

EDIÇÃO GENÔMICA PELA TÉCNICA CRISPR-CAS9 EM CÉLULAS INFECTADAS PELO VÍRUS HIV: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA NARRATIVA

GENOMIC EDITING BY THE CRISPR-CAS9 TECHNIQUE IN HIV-INFECTED CELLS: A NARRATIVE LITERATURE REVIEW

Iara Dinik Santos Avelar¹, André Vessoni Alexandrino^{1*}

¹Centro Universitário Central Paulista – UNICEP, São Carlos, SP, Brasil.

*Autor correspondente: E-mail: aalexandrino@unicep.edu.br Endereço: Rua Miguel Petroni, 5111 - CEP: 13563 470 – São Carlos-SP – Brasil. Telefone: (16) 9 9782-1331

RESUMO

A AIDS é uma doença crônica causada pelo vírus HIV e que compromete o sistema imunológico do hospedeiro, deixando-o vulnerável a infecções oportunistas. As terapias atualmente disponíveis reduzem a carga viral, porém, não são eficazes em eliminar as formas latentes do vírus. Além disso, efeitos adversos e psicossociais têm peso significativo na vida dos usuários. Como medida alternativa, ferramentas moleculares têm sido testadas e desempenham importância na supressão viral. A recente técnica CRISPR-Cas9 foi desenvolvida a partir de um sistema adaptativo de bactérias contra vírus. Fragmentos de material genético exógeno são inseridos no genoma bacteriano e ao serem transcritos, associam-se às proteínas Cas, constituindo um maquinário de clivagem sítio-específica. Neste trabalho de revisão bibliográfica narrativa, descrevemos três mecanismos pelos quais o sistema CRISPR-Cas9 foi utilizado no controle da infecção do HIV através de *knockout* gênico em células infectadas. Uma vez que o vírus é dependente do correceptor CCR5 para interagir com a célula hospedeira, a técnica foi capaz de desencadear mutações no gene CCR5. Outra medida foi a utilização de regiões essenciais para o HIV, promovendo mutações no seu genoma e truncando a expressão de proteínas virais. Além disso, CRISPR-Cas9 foi aplicada como alternativa para reativar as formas latentes pela indução transcricional utilizando sistemas direcionadores de ativadores de transcrição SunTag e SAM. Sendo assim, a utilização da técnica CRISPR-Cas9 permitiu resultados significativos nas aplicações pelas diferentes vias, demonstrando ser uma ferramenta molecular com potencial na erradicação do vírus HIV.

Palavras-chave: edição genômica, AIDS, CCR5, *knockout* gênico.

ABSTRACT

AIDS is a chronic disease caused by the HIV virus that compromises the host's immunological system, leaving it vulnerable to opportunistic infections. Currently available therapies reduce the viral charge, however, they are not effective in eliminating latent forms of the virus. In addition, adverse and psychosocial effects have a significant impact on users' lives. As an alternative measure, molecular tools have been tested and play a key role in viral suppression. The recent CRISPR-Cas9 technique was developed from an adaptative system of bacteria against viruses. Fragments of exogenous genetic material are inserted into the bacterial genome and, when transcribed, associate to Cas proteins constituting a site-specific cleavage machinery. In this narrative bibliographic review, we described three mechanisms by which the CRISPR-Cas9 was

used to control HIV infection through gene knockout in infected cells. Since the virus is dependent on the CCR5 co-receptor to interact with the host cell, the technique can trigger mutations in the CCR5 gene. Another measure was the use of essential regions for HIV, promoting mutations in its genome and truncating the expression of the viral proteins. Furthermore, CRISPR-Cas9 has been applied as an alternative to reactivate latent forms by transcriptional induction using SunTag and SAM transcriptional activator targeting systems. Thus, the use of the CRISPR-Cas9 technique allowed remarkable results in applications through different ways and proving to be a molecular tool with potential for the eradication of the HIV virus.

Keywords: genomic editing; AIDS, CCR5, gene knockout.

INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença crônica causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) que compromete o sistema imunológico do hospedeiro, deixando-o suscetível a infecções oportunistas. Pelos dados do Programa Conjunto das Nações Unidas (UNAIDS), aproximadamente 38 milhões de pessoas no mundo estão vivendo com HIV. E mesmo com todos os esforços em medidas preventivas e tratamentos disponíveis, no Brasil foram diagnosticados 13.677 novos casos de infecção pelo HIV em 2020 (BRASIL, 2020).

A terapia antirretroviral (TARV) atua inibindo a reprodução do HIV, reduz a mortalidade dos portadores, garante uma melhora no sistema imunológico com relação às outras doenças, trazendo resultados positivos com a baixa disseminação viral para outras pessoas por reduzir a carga viral dos pacientes (SHEHU-XHILAGA *et al.*, 2005). Porém, tal terapia não é eficiente para erradicar a forma latente presente nas células (SAAYMAN *et al.*, 2016), na qual o material genético viral permanece inativo por longos períodos e, eventualmente, readquire a capacidade de voltar a se replicar, formando novas partículas virais que irão infectar outras células. Tais eventos, estimulados por mecanismos que ainda não são totalmente compreendidos, tornam o HIV um agente etiológico de uma doença crônica (XIAO; GUO; CHEN, 2019).

O Brasil disponibiliza acesso gratuito aos medicamentos e, apesar de existirem seis classes de drogas para o tratamento da infecção do vírus HIV, seu uso é complexo e traz impactos à vida dos pacientes (SEIDL *et al.*, 2007). Dentre os efeitos adversos, foram relatados casos de hipersensibilidade, acidose láctica e insuficiência renal aguda (TAN; WALMSLEY, 2013).

Identificado pela primeira vez em 1987 (ISHINO *et al.*, 1987), o locus CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas, do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), associado à endonuclease de corte duplo Cas9, tornou-se uma ferramenta de edição genética com diversas potencialidades e aplicações (HATOUM-ASLAN; MARRAFFINI, 2014). Após estudos sobre CRISPR, foi descoberto que esse locus constitui um mecanismo de defesa de procariotos contra novas invasões de um mesmo material genético exógeno, servindo como memória adaptativa (MOJICA; GARCÍA-MARTÍNEZ; SORIA, 2005; WEISS; SAMPSON, 2014), semelhante à capacidade que células humanas têm de reconhecer patógenos após contato prévio e combatê-los através da imunidade adaptativa por meio de anticorpos. A versatilidade desse mecanismo torna possível o combate ao vírus HIV através da utilização de RNAs-guias para localizar o genoma viral de forma sítio-específica silenciando genes (KAMINSKI *et al.*, 2016) ou bloqueando sua entrada nas células hospedeiras (LI *et al.*, 2015a).

Outras técnicas de edição genética mostraram-se promissoras na terapia contra o HIV, como as nucleases dedo de zinco (do inglês, *zinc finger nucleases*, ZFNs), com sua capacidade de provocar mutação em um local preciso no genoma, conferindo deleção dos genes CCR5 e CXCR4, que são essenciais para a interação do vírus com a célula hospedeira (DIDIGU *et al.*, 2014; TEBAS *et al.*, 2014). Porém, devido aos altos custos, ao tempo necessário e à baixa especificidade desta técnica (KHALILI *et al.*, 2015), CRISPR-Cas9 tornou-se uma alternativa mais flexível, com baixo custo (CONG *et al.*, 2013), baixa frequência de efeitos *off-targets* e eficiência demonstrada em células eucarióticas (CHO *et al.*, 2013), o que incentiva a pesquisa em aprimorar a técnica para uso em humanos. Além disso, a versatilidade da técnica permite sua ampla aplicabilidade pelos pesquisadores, principalmente em vírus com altas taxas de mutações, o que poderia ocasionar falha na supressão viral. Os resultados obtidos por Ebina e colaboradores (2013) na primeira aplicação de CRISPR-Cas9 em infecções por HIV sugerem uma possível ferramenta capaz de eliminar o HIV e, dessa forma, curar a AIDS.

Diante disso, este trabalho compreende uma revisão bibliográfica narrativa acerca dos princípios e aplicações da técnica CRISPR-Cas9 na terapia gênica ao HIV pelas vias de inativação de genes virais, reativação de reservatórios latentes e mutação de receptor CCR5 como alternativas para contornar as limitações das terapias medicamentosas.

METODOLOGIA

Foi realizada revisão bibliográfica narrativa utilizando as bases de dados bibliográficas PubMed e Google Acadêmico com os seguintes descritores: CRISPR, Cas9, HIV, *gene therapy* e Cas9, tendo como critério artigos publicados no período de 1981 a 2020 nos idiomas inglês e português.

Para critério de inclusão, foram selecionados os artigos que continham a utilização de CRISPR para terapia gênica contra o HIV, experimentos em células humanas e análises de resultados com baixos efeitos *off-targets*. Como critérios de exclusão, foram retirados artigos que não englobavam a utilização da enzima Cas9 ou uma das três vias de utilização da técnica CRISPR-Cas9 referenciadas neste trabalho.

VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA – HIV

O HIV é um retrovírus envelopado do gênero *Lentivirus*, com genoma de duas fitas simples de RNA que é reversamente transcrito pela enzima transcriptase reversa em DNA no citoplasma da célula hospedeira (TURNER; SUMMERS, 1999). Seu genoma de aproximadamente 9,8 kb possui terminações repetitivas longas em cada extremidade (do inglês, *Long Terminal Repeats* – LTR). Embora ambas terminações tenham a mesma sequência, a região 5' LTR é essencial para que haja sinais regulatórios de transcrição, importantes para a integração do DNA viral no genoma hospedeiro, formando o DNA pró-viral. A 3' LTR atua na terminação da transcrição e poliadenilação, podendo atuar como promotor quando a integridade de 5' LTR está comprometida (FREED, 2001). Seu genoma é composto por genes responsáveis pela estrutura da partícula viral (*gag*, *pol* e *env*), genes acessórios (*vif*, *vpr* e *nef*) e genes regulatórios (*tat* e *rev*), responsáveis pela integração e manutenção da partícula viral (FANG *et al.*, 2013).

INFECÇÃO PELO VÍRUS HIV

As principais vias de transmissão do HIV são as relações sexuais sem uso de preservativo, o compartilhamento de agulhas e a transmissão vertical. Após a infecção, ocorre a interação entre as glicoproteínas 120 (gp120) e 41 (gp41) do envelope viral com o receptor de superfície CD4 principalmente de linfócitos T, interagindo com os correceptores CCR5 e CXCR4, variando pelo tropismo viral (XIAO; GUO; CHEN, 2019) formando poros de fusão e a liberação do material genético dentro da célula (TURNER; SUMMERS, 1999).

No citoplasma hospedeiro, o RNA viral é reversamente transcrito pela enzima transcriptase reversa na direção 5', sintetizando um DNA complementar ao RNA, movido em seguida para a extremidade 3' para continuar a síntese da fita de DNA, com o segmento híbrido sendo degradado pela enzima RNase H. A fita dupla de DNA termina de ser sintetizada pela transcriptase reversa e segue para o núcleo da célula para ser integrado no genoma celular pela enzima integrase, sendo, então, denominado provírus (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; FREED, 2001).

Uma vez que a célula é ativada, o provírus será transcrito pela RNA polimerase II da célula infectada, resultando em pré-RNAm que serão processados e enviados ao citoplasma para tradução das proteínas necessárias para a montagem de novas partículas virais, seguido do brotamento dessas partículas pela membrana da célula hospedeira para infecção de novas células (FREED, 2001).

Alguns vírus permanecem no interior da célula dentro de vacúolos formando reservatórios virais, os quais estão relacionados com o silenciamento gênico do provírus através de vários mecanismos (RUELAS; GREENE, 2013), podendo voltar a ser transcrito e produzir novas partículas virais (BIALEK *et al.*, 2016), sendo esta a principal dificuldade na terapia contra o HIV (MARTIN; SILICIANO, 2016). (XIAO; GUO; CHEN, 2019)

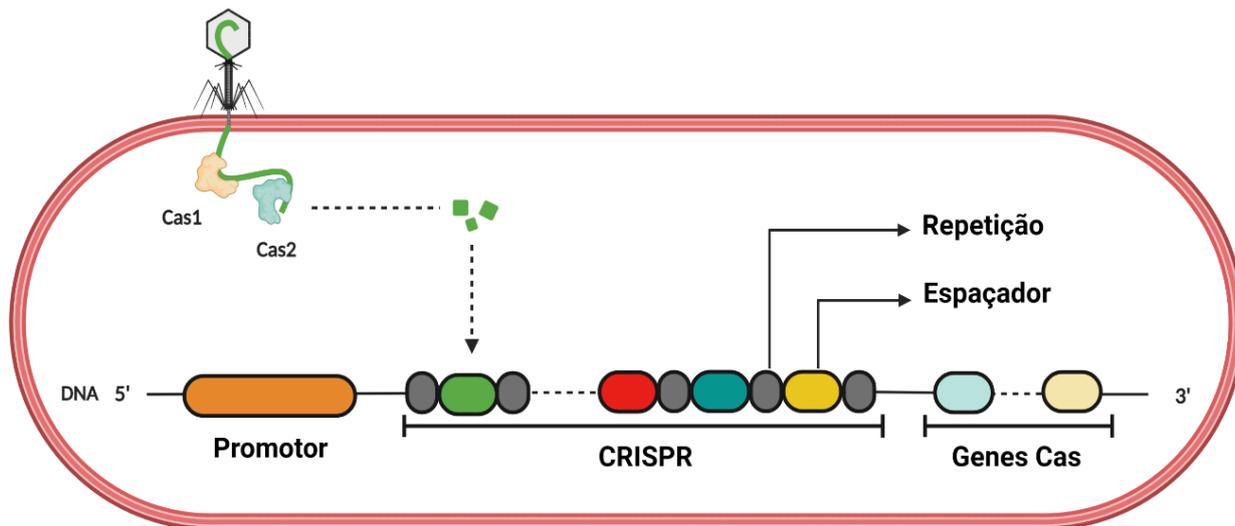
CRISPR-CAS9

CRISPR-Cas é uma maquinaria adaptativa que protege organismos procaríotes contra invasões após contato prévio com DNA exógeno (HORVATH; BARRANGOU, 2010). A sigla CRISPR foi atribuída após consenso pela comunidade científica devido às sequências repetidas que possuem sequências espaçadoras intercaladas entre elas (JANSEN *et al.*, 2002). Essas sequências originam RNA-guias (crRNA – CRISPR-derived RNA) que direcionarão o complexo aos alvos específicos homólogos a cada espaçador (MAKAROVA *et al.*, 2011).

Essas sequências espaçadoras são produtos da clivagem do material genético exógeno que foram acrescentados para servir como memória adaptativa (MOJICA; GARCÍA-MARTÍNEZ; SORIA, 2005) (Figura 1), e que serão transcritas em RNAs-guias para localizar o material genético exógeno e destruí-lo. Bolotin *et al.* (2005) descreveram que não havia sucesso na infecção viral em bactérias que possuíam espaçadores compatíveis ao genoma do vírus.

Os genes *Cas* (CRISPR-associated) localizados próximos ao locus CRISPR codificam polimerases, nucleases e helicases que atuarão no genoma-alvo para depois inserir os fragmentos nos espaçadores, favorecendo a resistência em futuras invasões do mesmo material genético (PEREIRA, 2016) (Figura 1).

Figura 1 - Locus CRISPR. Aquisição de novos espaçadores pela atuação das enzimas Cas1 e Cas2 a partir do genoma viral desconhecido. Fonte: Autoria própria (figura criada com www.biorender.com).



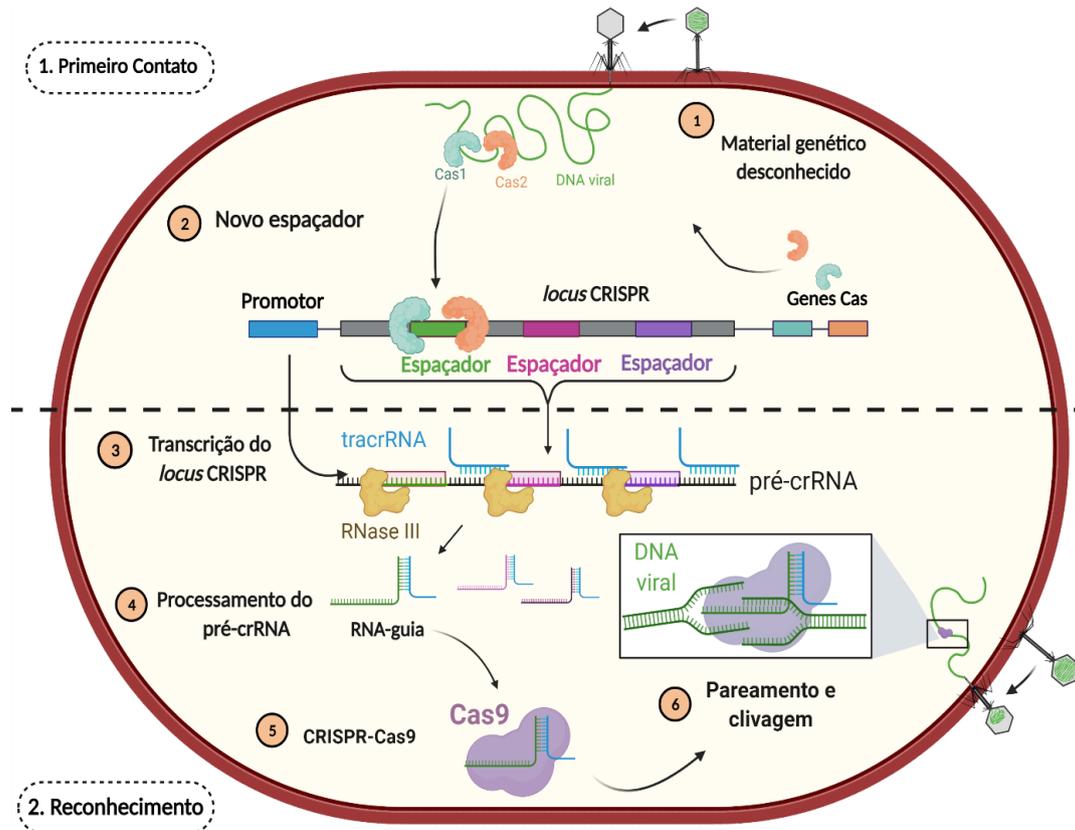
O locus CRISPR pode ter sido transmitido de um ancestral Archaea para o domínio Bacteria horizontalmente (MAKAROVA *et al.*, 2006), e apesar desse sistema não ser totalmente compreendido, CRISPR-Cas9 é uma ferramenta genética promissora que, além de possuir diversas outras aplicações (WRIGHT; NUÑEZ; DOUDNA, 2016), pode ser empregada na terapia contra o HIV pela possibilidade de atuar de forma sítio-específico.

MECANISMOS DE AÇÃO DO SISTEMA CRISPR-CAS9

A enzima Cas9 possui dois lóbulos em sua estrutura, um de reconhecimento (REC) e outro de atividade nucleásica (NUC). No lóbulo NUC estão presentes os domínios de clivagem e interação com PAM (Motivo Adjacente ao Protoespaçador, do inglês “*Protospacer Adjacent Motif*”), uma sequência de poucos nucleotídeos comum em diversos sistemas CRISPR, que auxilia no reconhecimento da Cas9 com o DNA-alvo (JINEK *et al.*, 2012). Devido à especificidade dessa sequência, Kleinstiver *et al.* (2015) estudaram mecanismos de utilizar Cas9 mutantes para serem compatíveis com variações de PAM.

São necessários dois RNAs para que a Cas9 seja ativada e exerça sua função no alvo. Em processos naturais, são necessários um crRNA e um tracrRNA (*trans-activating RNA*) (PEREIRA, 2016). O crRNA é produto dos espaçadores após ser processado e o tracrRNA é um RNA não codificante complementar ao crRNA (ISHINO; KRUPOVIC; FORTERRE, 2018) (Figura 2). Para tornar a técnica de edição mais prática, ambos foram fundidos para formar o sgRNA (RNA-guia) (CONG *et al.*, 2013; HSU; LANDER; ZHANG, 2014; JINEK *et al.*, 2012), testado em procariotos (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). O sgRNA realiza o direcionamento da Cas9 e a interação com a sequência-alvo a ser clivada através do reconhecimento de PAM (PEREIRA, 2016).

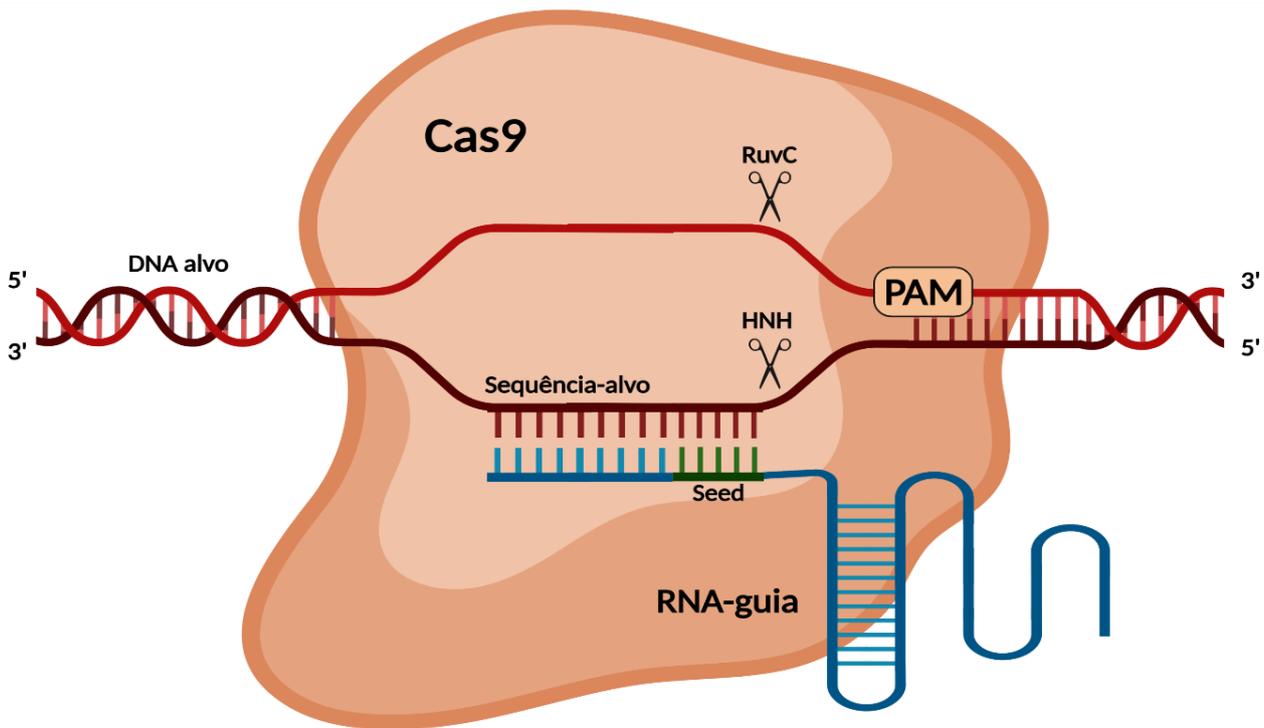
Figura 2 - Mecanismo CRISPR-Cas9. (1) O DNA desconhecido é injetado dentro da célula. (2) Enzimas sintetizadas a partir dos genes Cas realizam a clivagem do DNA e inserem fragmentos no locus CRISPR em forma de um novo espaçador. (3) O locus CRISPR é transcrito em um segmento de RNA (pré-crRNA) constituído de espaçadores e sequências repetidas que, após processamento (4) dará origem ao RNA-guia. (5) A enzima Cas9 é guiada ao DNA viral a partir do RNA-guia correspondente a ele. (6) Após o reconhecimento da sequência específica, a maquinaria CRISPR-Cas9 abre as fitas de DNA e realiza a clivagem do DNA exógeno. Fonte: Adaptado de "CRISPR-Cas9 Adaptive Immune System of *Streptococcus pyogenes* Against Bacteriophages" por BioRender.com (2021). Retirado de <https://app.biorender.com/biorender-templates>



Uma vez que o reconhecimento acontece, uma mudança na conformação de Cas9 faz com que haja interação com o domínio PAM (PEREIRA, 2016) e essa interação causa a separação das duas fitas do DNA-alvo (ANDERS *et al.*, 2014). Com a abertura das fitas, o domínio *seed*, presente na sequência-guia, interage com o sequência-alvo. A atuação de *seed* é essencial para garantir o pareamento entre as sequências (SEMENOVA *et al.*, 2011). Após o pareamento, a maquinaria Cas9 pode clivar as duas fitas do DNA-alvo (Figura 3).

No lóbulo NUC da Cas9, os domínios de clivagem RuvC e HNH, clivam a sequência da fita complementar e a sequência-alvo, respectivamente, formando extremidades abruptas (JINEK *et al.*, 2012), que serão reparadas por mecanismos naturais da célula: Ligação de extremidades não homólogas (do inglês, "Non-homologous end joining" – NHEJ) e reparo dirigido por homologia (do inglês, "Homology directed repair" – HDR). Quando não há homologia entre as pontas, o reparo é feito pelo mecanismo NHEJ que unirá as duas pontas causando mutação de inserção ou deleção de nucleotídeos (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). Entretanto, se há homologia entre as pontas abruptas, ocorre recombinação homóloga entre extremidades (PEREIRA, 2016).

Figura 3 - Complexo CRISPR-Cas9. Reconhecimento da sequência-alvo por seed e alinhamento com PAM. Fonte: Autoria própria (figura criada com www.biorender.com).



BLOQUEIO DA ENTRADA DO VÍRUS HIV PELA DELEÇÃO DO GENE CCR5

Os correceptores de membrana CCR5 são os principais intermediários que permitem a interação entre o vírus HIV e a célula hospedeira através do receptor CD4 (COCCHI *et al.*, 1995). Os receptores CD4 desempenham importante papel funcional na imunidade, não sendo recomendável sua inativação (XIAO; GUO; CHEN, 2019). A utilização da Cas9 com sgRNA específico na região 3' a jusante do start códon (ATG) do gene CCR5 (NERYS-JUNIOR *et al.*, 2018) causa sua deleção, promovendo resistência às células pelo bloqueio da entrada do vírus (LI *et al.*, 2015b). A mutação natural no gene CCR5 é uma condição autossômica recessiva e estudos mostram que teve origem na Europa, onde há uma frequência de 10 a 20% (LIBERT *et al.*, 1998; NERYS-JUNIOR *et al.*, 2018). Entretanto, indivíduos que possuem a inativação do gene CCR5 podem viver de forma saudável (BITI *et al.*, 1997; SAMSON *et al.*, 1996).

Cho e colaboradores (2013) realizaram experimentos para avaliar a eficiência do sgRNA-Cas9 na inativação do gene CCR5 utilizando uma Cas9 recombinante para clivar uma sequência de 23 pb do gene humano CCR5 em um DNA plasmidial. A presença de um RNA sintético foi essencial para que a clivagem ocorresse, validando o controle com a ausência de clivagem no plasmídeo que não possuía a sequência alvo. Em seguida, foi testada a eficiência da técnica em células humanas HEK 293T com o uso do repórter RFP-GFP, obtendo resultados de expressão de 5% para 7% em três experimentos independentes somente com células que foram transfectadas com RNA quimérico e um plasmídeo que codificava uma Cas9, provando que a técnica é eficaz em células eucarióticas (CHO *et al.*, 2013).

A interrupção de um gene foi testada com o uso de uma endonuclease T7 tipo I que cliva sequências de DNA híbridas do tipo selvagem e mutante e depois foram analisadas por PCR, o que mostrou mutações no alvo. Além disso, indícios de clivagens precisas foram obtidos através de uma reprogramação no complexo sgRNA-Cas9, substituindo o alvo CCR5 para o C4BPB, no qual induções de mutações cromossômicas em células K562 obtiveram frequências de 5% para 33% em três experimentos independentes. Análise de PCR revelou inserções precisas de uma ou duas bases no sítio de clivagem, igualmente as que foram obtidas para o gene CCR5 (CHO *et al.*, 2013).

INATIVAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO HIV

O HIV-1 utiliza a maquinaria celular hospedeira e seus genes regulatórios precisam ser expressos para iniciar seu ciclo. As extremidades LTR são responsáveis por integrar o DNA viral no genoma hospedeiro e regular fatores de transcrição. Apesar da grande diversidade genética do HIV-1 e do fato de que mutações podem causar incompatibilidade com os gRNAs, a técnica de CRISPR-Cas9 está em constante evolução e sequências específicas podem ser desenvolvidas (MALI *et al.*, 2013).

Lebbink e colaboradores (2017) avaliaram a eficácia de CRISPR-Cas9 como ferramenta de edição genética utilizando gRNAs específicos para a região LTR (LTR6), matriz (MA3) e integrase (IN5) expressos em um vetor lentiviral juntamente à Cas9. Células Jurkat foram infectadas com uma linhagem geneticamente modificada do HIV e os vetores contendo os gRNAs LTR6, MA3 e IN5, separadamente. Análises das sequências mostraram eventos de inserções e deleções (*indels*) em frequências de 100% (LTR6), 76% (MA3) e 90.1% (IN5). Em seguida, os autores avaliaram se as mutações no genoma viral seriam eficientes no bloqueio da expressão gênica viral. Para isso, utilizaram a inserção de um gene repórter (GFP) no genoma viral que seria expresso sob estímulos de TNF- α , dois gRNAs, LTR4 e LTR6, para a região LTR (SPI e TAR respectivamente). Sob estímulo de TNF- α , foi observada a reativação de 35% das células infectadas latentes. Com a introdução dos gRNAs específicos para a LTR, houve redução significativa da expressão do GFP em 40% para o LTR4 e 95% para o LTR6, uma potencialização de mais de 98% de redução na combinação de ambos gRNAs.

O uso combinado de gRNA também previne o escape viral, uma vez que foi avaliada a eficiência da utilização separada e combinada de gRNAs (MA3 + PR2, MA3 + IN5 e PR2 + IN5). Os autores observaram que, separadamente, a replicação viral permanecia, uma vez que o reparo celular NHEJ causa mutações e facilita o escape viral. Entretanto, a utilização de duplos gRNAs para diferentes regiões previne o escape e interrompe a replicação viral (LEBBINK *et al.*, 2017).

Outros pesquisadores obtiveram resultados significantes na utilização de gRNAs duplos para supressão de genes do HIV-1 com algo nas regiões U3 e R de LTRs e remoção do genoma viral em linfócitos T CD4 (EBINA *et al.*, 2013; KAMINSKI *et al.*, 2016).

REATIVAÇÃO DOS RESERVATÓRIOS LATENTES DO HIV

A maior barreira para terapia contra o HIV continua sendo os reservatórios dormentes presentes nas células infectadas e que podem perdurar por anos (BRUNER; HOSMANE; SILICIANO, 2015). A ativação dos fatores de transcrição do provírus latente depende de vários mecanismos de indução celular que podem ocorrer de forma espontânea e recomeçar o ciclo reprodutivo viral (BIALEK *et al.*, 2016). A importância de induzir o ciclo viral nas células infectadas com a forma latente é imprescindível para

que as alternativas terapêuticas, imunológicas e medicamentosas alcancem e atuem nas partículas virais produzidas (LEBBINK *et al.*, 2017; XIAO; GUO; CHEN, 2019).

Medicamentos com ativadores dos fatores de transcrição LRAs (do inglês, *Latency Reversing Agents*) não se provaram eficientes em induzir os reservatórios do provírus em simulação *ex vivo* de células T-CD4⁺ (HO *et al.*, 2013), além de provocarem baixa redução dos reservatórios em células diferentes das CD4 (DARCIS *et al.*, 2015). Direcionar ativadores de transcrição diretamente no sítio de interesse pode sobrepujar condições epigenéticas que interferem na eficácia de medidas terapêuticas, como os LRAs (BIALEK *et al.*, 2016).

O gRNA possui a capacidade de localizar o sítio-alvo através dos sistemas SunTag e SAM derivados de CRISPR-Cas9 (BIALEK *et al.*, 2016). O sistema SunTag é um complexo formado por uma sequência de peptídeos que se acoplam a uma dCas9 (*dead Cas9*) de atividade catalítica inativada de *Streptococcus pyogenes*, para amplificar sinais de fluorescência e é guiado por um gRNA. Cada peptídeo é reconhecido por um fragmento de anticorpo de cadeia simples scFv (do inglês *single-chain variable fragment*). A dCas9 pode ser fusionada a um tetrâmero da proteína VP16, formando uma VP64, que é um fator de transcrição do *Herpesvirus simplex* tipo 1, com receptor para acoplar o anticorpo GCN4 (BIALEK *et al.*, 2016).

O sistema SAM (do inglês, *Synergistic Activation Mediator*) é formado por uma fusão da dCas9-VP64, um gRNA modificado (mod. gRNA) é capaz de realizar ligação com a proteína de revestimento de bacteriófagos MS2, que pode se ligar às subunidades p65 e HSF1. A junção desses componentes potencializa a ativação transcricional no sítio-alvo (BIALEK *et al.*, 2016).

Os dois sistemas, SunTag e SAM, foram utilizados para realizar induções transcricionais em células com reservatórios e analisar a melhor região do DNA viral para induzir. A sequência U3 da região LTR 5', loci de fatores de transcrição viral, seriam os locais de abordagem mais eficiente. Para confirmação, foram utilizados em ambos sistemas nove gRNA desenhados especificamente para LTR 5', dando foco à região U3 (gRNAs 3-8) de células TZM-bl derivadas de HeLa, com HIV-LTR dependente de luciferase (BIALEK *et al.*, 2016). Os resultados mostraram que os dois sistemas reportaram forte expressão gênica nos alvos dos gRNAs 3-6. Porém, SAM mostrou maiores níveis expressos acima do controle negativo (gRNAs 5 e 6). Além disso, os gRNAs 3-6 mostraram que região entre 230 pb e 106 pb a montante do sítio de início de transcrição indica um local eficiente para alvo (BIALEK *et al.*, 2016).

CONCLUSÕES

As medidas terapêuticas disponíveis atualmente para o controle da AIDS possuem limitações devido à impossibilidade de eliminar o vírus HIV e ao impacto na qualidade de vida dos pacientes. O principal obstáculo para a cura da AIDS é a formação dos reservatórios virais que perduram por anos e podem voltar a replicar partículas virais em um ciclo contínuo.

As técnicas moleculares ampliam o alcance no controle de doenças, principalmente as que atuam de forma sítio-específica. CRISPR-Cas9 demonstrou grande efetividade em manipular o genoma viral com baixos efeitos *off-targets*. Pesquisas aqui referenciadas obtiveram êxito em bloquear a entrada do HIV-1 por meio da deleção do correceptor CCR5, que é fundamental para sua interação com a célula hospedeira, interromper a expressão gênica viral pela utilização de gRNA com sequências específicas para regiões que codificam proteínas essenciais e reativar as formas latentes pela utilização de sistemas com ativadores de transcrição.

Embora as aplicações dessa técnica sejam promissoras, é imprescindível discutir a respeito dos aspectos bioéticos relacionados à manipulação de DNA em humanos, mesmo que em prol de benfeitorias. Pesquisas com relatos a longo prazo dos efeitos *off-targets* causados pelas mutações causadas pela técnica são essenciais para a melhor compreensão e aprimoramento da ferramenta molecular. Portanto, os resultados obtidos pelos pesquisadores e descritos neste trabalho são pilares para o desenvolvimento seguro e aplicável da técnica CRISPR-Cas9 em ensaios com humanos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2008.
- ANDERS, C. *et al.* Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 569–573, 2014.
- ARGYRIS, E. G.; POMERANTZ, R. J. HIV-1 Vif versus APOBEC3G: newly appreciated warriors in the ancient battle between virus and host. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 4, p. 145–148, 2004.
- BARTHOLOMEEUSEN, K. *et al.* Histone deacetylase inhibitors (HDACis) that release the positive transcription elongation factor b (P-TEFb) from its inhibitory complex also activate HIV transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 20, p. 14400–14407, 2013.
- BIALEK, J. K. *et al.* Targeted HIV-1 latency reversal using CRISPR/Cas9-derived transcriptional activator systems. **PLoS one**, v. 11, n. 6, p. e0158294, 2016.
- BITI, R. *et al.* HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. **Nature medicine**, v. 3, n. 3, p. 252–253, 1997.
- BOLOTIN, A. *et al.* Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 2551–2561, 2005.
- BOUR, S.; STREBEL, K. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 11, p. 1029–1039, 2003.
- BRUNER, K. M.; HOSMANE, N. N.; SILICIANO, R. F. Towards an HIV-1 cure: measuring the latent reservoir. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 4, p. 192–203, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico de HIV/Aids. Brasília. 2020. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2020/boletim-epidemiologico-hivaids-2020>. Acesso em: 09 de julho de 2021.
- CHEN, S.; YU, X.; GUO, D. CRISPR-Cas targeting of host genes as an antiviral strategy. **Viruses**, v. 10, n. 1, p. 40, 2018.
- CHO, S. W. *et al.* Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 230–232, 2013.
- COCCHI, F. *et al.* Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. **Science**, v. 270, n. 5243, p. 1811–1815, 1995.
- CONG, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819–823, 2013.

- DARCIS, G. *et al.* An in-depth comparison of latency-reversing agent combinations in various in vitro and ex vivo HIV-1 latency models identified bryostatin-1+ JQ1 and ingenol-B+ JQ1 to potently reactivate viral gene expression. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 7, p. e1005063, 2015.
- DIDIGU, C. A. *et al.* Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors ccr5 and cxcr4 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 123, n. 1, p. 61–69, 2014.
- DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, 2014.
- DUAN, J. *et al.* Genome-wide identification of CRISPR/Cas9 off-targets in human genome. **Cell research**, v. 24, n. 8, p. 1009–1012, 2014.
- EBINA, H. *et al.* Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. **Scientific reports**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2013.
- FANG, X. *et al.* An unusual topological structure of the HIV-1 Rev response element. **Cell**, v. 155, n. 3, p. 594–605, 2013.
- FREED, E. O. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. **Virology**, v. 251, n. 1, p. 1–15, 1998.
- FREED, E. O. HIV-1 replication. **Somatic cell and molecular genetics**, v. 26, n. 1, p. 13–33, 2001.
- FRIEDMAN-KIEN, ALV. E. *et al.* Disseminated Kaposi's sarcoma in homosexual men. **Annals of internal medicine**, v. 96, n. 6, p. 693–700, 1982.
- GALLO, R. C. A reflection on HIV/AIDS research after 25 years. **Retrovirology**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2006.
- GARBIN, C. A. S.; GATTO, R. C. J.; GARBIN, A. J. I. Adesão à terapia antirretroviral em pacientes HIV soropositivos no Brasil: uma revisão da literatura. **Archives of Health Investigation**, v. 6, n. 2, 2017.
- GOTTLIEB, M. S. *et al.* Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 305, n. 24, p. 1425–1431, 1981.
- GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução à Genética**. 11ª ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2019.
- HATOUM-ASLAN, A.; MARRAFFINI, L. A. Impact of CRISPR immunity on the emergence and virulence of bacterial pathogens. **Current opinion in microbiology**, v. 17, p. 82–90, 2014.
- HE, J. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. **Journal of virology**, v. 69, n. 11, p. 6705–6711, 1995.
- HO, Y.-C. *et al.* Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. **Cell**, v. 155, n. 3, p. 540–551, 2013.
- HORVATH, P.; BARRANGOU, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. **Science**, v. 327, n. 5962, p. 167–170, 2010.
- HOU, P. *et al.* Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2015.
- HSU, P. D.; LANDER, E. S.; ZHANG, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1262–1278, 2014.

- HU, W. *et al.* RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 31, p. 11461–11466, 2014.
- ISHINO, Y. *et al.* Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429–5433, 1987.
- ISHINO, Y.; KRUPOVIC, M.; FORTERRE, P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. **Journal of bacteriology**, v. 200, n. 7, p. e00580-17, 2018.
- JANSEN, R. *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1565–1575, 2002.
- JIANG, W.; MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas: new tools for genetic manipulations from bacterial immunity systems. **Annual review of microbiology**, v. 69, p. 209–228, 2015.
- JINEK, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **science**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 2012.
- KAMINSKI, R. *et al.* Elimination of HIV-1 genomes from human T-lymphoid cells by CRISPR/Cas9 gene editing. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 2016.
- KANG, H. *et al.* CCR5 disruption in induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 provides selective resistance of immune cells to CCR5-tropic HIV-1 virus. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 4, p. e268, 2015.
- KHALILI, K. *et al.* Genome editing strategies: potential tools for eradicating HIV-1/AIDS. **Journal of neurovirology**, v. 21, n. 3, p. 310–321, 2015.
- KLEINSTIVER, B. P. *et al.* Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. **Nature**, v. 523, n. 7561, p. 481–485, 2015.
- LEBBINK, R. J. *et al.* A combinational CRISPR/Cas9 gene-editing approach can halt HIV replication and prevent viral escape. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.
- LI, C. *et al.* Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4+ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 8, p. 2381–2393, 2015a.
- LI, C. *et al.* Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4+ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 8, p. 2381–2393, 2015b.
- LIBERT, F. *et al.* The Δ CCR5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. **Human molecular genetics**, v. 7, n. 3, p. 399–406, 1998.
- LIU, Z. *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**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2017.
- MAKAROVA, K. S. *et al.* A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. **Biology direct**, v. 1, n. 1, p. 1–26, 2006.
- MAKAROVA, K. S. *et al.* Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. **Biology direct**, v. 6, n. 1, p. 1–27, 2011.

- MALI, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 823–826, 2013.
- MARTIN, A. R.; SILICIANO, R. F. Progress toward HIV eradication: case reports, current efforts, and the challenges associated with cure. **Annual review of medicine**, v. 67, p. 215–228, 2016.
- MATSUI, M. *et al.* Effects of HIV-1 Tat on expression of HLA class I molecules. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 11, n. 3, p. 233–240, 1996.
- MBONYE, U.; KARN, J. The molecular basis for human immunodeficiency virus latency. **Annual review of virology**, v. 4, p. 261–285, 2017.
- MOJICA, F. J. M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; SORIA, E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. **Journal of molecular evolution**, v. 60, n. 2, p. 174–182, 2005.
- NERYS-JUNIOR, A. *et al.* Comparison of the editing patterns and editing efficiencies of TALEN and CRISPR-Cas9 when targeting the human CCR5 gene. **Genetics and molecular biology**, v. 41, n. 1, p. 167–179, 2018.
- PEREIRA, T. C. Introdução à técnica de CRISPR. **Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética**, 2016.
- POLZER, S. *et al.* Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1. **Glycobiology**, v. 11, n. 1, p. 11–19, 2001.
- QI, C. *et al.* Inducing CCR5 Δ 32/ Δ 32 homozygotes in the human Jurkat CD4⁺ cell line and primary CD4⁺ cells by CRISPR-Cas9 genome-editing technology. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 12, p. 267–274, 2018.
- RATHORE, A. *et al.* CRISPR-based gene knockout screens reveal deubiquitinases involved in HIV-1 latency in two Jurkat cell models. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.
- RUELAS, D. S.; GREENE, W. C. An integrated overview of HIV-1 latency. **Cell**, v. 155, n. 3, p. 519–529, 2013.
- SAAYMAN, S. M. *et al.* Potent and targeted activation of latent HIV-1 using the CRISPR/dCas9 activator complex. **Molecular therapy**, v. 24, n. 3, p. 488–498, 2016.
- SAMSON, M. *et al.* Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. **Nature**, v. 382, n. 6593, p. 722–725, 1996.
- SEIDL, E. M. F. *et al.* Pessoas vivendo com HIV/AIDS: variáveis associadas à adesão ao tratamento anti-retroviral. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 2305–2316, 2007.
- SEMENOVA, E. *et al.* Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 25, p. 10098–10103, 2011.
- SHARP, P. M. *et al.* The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 356, n. 1410, p. 867–876, 2001.
- SHEHU-XHILAGA, M. *et al.* Antiretroviral compounds: mechanisms underlying failure of HAART to eradicate HIV-1. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 15, p. 1705–1719, 2005.

- SIEGAL, F. P. *et al.* Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. **New England Journal of Medicine**, v. 305, n. 24, p. 1439–1444, 1981.
- SYMONS, J.; CAMERON, P. U.; LEWIN, S. R. HIV integration sites and implications for maintenance of the reservoir. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 13, n. 2, p. 152, 2018.
- TAN, D. H. S.; WALMSLEY, S. L. Management of persons infected with human immunodeficiency virus requiring admission to the intensive care unit. **Critical care clinics**, v. 29, n. 3, p. 603–620, 2013.
- TEBAS, P. *et al.* Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 10, p. 901–910, 2014.
- TURNER, B. G.; SUMMERS, M. F. Structural biology of HIV. **Journal of molecular biology**, v. 285, n. 1, p. 1–32, 1999.
- WANG, G. *et al.* CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. **Virus Research**, v. 244, p. 321–332, 2018.
- WATSON, J. D. *et al.* **Biologia molecular do gene**. [s.l.] Artmed Editora, 2015.
- WEISS, D.; SAMPSON, T. CRISPR-Cas systems: new players in gene regulation and bacterial physiology. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, p. 37, 2014.
- WRIGHT, A. V; NUÑEZ, J. K.; DOUDNA, J. A. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. **Cell**, v. 164, n. 1–2, p. 29–44, 2016.
- XIAO, Q.; GUO, D.; CHEN, S. Application of CRISPR/Cas9-based gene editing in HIV-1/AIDS therapy. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 69, 2019.
- YE, L. *et al.* Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 26, p. 9591–9596, 2014.
- ZHU, W. *et al.* The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. **Retrovirology**, v. 12, n. 1, p. 1–7, 2015.