da cura do HIV do que imaginamos.

## REFERÊNCIAS

AGRAWAL, L.; LU, X.; QINGWEN, J.; VANHORN-Ali, Z.; NICOLESCU, I. V.; MCDERMOTT, D. H.; MURPHY, P. M.; ALKHATIB, G. Role for CCR5Delta32 protein in resistance to R5, R5X4, and X4 human immunodeficiency virus type 1 in primary CD4+ cells. *J Virol.*, v. 78, n. 5, p. 2277-2287, 2004.

BATISTA, F. C. C.; NUNES, C. P. CRISPR CAS9: Atuais aplicações no tratamento do HIV. *Revista de Medicina de Família e Saúde Mental.*, v. 1, n. 1, p. 89-94, 2019

BENJAMINI, E.; SUNSHINE, G.; LESKOWITZ, S. *Immunology a short course*. Wiley – Liss. Inc., v. 3, n. 1, p. 484, 1996.

BIALEK, J. K.; DUNAY, G. A.; VOGES, M.; SCHÄFER, C.; SPOHN, M.; STUCKA, R.; HAUBER, J. Lange UC. Targeted HIV-1 Latency Reversal Using CRISPR/Cas9-Derived Transcriptional Activator Systems. *PLoS One.*, v. 11, n. 6, 2016.

BITANTE, J. O.; FILHO, O. R. Terapia genética: Nova perspectiva no avanço à cura da infecção pelo HIV. 2017. Disponível em <<http://cienciasecognicao.org/neuroemdebate/arquivos/3949>> Acesso em 8 de Setembro de 2019.

BRITO, A. M.; CASTILHO, E. A.; SZWARCOWALD, C. L. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 34, n. 2, p. 207-217, 2001.

CHUNG, C. H.; ALLEN A. G.; ATKIN, A. J.; SULLIVAN, N. T.; HOMAN, G.; COSTELLO, R.; MADRID, R.; NONNEMACHER, M. R.; DAMPIER, W.; WIGDAHL, B. Safe CRISPR-Cas9 Inhibition of HIV-1 with High Specificity and Broad-Spectrum Activity by Targeting LTR NF-κB Binding Sites. *Mol Ther Nucleic Acids.*, v. 21, n. 4, p. 965-982, 2020.

DIDIGU, C. A.; WILEN, C. B.; WANG, J.; DUONG, J.; SECRETO, A. J.; DANET-DESNOYERS, G. A.; RILEY, J. L.; GREGORY, P. D.; JUNE, C. H.; HOLMES, M. C.; DOMS, R. W. Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors *ccr5* and *cxcr4* protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Blood.*, v.123, n. 1, p. 61-69, 2014.  
Estatísticas globais sobre HIV 2020. Disponível em < <https://unaids.org.br/estatisticas/>> Acesso em 20 de Fevereiro de 2021.

FALKENHAGEN, A.; SINGH, J.; ASAD, S.; LEONTYEV, D.; READ, S.; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C.; JOSHI, S. Control of HIV Infection In Vivo Using Gene Therapy with a Secreted Entry Inhibitor. *Mol. Ther. Nucleic Acids.*, v. 9, p. 132-144, 2017.

FERREIRA, B. E.; OLIVEIRA, I. A.; PANIAGO, A. M. M. Qualidade de vida de portadores de HIV/AIDS e sua relação com linfócitos CD4+, carga viral e tempo de diagnóstico. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v. 15, n. 1, p. 75-84, 2012.

FORATTINI, O. P. AIDS e Sua Origem. *Rev. Saúde pública.*, v. 27, n. 3, p. 153-154, 1993.

FUSCO, K. Edição genética contra o HIV. *Revista Sociedade Brasileira de Microbiologia*. 2017. Disponível em < [https://sbmicrobiologia.org.br/wp-content/uploads/2018/01/revista\\_sbm\\_33.pdf](https://sbmicrobiologia.org.br/wp-content/uploads/2018/01/revista_sbm_33.pdf)> Acesso em 4 de agosto de 2020.

GINESTE, D. C. Vacina para o HIV ?. 2002. Dissertação (Graduação)- Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas (Curso de Graduação em Ciências Biológicas), Curitiba, 2002.

GONÇALVES, G. A. R.; PAIVA, R. M. A. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. *Einstein.*, v. 15, n. 3, p. 369-375, 2017.

HOLT, N.; WANG, J.; KIM, K.; FRIEDMAN, G.; WANG, X.; TAUPIN, V.; CROOKS, G. M.; KOHN, D. B.; GREGORY, P. D.; HOLMES, M. C.; CANNON, P. M. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nat. Biotechnol.*, v. 28 p. 839–847, 2010.

HOU, P.; CHEN, S.; WANG, S.; YU, X.; CHEN, Y.; JIANG, M.; ZHUANG, K.; HO, W.; HOU W.; HUANG, J.; GUO, D. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/Cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Sci. Rep.*, v. 5, 2015.

HÜTTER, G.; NOWAK, D.; MOSSNER, M.; GANEPOLA, S.; MÜSSIG, A.; ALLERS, K.; SCHNEIDER, T.; HOFMANN, J.; KÜCHERER, C.; BLAU, O. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.*, v. 360, n. 7, p.692–698, 2009.

KAMINSKI, R.; CHEN, Y.; FISCHER, T.; TEDALDI, E.; NAPOLI, A.; ZHANG, Y.; KARN, J.; HU, W.; KHALILI, K. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Sci Rep.* v. 6, 2016.

LEBBINK R. J.; JONG D. C.; WOLTERS, F.; KRUSE, E. M.; Ham P. M. V.; WIERTZ, E. J.; NIJHUIS, M. A combinational CRISPR/Cas9 gene-editing approach can halt HIV replication and prevent viral escape. *Sci Rep.*, v. 7, p. 41968, 2017.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. *Estudos Avançados.*, v. 24, n. 70, 2010.

MELO, E. B.; BRUNI, A. T.; FERREIRA, M. M. C. Inibidores da HIV-integrase: Potencial abordagem farmacológica para tratamento da AIDS. *Quim. Nova.*, v. 29, n. 3, p. 555-562, 2006.

MENCK, C. F. M.; VENTURA, A. M. Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. *Revista USP.*, n. 75, p. 50-61, 2007.

NARDI, N. B.; TEIXEIRA, L. A. K.; SILVA, E. F. A. Terapia gênica. *Ciência & saúde coletiva.*, v. 7, n. 1, p. 109-116, 2002.

NI, J.; WANG, D.; WANG, S. The CCR5-Delta32 Genetic Polymorphism and HIV-1 Infection Susceptibility: a Meta-analysis. *Open Med.*, v. 13, p. 467-474, 2018.

OPHINNI, Y.; MIKI, S.; HAYASHI, Y.; KAMEOKA, M. Multiplexed tat-Targeting CRISPR-Cas9 Protects T Cells from Acute HIV-1 Infection with Inhibition of Viral Escape. *Viruses.*, v. 12, n. 11, p. 1223, 2020.

PERDIGÃO, P. R. L.; CUNHA-SANTOS, C.; BARBAS, C. F. 3rd.; SANTA-MARTA M.; GONÇALVES, J. Protein Delivery of Cell-Penetrating Zinc-Finger Activators Stimulates Latent HIV-1-Infected Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev.*, v.18, p. 145-158, 2020.

RODRIGUES, J. S.; FONSECA, L. C.; ALMEIDA, T. A. N. C. Avaliação da imunidade celular do CD4 no combate ao vírus do HIV, *Revista Saúde em Foco*, v. 10, P. 718-724, 2018.

RONCARD, L.; SOOD, V.; YOUSIF, A. S.; RAMESH, J.; SHANKAR, V.; DAS, J.; SUMI, N.; RAI, T.; MOHANKUMAR, K.; SRIDHARAN, S.; DORSCHER, A.; RAMACHANDRAN, V. G.; BANERJEA, A. C. Genetic Polymorphisms in the Open Reading Frame of the CCR5 gene From HIV-1 Seronegative and Seropositive Individuals From National Capital Regions of India. *Sci. Rep.*, v. 9, p. 7594, 2019.

SALSMAN, J.; DELLAIRE, G. Precision genome editing in the CRISPR era. *Biochem Cell Biol.*, v. 95, n.2, p.187-201, 2017.

Scarpellini B. Epidemiologia da infecção por HIV no mundo e no Brasil, 2011. Disponível em <<http://www.brunoscarpellini.com.br/epidemiologia-da-infeccao-por-hiv-no-mundo-e-no-brasil/>> Acesso em 11 de junho de 2020.

SILVA, C. D.; MATTE, U. S.; GIUGLIANI, R. Terapia gênica: uma nova estratégia para o tratamento de doenças, *Revista HCPA*, v. 3, p. 379-386, 2001.

SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V. Drogas anti-VIH: Passado, presente e perspectivas futuras, *Quim. Nova.*, v. 26, n. 3, p. 366-372, 2003.

TEBAS, P.; STEIN, D.; TANG, W. W.; FRANK, I.; WANG, S. Q.; LEE, G.; SPRATT, S. K.; SUROSKY, R. T.; GIEDLIN, M. A.; NICHOL, G. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N. Engl. J. Med.*, v. 370, n. 10 p. 901–910, 2014.

Terapia genética torna célula capaz de combater o vírus HIV. Por Sérgio Matsuura. Disponível em <<https://scmi.com.br/terapia-genetica-torna-celula-capaz-de-combater-o-virus-hiv/>> Acesso em 16 de Janeiro de 2020.

UNAIDS. Disponível em <[https://unaid.org.br/wp-content/uploads/2019/11/2019\\_UNAIDS\\_WAD2019\\_FactSheet.pdf](https://unaid.org.br/wp-content/uploads/2019/11/2019_UNAIDS_WAD2019_FactSheet.pdf)> Acesso em 1 de janeiro de 2020.

WANG, G.; ZHAO, N.; BERKHOUT, B.; DAS, A. T. A Combinatorial CRISPR-Cas9 Attack on HIV-1 DNA Extinguishes All Infectious Provirus in Infected T Cell Cultures. *Cell Rep.*, v. 17, n. 11, p.2819-2826, 2016.

XIA, Q.; GUO, D.; CHEN, S. Application of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing in HIV-1/AIDS Therapy. *Front Cell Infect Microbiol.*, v. 9, p. 69, 2019.

XU, L.; YANG, H.; GAO, Y.; CHEN, Z.; XIE, L.; LIU, Y.; LIU, Y.; WANG, X.; LI, H.; LAI, W.; HE, Y.; YAO, A.; MA, L.; SHAO, Y.; ZHANG, B.; WANG, C.; CHEN, H.; DENG, H. CRISPR/Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. *Molecular Therapy*. v. 25, n. 8, p. 1782-1789, 2017.

GAO, Z.; FAN, M.; DAS A. T.; HERRERA-CARRILLO, E.; BERKHOUT, B. Extinction of all infectious HIV in cell culture by the CRISPR-Cas12a system with only a single crRNA, *Nucleic Acids Research*. v. 48, n. 10, p. 5527–5539, 2020.