

**CENTRO PAULA SOUZA**  
**Etec Prof. Carmelino Corrêa Júnior**  
**Ensino Médio com Habilitação Profissional**  
**de Técnico em Biotecnologia**

**Julia Diniz Teodoro**

**Lauane Vitoria Oliveira Silva**

**Edição Gênica e o uso do sistema CRISPR-Cas9 na  
Terapia do HIV**

**FRANCA**

**2025**

**Julia Diniz Teodoro**

**Lauane Vitoria Oliveira Silva**

**EDIÇÃO GÊNICA E O USO DO SISTEMA CRISPR-CAS9 NA  
TERAPIA DO HIV**

Trabalho de Conclusão de curso, apresentado ao Curso Técnico em Biotecnologia Integrado ao Ensino Médio da Etec Prof. Carmelino Corrêa Júnior, orientado pela Profa. Dra. Joana D'Arc Félix de Sousa, como requisito parcial para obtenção do título de Técnico em Biotecnologia.

**FRANCA**

**2025**

**DEDICAMOS** este trabalho a ETEC Prof. Carmelino Corrêa Júnior, para que este trabalho possa inspirar novos alunos a buscarem sempre a inovação a partir da imaginação.

**AGRADECEMOS** aos professores, colegas de classe e a nós mesmas.

“O sucesso é cair nove vezes e levantar-se  
Outras dez vezes”.

Jon Bon Jovi

## RESUMO

**TEODORO**, Julia Diniz; **SILVA**, Lauane Vitoria Oliveira. **Edição Gênica**. Trabalho de Conclusão de Curso Apresentado para Obtenção do Título de Técnico em Biotecnologia Integrado ao Ensino Médio. ETEC Prof. Carmelino Corrêa Júnior, Franca/SP, 2025.

O vírus da imunodeficiência humana surgiu na década de 1980 com seus primeiros casos nos Estados Unidos, Haiti e África Central, causando uma epidemia global. Em 1983 foi descoberto e identificado o patógeno da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), e ainda neste ano foram confirmados os primeiros casos de HIV no Brasil. Os tratamentos contra o HIV estão se tornando cada vez mais eficazes, por isso a epidemia do vírus é considerada controlada no Brasil, com uma taxa de cerca de 39 mil novos casos ao ano. Apesar da terapia antirretroviral (TARV), reduzir a viremia a níveis extremamente baixos, e prolongar a vida de indivíduos infectados pelo HIV-1, ela possui muitas limitações como alto custo e efeitos colaterais, e principalmente, ainda não é capaz de curar completamente a doença. Assim, nas últimas décadas, tem havido um considerável aumento nas pesquisas sobre outras opções para eliminar completamente esse vírus do corpo humano, e uma das abordagens mais empregadas é a edição gênica. Uma tecnologia destacada é o uso do sistema CRISPR-Cas9, que possibilita a edição dos genes de interesse de maneira ágil e relativamente simples. As abordagens anti-HIV criadas com base no sistema CRISPR-Cas9 englobam a desativação do genoma pró-viral, a remoção do genoma pró-viral, a prevenção da replicação e a modificação da expressão dos co-receptores CCR5 e CXCR4. Nesta revisão, serão enfatizados os achados obtidos com o sistema CRISPR-Cas9 na edição dos genes associados à expressão dos co-receptores CXCR4 e CCR5, considerando as limitações e as perspectivas relativas ao uso desta ferramenta como uma terapia no enfrentamento do HIV.

**Palavras-chave:** HIV. CRISPR-cas9. AIDS.

## ABSTRACT

**TEODORO**, Julia Diniz; **SILVA**, Lauane Vitoria Oliveira. **Edição Gênica**. Course Conclusion Paper Presented for Obtaining the Title of Technician in Biotechnology Integrated in High School. ETEC Prof. Carmelino Correa Junior, Franca/SP, 2025.

The human immunodeficiency virus made its first appearance in the 1980s, with initial instances observed in the United States, Haiti, and Central Africa, leading to a worldwide epidemic. In 1983, this virus was recognized and classified as the agent responsible for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). During that same year, Brazil reported its first confirmed cases of HIV. HIV therapies are showing greater effectiveness, resulting in the epidemic in Brazil being regarded as managed, with approximately 39 thousand fresh cases annually. While antiretroviral therapy (ART) decreases viral load to very low figures and extends the lifespan of those infected with HIV-1, it comes with several drawbacks, including elevated costs and adverse effects; however, the primary limitation is its inability to fully eradicate the disease. Consequently, over the past few decades, various alternatives aimed at completely eliminating this virus from the human body have been extensively researched, with gene editing being one of the most prominent approaches. A particular technology identified is the CRISPR-Cas9 system, which allows for the swift and relatively straightforward editing of targeted genes. Strategies aimed at combating HIV that have been developed from the CRISPR-Cas9 framework encompass the inactivation of the proviral genome, removal of the proviral genome, hindrance of replication, and modification of the expression levels of the CCR5 and CXCR4 coreceptors. This examination will emphasize the outcomes achieved through the CRISPR-Cas9 technology in the modification of genes associated with the expression of the coreceptors CXCR4 and CCR5, discussing both the

constraints and future outlook regarding the utilization of this method as a treatment approach in combating HIV.

**Keywords:** HIV. CRISPR-cas9. AIDS

(SITE FIOCRUZ). (GIOVANNA CASALI MENDES).

# INTRODUÇÃO

## 1.1 Justificativas

Em abril de 2015, pesquisadores chineses liderados por Junjiu Huang, da Universidade de Sun Yat-sen, realizaram um estudo tão inovador quanto controverso. Tratava-se de experimento sobre edição genética de embriões humanos para corrigir mutação no gene HBB, codificador da proteína beta-globina. Esta proteína compõe hemoglobinas, e a mutação em seu gene está relacionada à doença beta-talassemia. A edição genética é um procedimento em que trechos específicos do DNA são eliminados, permitindo sua substituição por novas sequências de genes. O termo “edição” alude à metáfora da produção de um texto, na qual letras são apagadas para então serem reescritas. Pode-se editar o DNA de toda sorte de seres vivos com finalidades diversas: para tratar doenças, criar alimentos transgênicos, melhorar características humanas não patológicas, entre outras finalidades. Mais recentemente, em agosto de 2017, experimento semelhante foi publicado pela revista Nature. Conduzido na Universidade de Saúde e Ciência do Oregon pela equipe do cientista Hong Ma, o estudo buscou corrigir mutação no gene MYBPC3 em embriões humanos. Essa variação é conhecida por causar cardiomiopatia hipertrófica, distúrbio caracterizado pelo espessamento da musculatura cardíaca. Entretanto, pesquisas como estas suscitam controvérsias sobre a aceitabilidade e os efeitos da manipulação do DNA humano. Debates têm se estabelecido nos meios de comunicação e na literatura científica, problematizando implicações científicas, éticas e sociais desta prática. Autores assumem posicionamentos diversos, condenando a edição genética, enaltecendo-a, ou ainda recomendando cautela em futuros experimentos. Baseado nas informações acima, estudaremos os riscos e benefícios da modificação do DNA humano na edição gênica.

## **1.2 Objetivos**

O principal foco de estudo é analisar técnicas para o tratamento de HIV utilizando a tecnologia CRISPR-CAs9. A aids é uma doença crônica causada pelo HIV que compromete o sistema imunológico do hospedeiro, deixando vulnerável a infecções oportunistas. Apesar da terapia antirretroviral (TARV), reduzir a viremia a níveis extremamente baixos, e prolongar a vida de indivíduos infectados pelo HIV-1, ela possui muitas limitações, como alto custo e efeitos colaterais, mas principalmente, não ser capaz de curar completamente a doença. Portanto, nas últimas décadas, vem sendo muito estudado outras alternativas para erradicar completamente esse vírus do organismo humano, e uma das ferramentas mais utilizadas é a edição gênica. Uma tecnologia encontrada é a utilização do sistema CRISPR-Cas9, que é capaz de editar os genes de interesse, de forma rápida e relativamente fácil.

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Utilizar a edição genética e a aplicação do sistema CRISPR-CAS9 no tratamento do HIV.

### **1.2.2 Objetivo Específico**

1. Explorar a utilização da tecnologia CRISPR-CAS9 para a eliminação do DNA proviral do HIV que está integrado ao genoma das células que servem como hospedeiras.
2. Avaliar a possibilidade de modificar o gene CCR5 utilizando o CRISPR-Cas9 como uma abordagem para impedir a entrada do HIV nas células T-CD4 (um tipo de célula do sistema imunológico responsável por coordenar a resposta imunológica do corpo), proporcionando assim resistência à infecção viral.
3. Avaliar a eficácia do CRISPR-Cas9 na erradicação ou diminuição dos reservatórios virais latentes, auxiliando na criação de uma terapia curativa de duração prolongada para o HIV.

### **3.1. Metodologia**

O trabalho foi realizado por meio de uma pesquisa bibliográfica, onde foram empregados como ferramentas estudos disponíveis nas bases de dados Google Acadêmico, documentos de instituições governamentais, trabalhos de conclusão de curso de outros estudantes de diferentes universidades e arquivos da Fiocruz. Os dados variados encontrados nas fontes consultadas foram coletados e analisados em comparação.

Para a coleta das informações, foram utilizados os seguintes termos de pesquisa: HIV, AIDS, terapia antirretroviral, CRISPR-cas9, terapia gênica, CXCR4, CCR5.

(REPO.SAOCAMILO). (INDEX.PHP.BIOLOGICA).

## **4. DESENVOLVIMENTO**

### **4.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS**

A Aids é uma enfermidade originada pela infecção do vírus HIV, que compromete o sistema imunológico, o qual é responsável pela defesa do corpo contra doenças. O vírus tem a capacidade de modificar o DNA de certas células no organismo humano e criar cópias de si mesmo. À medida que se reproduz, ele destrói os linfócitos em busca de outras células para perpetuar a infecção. Em outubro de 1988, a Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas (ONU) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) determinaram que o dia 1º de dezembro fosse celebrado como o Dia Mundial de Combate à Aids.

(MINISTÉRIO DA SAÚDE.,2014).

<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aids-hiv>

O vírus da imunodeficiência humana apareceu nos anos 80, apresentando uma taxa de mortalidade elevada. Os tratamentos disponibilizados se mostram eficazes, levando a epidemia a ser considerada sob controle no Brasil, com cerca de 39 mil novos casos anualmente. De acordo com estimativas do Ministério da Saúde, pelo menos um terço, o que corresponde a

aproximadamente 150 mil indivíduos, desconhece seu estado. (MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2020).

<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aids-hiv>

A doença foi inicialmente ligada à comunidade de homens gays, pois a transmissão do vírus através do ato sexual é mais eficaz via relação anal (JUNIOR.,2002). O maior número de novos casos pertence a indivíduos heterossexuais, com 67,5% registrados em 2012, dos quais 58% eram mulheres. Assim, a terminologia evoluiu de grupos de risco para comportamentos de risco, como a prática de sexo desprotegido. Um terço dos jovens confessou que nunca ou quase nunca utiliza preservativo, e poucos estavam informados sobre a profilaxia pós-exposição, que já está disponível no Brasil e pode ser administrada até 72 horas após uma situação de alto risco de infecção por HIV. (PECHANSKY.,2001)

## **4.2 CLASSIFICAÇÃO DO HIV**

Existem dois tipos de HIV: o HIV-1 e o HIV-2. O HIV-1 é responsável pela maioria das infecções por HIV ao redor do mundo, enquanto o HIV-2 é responsável por uma parte significativa das infecções, especialmente em algumas regiões da África Ocidental. Em certas áreas dessa região, os dois tipos de vírus podem estar presentes e co-infectar os pacientes. O HIV-2 aparenta ter uma virulência menor em comparação ao HIV-1.

O HIV-1 teve sua origem na África Central na primeira metade do século XX, quando um vírus muito parecido com o que afeta chimpanzés foi transmitido para a população humana. A propagação global da epidemia começou no final dos anos 1970, e a AIDS foi oficialmente reconhecida em 1981.

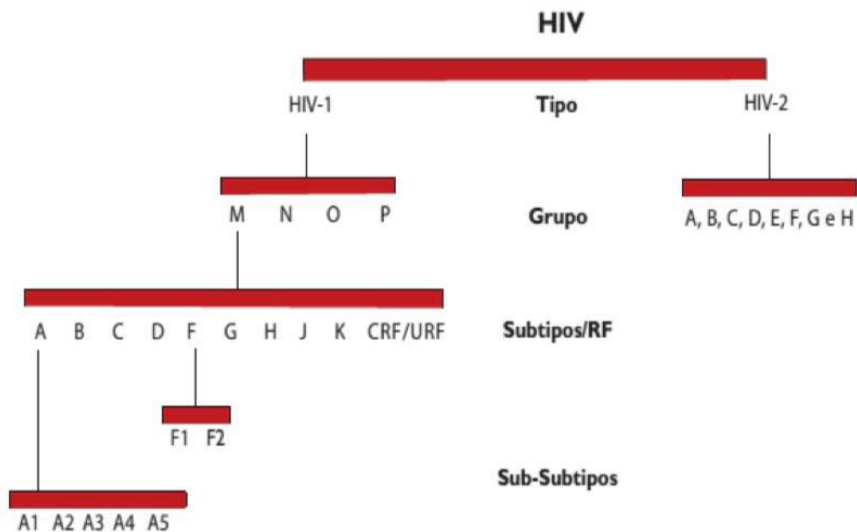
(MANUAL MDS VERSÃO PARA PROFISSIONAIS DE SAÚDE).

<https://www.msmanuals.com/pt/profissional/doen%C3%A7as-infeciosas/v%C3%ADrus-da-imunodefici%C3%A2ncia-humana-hiv/c%C3%A2nceres-comuns-em-pacientes-com-infec%C3%A7%C3%A3o-pelo-hiv>

Adachi, T., Tanaka, R., Kodama, A. *et al.* Identificação de um epítopo único do CXCR4 cuja ligação inibe a infecção pelos vírus da imunodeficiência humana

tipo I trópicos para CXCR4 e CCR5. *Retrovirology* **8**, 84 (2011).  
<https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-84>

**Figura 1-** Classificação do HIV. A imagem mostra as varias classificações do HIV conforme análises filogenética.



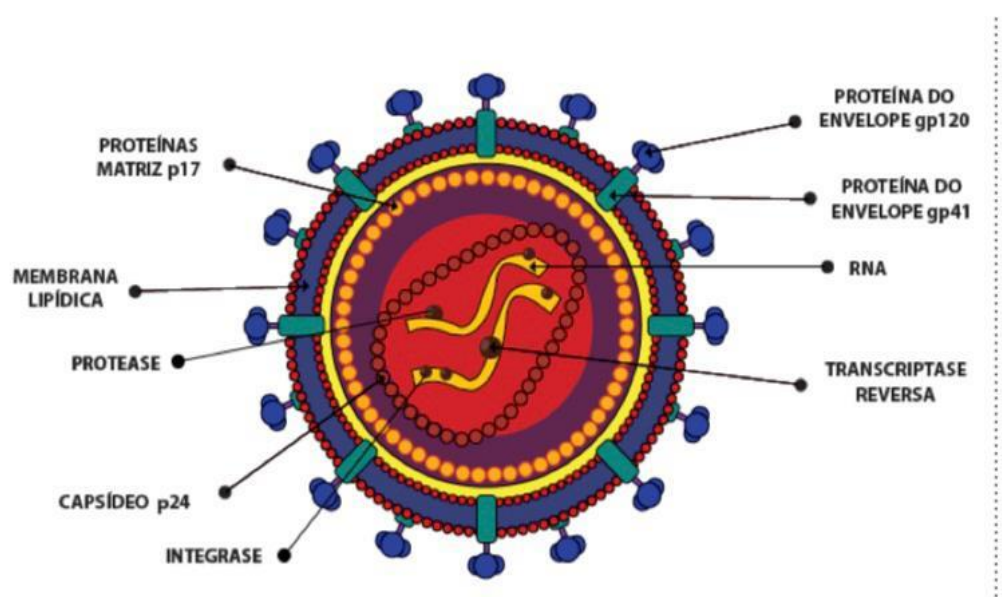
**Fonte:** HIV e AIDS Virologia UFF 2017

### 4.3 BIOLOGIA ESTRUTURAL DO HIV

O HIV diz respeito ao vírus (um retrovírus pertencente à subfamília Lentiviridae) que afeta o sistema imunológico. Uma pessoa pode ser portadora do HIV, mas isso não implica que ela manifeste sintomas ou que venha a desenvolver aids. (MINISTÉRIO DA SAÚDE).

<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aids-hiv>

**Figura 2** – Estrutura do HIV. A imagem detalha a estrutura do vírus, apresentando as diversas glicoproteínas encontradas no envelope viral.



Legenda:

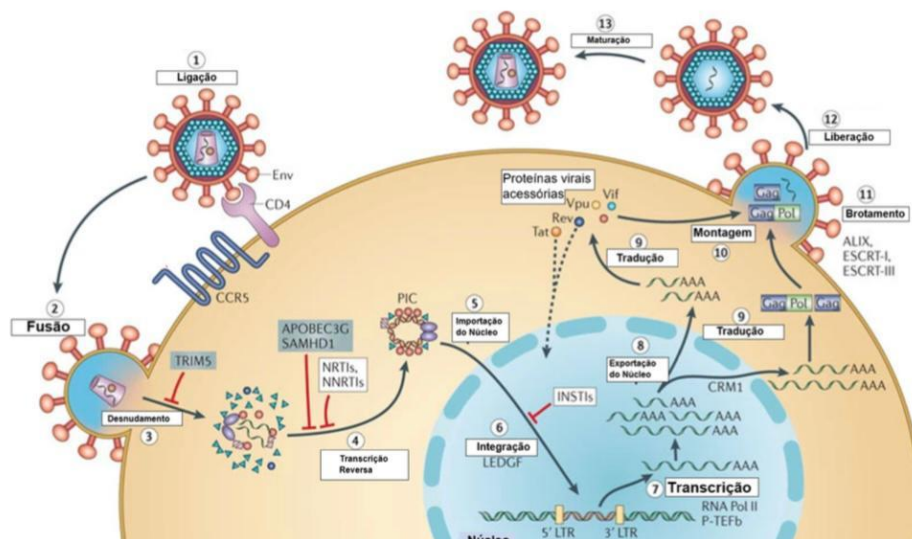
**Fonte:** BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE, MINISTÈRIO DA SAÚDE.

Os vírions do HIV-1 possuem duas cópias de um genoma de RNA de fita simples, que se encontram dentro de um capsídeo com formato cônico, envolto por uma membrana plasmática proveniente da célula hospedeira e contendo proteínas do envelope viral. O RNA genômico tem um comprimento total de 9.750 nucleotídeos (Ratner et al., 1985; Wain-Hobson, 1989), e os vírions apresentam um tamanho aproximado de 120 nm de diâmetro. Recentemente, uma representação tridimensional detalhada das espículas da glicoproteína do envelope do HIV-1, que são essenciais para a infecção das células

hospedeiras, foi revelada através de tomografia de microscopia crioelétrica (Zhu et al., 2006).

Zhu P, Liu J, Bess J Jr, et al. Distribuição e estrutura tridimensional das espículas do envelope do vírus da AIDS. *Natureza*. 2006; 441 :847–852. [ [PubMed](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [Lista de referências](#) ]

**Figura 3 –** Ciclo de replicação do HIV. Este infográfico demonstra o ciclo de replicação do HIV, que tem início quando o HIV se funde à superfície da célula do hospedeiro.



Legenda: Um capsídeo, que carrega o genoma e as proteínas virais, penetra na célula. A estrutura do capsídeo se desmantela e a proteína do HIV, denominada transcriptase reversa, converte o RNA viral em DNA. O DNA viral é transportado para o núcleo, onde a proteína integrase do HIV insere o DNA do HIV no DNA do hospedeiro. Utilizando o maquinário de transcrição do hospedeiro, o DNA do HIV é transcrito em várias cópias do novo RNA do HIV. Uma fração desse RNA constitui o genoma de um vírus novo, enquanto outras cópias do RNA são utilizadas pela célula para gerar novas proteínas do HIV. O RNA viral recém-formado e as proteínas do HIV se deslocam até a superfície da célula, onde um novo HIV imaturo é formado. Por fim, o vírus é liberado da célula, e a proteína do HIV, chamada protease, processa as poliproteínas recém-sintetizadas para criar um vírus maduro e infeccioso.

Fonte: (BIBLIOTECA NACIONAL DE MEDICINA).

<https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>

#### **4.4 TERAPIA ANTIRRETROVIRAL**

A terapia antirretroviral, conhecida como TARV, consiste em um conjunto de fármacos voltados para o tratamento do HIV. Esses medicamentos não possuem a capacidade de eliminar o vírus nem de curar a infecção por HIV. Contudo, quando utilizados em conjunto, eles podem inibir a multiplicação do vírus. Com a redução da atividade viral, as manifestações da doença relacionada ao HIV também são desaceleradas. Os fármacos utilizados no tratamento antirretroviral são denominados ARVs. A abordagem que combina esses medicamentos é referida como TARV de alta atividade, ou HAART. (IAPAC)

<https://www.iapac.org/fact-sheet/antiretroviral-therapy-art/>

Caso os fármacos sejam suspensos, o vírus tem a capacidade de se recuperar em um período de 13 semanas (DEEKS, OVERBAUGH, PHILIPS et al., 2015).

#### **4.5 TERAPIA GÊNICA**

A terapia gênica é uma abordagem que insere genes saudáveis nas células para tratar enfermidades. Essa técnica faz uso de métodos de DNA recombinante para alterar ou substituir genes defeituosos. Ao inserir um gene saudável, é possível restaurar uma informação que está faltando ou incorreta no DNA de uma pessoa, o que pode resultar na cura da patologia ou na diminuição dos seus sintomas. (SITE TODA MATERIA).

MAGALHÃES, Lana. Terapia gênica: o que é e como funciona. **Toda Matéria**, [s.d.]. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/terapia-genica/>. Acesso em: 11 set. 2025

Em 1990, os Estados Unidos conduziram o primeiro protocolo clínico de terapia gênica em seres humanos, envolvendo duas crianças com imunodeficiência combinada severa. A conquista parcial desse protocolo gerou um aumento significativo no número de pesquisas voltadas para o uso terapêutico de genes. A empolgação gerada pelos primeiros resultados fez com que, ao longo da década de 1990, a terapia gênica passasse a ser comparada a outras inovações que transformaram a medicina moderna, como a criação de vacinas, técnicas de anestesia e a descoberta de antibióticos. A facilidade relativa de manipulação dos vetores genéticos provenientes de vírus, juntamente com o aumento na habilidade de isolar genes humanos, gerou grandes expectativas de progresso acelerado nesse tipo de terapia, causando também bastante

entusiasmo na mídia e nas pesquisas do campo. No entanto, esse otimismo inicial não foi respaldado, pois diversos problemas foram identificados em protocolos clínicos de terapia gênica aplicados a humanos, o que evidenciou que ainda há um longo caminho a seguir antes que essa tecnologia possa ser amplamente integrada na rotina dos hospitais. Contudo, avanços significativos têm sido realizados, e novas estratégias têm expandido o alcance da terapia gênica, criando novas oportunidades para seu uso. A elevação no número de protocolos clínicos demonstra as elevadas expectativas em relação à eficácia da terapia gênica para tratar enfermidades que afetam a sociedade há um período prolongado, com escassas opções na medicina tradicional. Dentre as importantes inovações recentes, salienta-se a aplicação de moléculas de RNA de fita dupla, que funcionam como silenciadores de genes por meio de processos que codificam a enzima timidina quinase em células que apresentam uma deficiência desse gene. A técnica adotada, utilizando DNA purificado, embora ofereça dados Evidentemente, ainda apresentava baixa eficiência. Assim, a recomendação previamente sugerida de empregar vírus inofensivos como veículos para a transferência de genes ganhou destaque. Essa proposta resultou em pesquisas aprofundadas, e nos anos de 1983 e 1984 foram introduzidos os primeiros sistemas de vetores originados de três tipos de vírus: retrovírus, adenovírus e vírus adenoassociados (AAV). (PROFESSORES DO DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA USP) Indivíduos que sofrem de condições genéticas são considerados possíveis receptores de terapia gênica, uma vez que a inserção de um gene saudável poderia melhorar sua condição clínica. Um exemplo simples de compreender é a hemofilia, na qual as pessoas apresentam uma alteração em um dos genes que desempenham um papel na produção de um dos fatores de coagulação. Se este elemento for novamente inserido na corrente sanguínea, o período de coagulação retorna aos níveis normais, prevenindo hemorragias que podem ser mortais. Os genes responsáveis pelos fatores VIII e IX (hemofilias A e B) foram clonados em diversos vetores. Para que exista um efeito terapêutico, é imprescindível que o gene se manifeste nas células de um tecido do paciente que permita a liberação do fator de coagulação na circulação sanguínea. Neste cenário, as células do fígado mostraram-se adequadas, visto que esse órgão recebe uma grande quantidade de sangue. Doenças genéticas que se desenvolvem ao longo da vida, como câncer, problemas cardíacos e infecções virais (como a Aids, por exemplo), são também focos de tratamentos de terapia gênica. A proposta nesses casos é essencialmente a inserção de genes que possam alterar o funcionamento das células tumorais, impedir a reprodução viral ou, simplesmente, ativar o sistema imunológico, proporcionando assim um benefício terapêutico ao paciente. Esses protocolos de terapia gênica para enfermidades genéticas adquiridas têm sido amplamente investigados devido à evidente importância que os êxitos podem trazer para a saúde das pessoas. (PROFESSORES DO DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA USP)

file:///C:/Users/Aluno/Downloads/frcosta,+06.pdf

#### 4.6 SISTEMA CRISPR-CAS9

A tecnologia CRISPR é um sofisticado método de edição genética baseado em um sistema de imunidade bacteriano contra infecções virais, que vem sendo estudado e aprimorado desde 2011. Atualmente, cientistas do mundo inteiro utilizam a técnica para edição de genes para as mais diversas aplicações. Na área de saúde humana, a CRISPR apresenta um grande potencial para revolucionar a maneira como lidamos com doenças genéticas desafiadoras para a medicina.

NASCIMENTO, L.X. CRISPR/Cas9: Como funciona e como pode revolucionar a medicina moderna?. Revista Blog do Profissão Biotec, v.8, 2021. Disponível em: <<https://profissaobiotec.com.br/crispr-funcionamento-pode-revolucionar-medicina/>> Acessado em: dd/mm/aaaa

CRISPR é um acrônimo de Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. Em poucas palavras, são famílias de sequências de DNA encontradas em certas bactérias. Essas sequências contêm, por sua vez, fragmentos de DNA de vírus que já infectaram essas bactérias anteriormente.

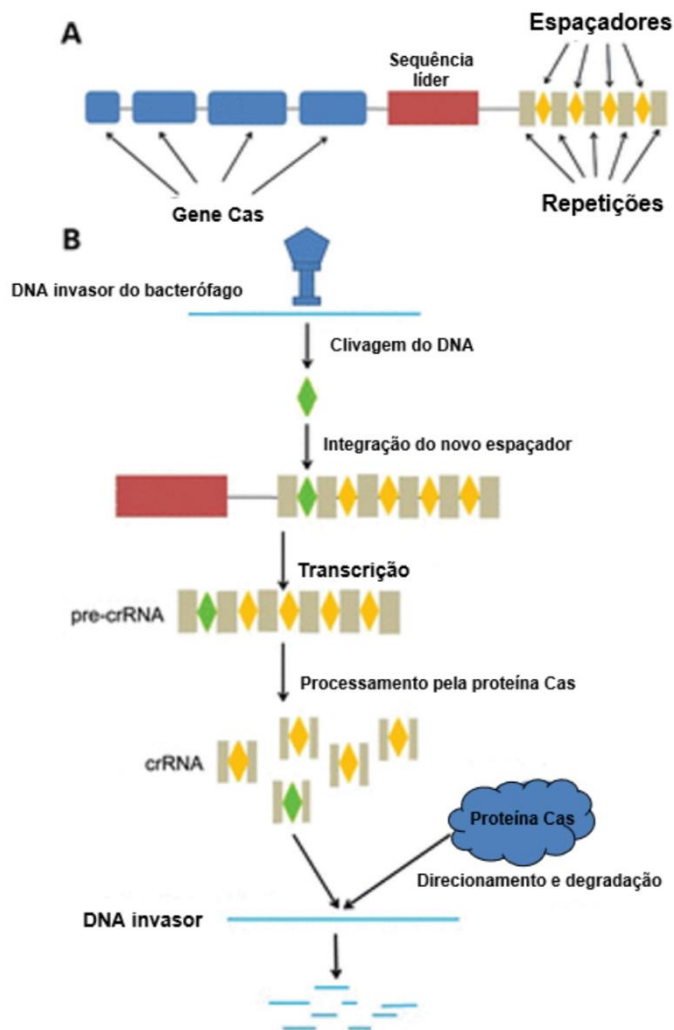
Os CRISPRs funcionam como uma memória imunológica, pois armazenam a impressão digital molecular dos vírus no DNA das bactérias. Dessa forma, novas infecções podem ser detectadas e neutralizadas, resultando na imunização destas células.

O funcionamento do CRISPR é simples de entender. Uma enzima chamada Cas9 age como uma "tesoura molecular". Ela é usada para cortar e modificar seções de DNA associadas a uma doença (ou, em outras palavras, um ataque de vírus), ou qualquer tipo de defeito que precise ser reparado.

Como a enzima encontra o local exato para cortar e agir? Outra molécula, o RNA guia, direciona estas "tesouras" para o local exato onde ocorreu a mudança de DNA. Uma vez feito o corte, os mecanismos necessários são colocados em andamento para reparar o fragmento.

Os CRISPRs são conhecidos desde os anos 80, embora sua função exata só tenha sido descoberta na última década. Em 2015, eles foram considerados o maior avanço científico do ano, pois tornaram possível decifrar essas sequências repetitivas presentes no DNA de algumas bactérias. Graças a eles, foram feitos enormes progressos no campo da edição genética, tornando os processos mais baratos e abrindo a porta para uma ampla gama de possibilidades.

Figura 4- Visão geral do sistema bacteriano CRISPR-cas9



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

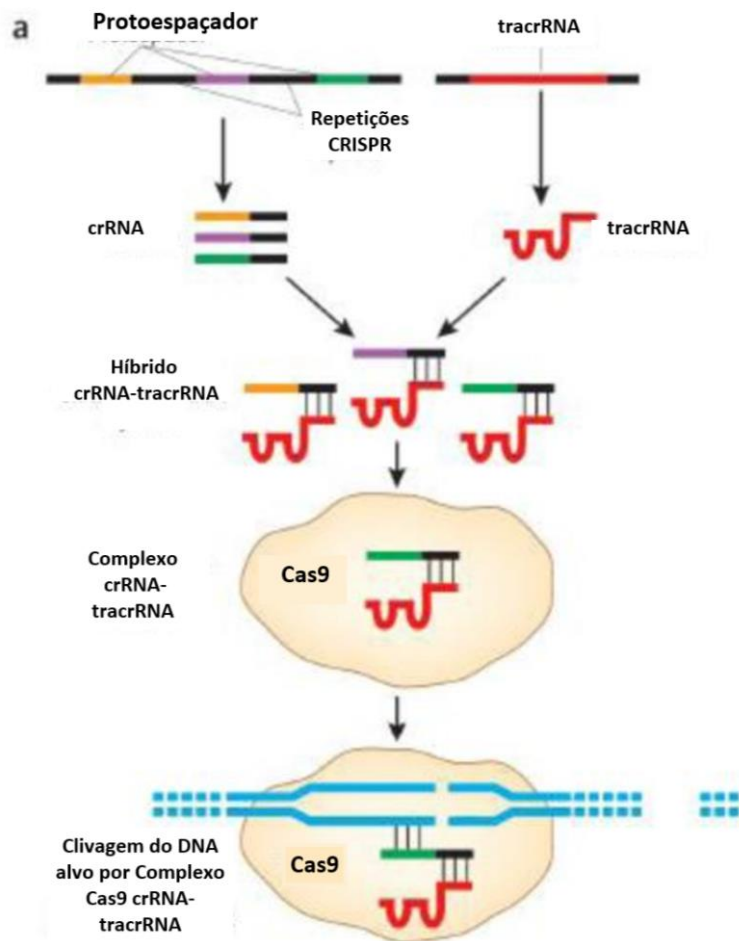
É composto por matrizes de espaçadores de repetição CRISPR, que podem ser posteriormente transcritas em RNA CRISPR (crRNA) e RNA CRISPR *transativador* (tracrRNA), e um conjunto de genes associados a CRISPR (cas) que codificam proteínas Cas com atividade de endonuclease.. Quando os procariontes são invadidos por elementos genéticos estranhos, o DNA estranho pode ser cortado em pequenos fragmentos por proteínas Cas, então os fragmentos de DNA serão integrados à matriz CRISPR como novos espaçadores . Uma vez que o mesmo invasor invade novamente, o crRNA reconhecerá e pareará rapidamente com o DNA estranho, o que guia a

proteína Cas para clivar sequências alvo de DNA estranho, protegendo assim o hospedeiro .

Koonin EV, Makarova KS CRISPR-Cas: um sistema de imunidade adaptativa em procariontes. F1000 Biol Rep. 2009;1:95. doi: 10.3410/B1-95. [ DOI ] [ Artigo gratuito do PMC ] [ PubMed ] [ Google Scholar ]

Makarova KS, Haft DH, Barrangou R., Brouns SJ, Charpentier E. Evolução e classificação dos sistemas CRISPR-Cas. Nat Rev Microbiol. 2011;9:467-477. doi: 10.1038/nrmicro2577. [ DOI ] [ Artigo gratuito do PMC ] [ PubMed ] [ Google Scholar]

Figura 5- Complexo cRNA- tracrRNA



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

Os seus dois domínios de clivagem são o domínio nucleásico tipo HNH, que cliva a 3 pares de bases a montante da sequência PAM na cadeia-alvo (“protospacer adjacente motif”, sequência conservada adjacente à sequência guia – em SpyCas9 é 5'-NGG-3', sendo N qualquer nucleótido); e o domínio nucleásico tipo RuvC, que cliva no mesmo local, mas na cadeia oposta à cadeia-alvo. A enzima só funciona quando ligada ao tracrRNA, pois necessita deste para ocorrer a sua ativação estrutural. Após formação do híbrido de reconhecimento RNA-DNA e da clivagem de ambas as cadeias, a enzima mantém-se ligada ao DNA recém-clivado até outros fatores celulares removerem a enzima.

Fonte: Universidade de Lisboa

## **4.7 GENES DE INTERESSE PARA A TERAPIA GÊNICA**

### **4.7.1 GENE CCR5**

O gene CCR5 está localizado na posição 21 do braço curto do cromossomo 3 (3p21) e codifica o receptor de quimiocinas CC humano do tipo 5, CCR5. Ele é composto por 4 éxons e 2 íntrons, e não há íntron entre os éxons 2 e 3. A transcrição é iniciada em 2 diferentes promotores, ambos ricos em adenina e timina. Padrões de splicing alternativo podem gerar dois transcritos diferentes da CCR5: a CCR5-A e a CCR5-B, que codificam uma proteína idêntica (CCR5) em diferentes tipos celulares. O padrão de regulação da expressão desses transcritos varia em resposta a uma variedade de sinais extracelulares, como citocinas e quimiocinas

<https://revistaft.com.br/pessoas-com-mutacao-no-receptor-ccr5-sao-resistentes-ao-hiv-sera-que-a-destruicao-desses-receptores-e-a-cura-para-essa-doenca/>

### **4.7.2 GENE CXCR4**

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

## **4.8 EDIÇÃO DOS CO RECEPTORES CXCR4 E CCR5**

Um receptor para PBSF/SDF-1 foi demonstrado ser o CXCR4, que é um correceptor de entrada para o HIV-1 com tropismo para linhagem de células T. Embora se acreditasse que as células murinas não possuíam correceptores funcionais, o CXCR4 murino permitiu a entrada do HIV-1 em células-alvo com CD4 humano. Além disso, foi identificado um pequeno inibidor de CXCR4 que bloqueia a entrada do HIV-1.

Os receptores de quimiocinas CCR5 são expressos em células T ativadas e estas têm perfil de citocina tipo Th1 (2). Entretanto as quimiocinas são muito menores

que as citocinas e desempenham sua atividade via receptores com sete  $\alpha$ -hélices

transmembrana acoplados à proteína G, os quais são típicos para atração de leucócitos

(1). O gene que codifica o CCR5 está localizado na região p21.3 do cromossomo 3

humano. Outros genes de receptores de quimiocinas estão próximos desta região. CCR5

é um dos receptores da família de quimiocinas CC (o qual se liga às quimiocinas CCL3,

CCL4, CCL5) presente principalmente em células do sistema imune como linfócitos e

macrófagos. Tem a função de encaminhar estas células ao sitio de inflamação(

Nagasawa T, Tachibana K, Kishimoto T. A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection. *Semin Immunol.* 1998 Jun;10(3):179-85. doi: 10.1006/smim.1998.0128. PMID: 9653044.

#### **4.9-Edição simultânea dos co receptores CXCR4 e CCR5**

Foram projetadas no estudo de Liu et al., 2017, duas combinações diferentes de gRNA visando CXCR4 e CCR5, em um único vetor. Os dois plasmídeos construídos foram referidos como lenti-X4R5-Cas9-#1(ou#1) e34 lenti-X4R5-Cas9-#2 (ou# 2),

Foram feitos ensaios, que mostraram que infecções dos vírus HIV-1 que possuem tropismo por CXCR4 ou CCR5 foram significativamente reduzidas em células CXCR4 e CCR5 modificadas, e as células editadas exibiram uma vantagem seletiva sobre células não modificadas durante a infecção por HIV-1. Foi realizada também uma análise fora do alvo, que mostrou que nenhuma edição não específica foi encontrada em outros locais previstos. Além disso, os ensaios de apoptose indicaram que a ruptura simultânea de CXCR4 e CCR5 em células T CD4+ primárias por CRISPR-Cas9 não tiveram efeitos citotóxicos óbvios na viabilidade celular (LIU et al., 2017).35

Existe a preocupação de que o uso de um CRISPR-Cas9 que inativa o CCR5 leve à seleção de cepas de HIV-1 X4-trópicas. Assim, o direcionamento de CCR5 sozinho não poderia ser usado em indivíduos que abrigam vírus de

trópico duplo ou misto, que é aproximadamente metade dos indivíduos com AIDS. Para proteger totalmente uma célula dos vírus R5 e X4-trópicos, seria necessária a edição simultânea de quatro alelos (YU et al., 2017).

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

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

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

Em estudos anteriores, os dois gRNAs CXCR4 direcionados e Cas9 inibiram eficientemente a infecção por HIV-1 em células T CD4 +. Já no estudo de Liu et al. 2017, foi relatado que cada um dos dois gRNAs CXCR4 juntamente com um gRNA CCR5, combinados em um vetor (lenti-X4R5-Cas9-#1, lenti-X4R5-Cas9-#2), pode romper CXCR4 e CCR5 simultaneamente em várias linhas celulares, bem como linfócitos T CD4+ primários. É importante ressaltar que as células modificadas são resistentes à infecção por HIV-1 CXCR4-trópica e CCR5-trópica e exibem uma vantagem seletiva sobre as células não modificadas durante todo o período de infecção por HIV-1. Foi verificado ainda que o lenti-X4R5-Cas9 poderia funcionar com 36 segurança sem qualquer edição ou citotoxicidade não específica após a interrupção de CXCR4 e CCR5. Portanto, o estudo de Liu et al., 2017, fornece uma base para o uso potencial do sistema CRISPR-Cas9 para bloquear eficientemente a infecção pelo HIV-1 em pacientes (LIU et al., 2017).

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

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

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

A partir de um estudo clínico, o Paciente de Essen, que era um paciente de 27 anos com infecção por HIV-1 e linfoma anaplásico de grandes células, recebeu um transplante de células-tronco CCR5 $\Delta$ 32 compatível com HLA, que foi semelhante ao paciente de Berlim. No entanto, ao invés deste paciente se curar do vírus como o paciente de Berlim, o resultado foi que o vírus mudou

para HIV-1 X4-trópico, assim mostrando que editar apenas CXCR4 ou CCR5 pode não ser suficiente. Portanto, a ruptura simultânea dos co receptores do HIV deve ser considerada (LIU et al., 2017).

Embora estudos sobre edição de CXCR4 e CCR5 em células sejam limitados, Yu et al., 2017 também relataram recentemente que eles37 interromperam com sucesso CXCR4 e CCR5 simultaneamente por CRISPR-Cas9 em linhas celulares e células T CD4 + primárias. No entanto, para especificidade e eficiência, mais sítios alvo CXCR4 e CCR5 devem ser considerados no estudo de edição simultânea dos dois genes por CRISPR-Cas9. Para isso ser possível é necessário que mais estudos detalhados sejam realizados a respeito da dupla edição dos co receptores do HIV (LIU et al., 2017).

Adachi, T., Tanaka, R., Kodama, A. *et al.* Identificação de um epítipo único do CXCR4 cuja ligação inibe a infecção pelos vírus da imunodeficiência humana tipo I trópicos para CXCR4 e CCR5. *Retrovirology* **8**, 84 (2011).

<https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-84>

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

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

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

Adachi, T., Tanaka, R., Kodama, A. *et al.* Identificação de um epítipo único do CXCR4 cuja ligação inibe a infecção pelos vírus da imunodeficiência humana tipo I trópicos para CXCR4 e CCR5. *Retrovirology* **8**, 84 (2011).

<https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-84>

(SITE FIOCRUZ). (GIOVANNA CASALI MENDES).