



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

CURSO DE MEDICINA

Louise Gramacho Lopes

**USO DA FERRAMENTA GÊNICA CRISPR/CAS9 NA TERAPIA CONTRA
HIV/AIDS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Salvador - Bahia

2022

LOUISE GRAMACHO LOPES

**USO DA FERRAMENTA GÊNICA CRISPR/CAS9 NA TERAPIA CONTRA
HIV/AIDS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial para aprovação no quarto ano do curso.

Orientador: Rogério Grimaldi Sampaio.

Salvador - Bahia

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu orientador por todo direcionamento e incentivo durante a elaboração deste trabalho; bem como a minha professora Alcina Andrade pela paciência, ensinamentos e acompanhamento atencioso.

Minha gratidão a meus pais, meus maiores mentores, por terem sempre estimulado a busca pelo conhecimento e por todas instruções e incentivos nesse caminho em busca do fazer ciência.

Agradeço a meus amigos de faculdade por terem me acompanhado e provido suporte durante essa caminhada.

Sou grata à Beatriz Peixoto que me proporcionou todo apoio e compreensão e sem a qual não conseguiria ter concluído esse projeto.

RESUMO

Introdução: Apesar de esforços envolvendo tratamento e prevenção, o HIV/AIDS continua sendo um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Atualmente, o tratamento da doença é feito com a Terapia Antirretroviral (TARV), que consegue suprimir a replicação viral, porém não consegue erradicar o vírus de reservatórios latente, tornando a AIDS uma doença crônica e incurável. Assim, a terapia gênica baseada em Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas associadas a Proteína 9 (CRISPR/CAS9, do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromics Repeats/ CRISPR associated protein 9*) surge como uma possibilidade de tratamento capaz de interferir em vários estágios do ciclo viral. **Objetivos:** Avaliar a eficácia *in vivo* e *in vitro* da ferramenta de edição gênica CRISPR/CAS9 no tratamento de HIV/AIDS. **Métodos:** Este trabalho é uma revisão sistemática guiada pelas orientações da Cochrane e Prisma, utilizando a base de dados MedLine/Pubmed, Cochrane e Embase. Foram incluídos estudos *in vivo* e *in vitro* publicados entre 2014-2020 em inglês e português que utilizaram a CRISPR/CAS9 como forma de eliminação da infecção. Foi utilizado o ARRIVE como método de avaliação da qualidade dos artigos, sendo incluídos artigos com uma pontuação de no mínimo 70%. **Resultados:** Dos 2433 estudos encontrados na pesquisa, 10 cumpriam os critérios de elegibilidade para análise geral sendo 20% dos estudos *in vivo* e 80% estudos *in vitro*. Dos estudos analisados, 90% demonstraram melhora significativa no desfecho após a edição gênica com a CRISPR/CAS9. Apenas 1 estudo apresentou a técnica da CRISPR/CAS9 como insuficiente para inibir completamente a replicação viral em células T. A principal limitação foi a falta de estudos em modelos animais e ensaios clínicos, não podendo, assim, obter informações definitivas sobre a segurança do tratamento em humanos ou sobre os efeitos da terapia a longo prazo. **Conclusão:** Os resultados obtidos na presente pesquisa demonstraram que a CRISPR/CAS9 é uma ferramenta eficaz para edição gênica *in vivo* e *in vitro*, conseguindo editar os alvos do HIV com sucesso e diminuir o nível de infecção viral. Contudo, não há no presente momento evidência confirmatória de sua eficácia a longo prazo, sendo necessários estudos subsequentes, principalmente em modelos animais clinicamente relevantes e ensaios clínicos.

Palavras-chave: Edição gênica. CRISPR/CAS9. HIV/AIDS. Terapia gênica.

ABSTRACT

Introduction: Despite efforts involving treatment and prevention, HIV/AIDS remains a major public health problem in Brazil and worldwide. Currently, the main form of treatment of the disease is Antiretroviral Therapy (ART), which can suppress viral replication, but cannot eradicate the virus from latent reservoirs, making AIDS a chronic and incurable disease. Therefore, gene therapy based on Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated with Protein 9 (CRISPR/CAS9) emerges as a possibility of treatment capable of interfering in several stages of the viral cycle. **Aim:** To evaluate the *in vivo* and *in vitro* efficacy of the CRISPR/CAS9 gene editing tool as a treatment of HIV/AIDS. **Methods:** This work is a systematic review guided by Cochrane and Prisma guidelines, using the MedLine/Pubmed, Cochrane and Embase databases. *In vivo* and *in vitro* studies published between 2014-2020 in English and Portuguese that used CRISPR/CAS9 as a means of eliminating infection were included. ARRIVE was used as a method of evaluating the quality of the articles, with 70% being the minimal score. **Results:** Of the 2433 studies found in the survey, 10 met the eligibility criteria for analysis, 20% of which were *in vivo* studies and 80% were *in vitro* studies. Out of the studies analyzed, 90% demonstrated significant improvement in outcome after gene editing with CRISPR/CAS9. Only 1 study presented the CRISPR/CAS9 technique as insufficient to completely inhibit viral replication in T cells. The main limitation of this review was the lack of studies in animal models and clinical trials, thus not being possible to obtain definitive information on the safety of the treatment in humans or its long-term effects. **Conclusion:** The results obtained in the present research demonstrated that CRISPR/CAS9 is an effective tool for *in vivo* and *in vitro* gene editing, managing to successfully edit HIV targets and decrease the level of viral infection. However, there is currently no confirmatory evidence of its long-term efficacy, and further studies are needed, mainly in clinically relevant animal models and clinical trials.

Keywords: Gene editing. CRISPR/CAS9. HIV/AIDS. Gene therapy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVO	10
3. REVISÃO DE LITERATURA	11
4. MÉTODO.....	15
4.1 DESENHO DO ESTUDO	15
4.2 ESTRATÉGIA DE BUSCA.....	15
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	15
4.4 IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE ESTUDOS.....	15
4.5 EXTRAÇÃO DE DADOS E ANÁLISE	16
4.6 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE METODOLÓGICA DOS ARTIGOS.....	16
4.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	16
5. RESULTADOS.....	17
5.1 SELEÇÃO DOS ESTUDOS	17
5.2 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS.....	18
Tabela 1 – Características gerais dos estudos.....	18
Tabela 2 – Resultados e sumário dos estudos pre-clínicos selecionados	24
6. DISCUSSÃO	25
REFERÊNCIAS:	28
ANEXO A	33
ANEXO B	35

1. INTRODUÇÃO

O Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). O HIV é um retrovírus com genoma de RNA da subfamília *Lentiviridae*. As principais formas de transmissão do vírus incluem transmissão sexual, sanguínea e vertical, sendo responsável por uma das maiores pandemias virais da história humana, permanecendo, ainda hoje, como uma crise global.^{1,2} O estigma e discriminação, insuficiência de recursos em países de baixa e média renda, alta taxa mutacional do vírus e a falta de um tratamento propriamente curativo, são reconhecidos como condutores da persistência da epidemia de HIV.^{2,3}

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 33 milhões de pessoas já morreram devido a infecção pelo HIV, sendo que aproximadamente 38 milhões de pessoas viviam com AIDS no mundo no final de 2019.⁴ No Brasil, estima-se que 43.941 novos casos de infecção pelo HIV e 37.161 casos de AIDS foram diagnosticados apenas em 2018. Nota-se ainda, um aumento de casos na população mais jovem, com cerca de 5.500 meninas jovens (de 15 a 24 anos) sendo infectadas toda semana.⁵ Assim, o HIV/AIDS continua sendo um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo.⁶

Atualmente, o tratamento da doença é feito com a Terapia Antirretroviral (TARV). Esta, consegue suprimir a replicação viral, porém não consegue erradicar o vírus de reservatórios latente, tornando a AIDS uma doença crônica e incurável.^{7,8} Ademais, é importante considerar os custos da terapia, resistência aos medicamentos e efeitos colaterais.⁹ Por isso, a pesquisa de novas abordagens terapêuticas é um conceito atrativo e necessário. Uma dessas abordagens é a terapia gênica.

Nesse contexto, a terapia gênica baseada em Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas associadas a Proteína 9 (CRISPR/CAS9, do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR associated protein 9*) surge como uma possibilidade próspera. O aparato da CRISPR/CAS9 tem a capacidade de interferir em vários estágios do ciclo viral, podendo ter como alvo o genoma viral e características do hospedeiro.^{7,10} A ferramenta, tem sido usada em diversas pesquisas com HIV devido a sua

simplicidade, alta eficiência e rapidez quando comparada com outras ferramentas de edição gênica.^{7,11}

Talvez uma das aplicações mais promissoras da técnica CRISPR/CAS9 seja a geração de resistência ao HIV pela inativação do gene *CCR5*. Isso porque, essa edição é validada pela genética humana, já que há pessoas saudáveis com a mutação no gene *CCR5*.¹² Além disso, pesquisa-se também a inativação do correceptor CXCR4 e a interrupção simultânea do *CCR5* e CXCR4.¹³ Outra estratégia tem como foco DNA proviral do HIV-1 integrado. Esse DNA, uma vez integrado ao genoma é um alvo para excisão.⁹ O HIV integra seu DNA proviral no genoma da célula hospedeira. Isso constitui uma barreira para a erradicação completa do vírus. Pensando nisso, estratégias que constituem uma opção atraente para a cura funcional do HIV/AIDS têm como alvo específico, exatamente, a integração do DNA proviral do HIV à célula hospedeira, tornando o DNA proviral um alvo para excisão ou desativação.⁹

Desde a primeira aplicação da CRISPR/CAS9 na eliminação da infecção pelo HIV, em 2013, por meio da interrupção do provirus do HIV latente, diversos estudos reportaram a supressão eficiente da replicação do HIV.¹⁴ Exemplo disso, é um estudo feito em 2019 que conseguiu demonstrar que a ferramenta CRISPR/CAS9 é capaz de remover a infecção viral em reservatórios latentes de camundongos humanizados infectados com HIV-1.¹⁵ Ademais, resultados impressionantes foram relatados em relação à interrupção da transcrição do gene *CCR5* em células tronco hematopoiéticas CD34⁺ a longo prazo e à expressão do gene *CXCR4* em células T CD4⁺ humanas e de macacos rhesus.^{16,17}

A CRISPR/CAS9 surge no campo de estudo do HIV como uma ferramenta versátil e estimulante. Apesar disso, ainda existem desafios a serem superados. Para o sucesso terapêutico do mecanismo, é importante reduzir as edições fora do alvo, bem como considerar a eficácia da entrega da CRISPR/CAS9 as células.⁷ Porém, não há dúvidas de que a CRISPR/CAS9 oferece uma gama de possíveis aplicações terapêuticas para o HIV e com isso a esperança para a eventual erradicação deste. Por isso, observa-se um crescente número de evidências na literatura, sendo relevante uma revisão desses estudos, a fim de atualizar o estado da arte sobre o tema, buscando pesquisar e entender o funcionamento da CRISPR/CAS9 em células infectadas. Assim, tendo

em vista a relevância do assunto, o presente estudo visa revisar por meio de revisão bibliográfica a aplicabilidade e eficácia da terapia baseada em CRISPR/CAS9 no HIV.

2. OBJETIVO

Avaliar a eficácia *in vivo* e *in vitro* da ferramenta de edição gênica CRISPR/CAS9 no tratamento de HIV/AIDS.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a infecção pelo HIV, tendo como alvo as células do sistema imune do ser humano, principalmente as células T CD4⁺.¹⁸ A invasão do vírus nessas células resulta na destruição destas e enfraquecimento do sistema de defesa.^{19,20} O estágio mais avançado da infecção é a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, caracterizada pela ocorrência de infecções oportunistas, neoplasias e uma contagem de linfócitos T CD4⁺ abaixo de 200 células/mm³.¹⁸

Atualmente, o principal tratamento para HIV/AIDS é a Terapia Antirretroviral (TARV), que conta com várias drogas, impede a replicação viral e assim, controla a quantidade de vírus no organismo.²¹ Normalmente, a TARV consiste em três drogas administradas pela via oral diariamente, sendo duas inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e a terceira pode ser um inibidor de protease, inibidor de integrase ou um inibidor não-nucleosídeos de transcriptase reversa.²²

Graças a TARV, a mortalidade e morbidade de pessoas infectadas pelo HIV apresentou uma diminuição, resultando no aumento da expectativa de vida das pessoas que vivem com hiv.²³ Contudo, alguns desafios permanecem, como a adesão ao tratamento. A não-adesão a TARV representa uma grande ameaça à efetividade do tratamento e melhora na qualidade de vida, já que está diretamente relacionada ao desenvolvimento de resistência viral e falha da terapia.²⁴ Algumas barreiras que corroboram para uma menor adesão são: idade mais jovem, problemas de saúde mental, ingestão de álcool, baixo nível educacional, doença avançada e alta carga de comprimidos. Os níveis de adesão a TARV na América Latina e Caribe podem não ser suficientes para a supressão do vírus a longo prazo, como afirma Costa et al (2018).²⁵

Apesar da TARV conseguir reduzir a viremia, a infecção pelo HIV continua incurável, em grande parte, devido a persistência do HIV em reservatórios latentes.²⁶ Células T CD4⁺ de memória de vida longa em latência são um dos reservatórios da infecção pelo HIV que não sofrem a morte por efeitos citopáticos induzidos pelo vírus, persistindo após a infecção e abrigando o DNA do vírus integrado no genoma da célula.^{27,28} Esses reservatórios latentes são estabelecidos dias após início da infecção aguda e continuam com capacidade de realizar replicação viral e serem ativados.^{28,29}

Consequentemente, as drogas antirretrovirais precisam ser tomadas pelo resto da vida, aumentando, assim, a probabilidade de problemas na adesão e surgimento de efeitos adversos.³⁰ Associado a isso, têm-se ainda, que uma intervenção curativa eficaz que poderia superar as limitações do TARV, combater o estigma e discriminação – muitas vezes ainda atrelados com o diagnóstico de HIV- e prevenir novas infecções, sendo, assim, importante a busca por tratamentos alternativos.^{7,8,31}

Uma abordagem atraente de tratamento que vêm ganhando força nos últimos anos é a terapia gênica utilizando a CRISPR/CAS9. A CRISPR/CAS9 é um sistema de corte de DNA presente em células procarióticas. Esse sistema proporciona imunidade aos procariotos e contribui em funções como a regulação gênica.³² No complexo CRISPR/CAS9, a endonuclease CAS9 se associa com uma estrutura de RNA guia (composta de CRISPR RNA e CRISPR RNA de ativação em trans). Juntos, esses elementos conseguem identificar e cortar seções específicas de DNA.^{33,34} A partir do reconhecimento do domínio PAM (do inglês *Protospacer Adjacent Motif*) na sequência de DNA alvo, o complexo CAS9 liga-se a esse domínio e o RNA guia desenrola uma fita da dupla hélice de DNA. Posteriormente, os dois domínios de nuclease da CAS9 fazem um corte para clivar a fita de DNA alvo e a fita de DNA não-alvo.^{34,35} A tecnologia da CRISPR/CAS9 proporciona uma ferramenta de terapia gênica que é simples, de alta eficiência e rápida. Por isso, tem sido amplamente aplicada na pesquisa da busca de uma nova abordagem para tratamento do HIV/AIDS.^{7,8}

A infecção pelo HIV se inicia por meio da ligação da glicoproteína de envelope gp120 ao receptor CD4 da célula alvo, promovendo uma mudança conformacional na gp120 que facilita sua ligação aos correceptores CCR5 ou CXCR4. A partir dessa associação, a glicoproteína de envelope gp41 se funde à membrana da célula hospedeira e integra a membrana viral com a celular, permitindo a entrada do núcleo capsídeo viral na célula hospedeira. Então, a transcriptase reversa transforma o RNA viral em DNA de fita dupla viral, que será inserido no cromossoma do hospedeiro por meio da enzima integrase. Esse genoma integrado será transcrito e traduzido e, em células T ativadas, haverá a produção de proteínas e novas partículas virais.^{13, 28}

A ferramenta de edição genômica tem o potencial de alterar as células do hospedeiro para que não sejam mais susceptíveis a uma infecção pelo HIV.³⁶ Nos últimos anos,

pesquisadores têm focado na inativação dos correceptores CCR5 e CXCR4. Um estudo feito por Xu et al. tendo como alvo o gene *CCR5*, utilizou o sistema CRISPR/CAS9 em células tronco hematopoiéticas CD34⁺. O estudo alcançou interrupção do gene *CCR5 in vivo* a longo prazo.¹⁶ Resultado semelhante foi encontrado por Cho et al., em um estudo que conseguiu silenciar o gene *CCR5* utilizando a CRISPR/CAS9 em células humanas renais embrionárias.³⁷ Estratégias similares vêm sendo aplicadas para inibir a expressão do receptor CXCR4, como demonstra Hou et al., em um estudo que interrompeu a expressão do gene *CXCR4* em células T CD4⁺ humanas e de macacos rhesus.¹⁷

Como o reservatório latente é uma das principais barreiras para a cura, têm-se colocado em foco estudos com alvo na eliminação e inativação do próviro de HIV. Em 2013, Ebina et al. conseguiu usar com sucesso a CRISPR/CAS9 clivar e mutar sequências alvo de repetições terminais longa, do inglês *Long Terminal Repeats* (LTR).¹⁴ As LTR são sequências de nucleotídeos localizadas nas pontas do genoma retroviral. Essas sequências estão envolvidas na regulação da expressão viral e da transcrição de RNA viral.³⁸ Além de clivar e mutar o LTR alvo, a CRISPR/CAS9 conseguiu remover genes virais do cromossomo da célula hospedeira, inibindo efetivamente a transcrição e replicação proviral, demonstrando, assim, seu potencial como uma possível diminuição da infecção pelo HIV.¹⁴

Uma outra abordagem de tratamento é a combinação da TARV de liberação lenta de longa duração (LASERART, do inglês *long-acting slow-effective release antiretroviral therapy*) com a CRISPR/CAS9. A LASERART é uma versão de longa duração dos medicamentos antirretrovirais existentes hoje, que foi projetada para atingir reservatórios virais, sendo suas propriedades definidas por dissolução lenta da droga, maior lipofilicidade e biodisponibilidade, bem como, toxicidade fora do alvo limitada.¹⁵ Essa ferramenta consegue diminuir a replicação viral à níveis indetectáveis por mais tempo, contudo, ela sozinha não consegue eliminar a vírus latente das células hospedeiras. Em paralelo a isso, tem-se que a CRISPR/CAS9 é mais eficiente em um cenário de maior restrição viral e menor carga de DNA proviral. Logo, seria benéfico o uso da LASERART combinado com a CRISPR/CAS9, pois a LASERART conseguiria suprimir a replicação viral por tempo e à níveis suficientes para que a CRISPR/CAS9 atue mais eficazmente.^{15,39}

No presente momento, ainda não há uma cura para o HIV/AIDS. Uma intervenção permanente e efetiva, colaboraria com o controle da doença, diminuiria obstáculos relacionados com adesão e resistência ao tratamento e reduziria a necessidade de um tratamento vitalício.³¹ Com o progressivo desenvolvimento da CRISPR/CAS9, a ferramenta passa a ser, cada vez mais, uma forte candidata à um método curativo do HIV. Com essa perspectiva, o número de pesquisas tendo enfoque a aplicação da CRISPR/CAS9 no tratamento do HIV amplia diariamente.⁴⁰ Diante dessa percepção, a atual revisão pretende analisar e explanar os princípios, funções, limitações e aplicabilidade do tratamento do HIV com base na técnica CRISPR/CAS9.

4. MÉTODO

4.1 DESENHO DO ESTUDO

O presente estudo trata-se de uma revisão sistemática, tendo sido utilizado o protocolo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis* (PRISMA) como guia para sua construção (Anexo A).

4.2 ESTRATÉGIA DE BUSCA

As buscas foram realizadas no período de julho a outubro de 2021 nas bases de dados eletrônicas MEDLINE/Pubmed, Cochrane, Embase, sendo guiadas pelas orientações da Cochrane e Prisma, através da combinação de descritores, incluindo *Medical Subject Headings (MESH)*, Descritores em Ciência da Saúde (DECS) e contrações de descritores. A revisão alcançou publicações escritas em inglês e português. Os termos empregados para busca foram: (((((((((((HIV) OR (AIDS)) OR ("Human Immunodeficiency Virus")) OR (Acquired Immune Deficiency Syndrome Virus)) AND (Genetic Therapy)) AND (gene editing)) AND (crispr cas9)) OR ("CRISPR-Associated Protein 9")). Referências presentes nos artigos identificados pela estratégia de busca também foram procuradas, manualmente, a fim de se somarem ao trabalho e à revisão da literatura.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos estudos *in vivo* e *in vitro* encontrados nas bases de dados descritas à cima, realizados em células infectadas pelo HIV e em modelos experimentais da infecção humana do HIV que utilizaram a CRISPR/CAS9 como forma de eliminação da infecção, publicados nos últimos sete anos (2014-2020) em português e em inglês. Foram excluídos trabalhos que utilizaram outras formas de terapia gênica como tratamento e trabalhos que utilizarem a CRISPR/CAS9 em outras doenças que não a AIDS.

4.4 IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE ESTUDOS

O autor realizou a leitura dos títulos e resumos dos trabalhos pré-selecionados a partir da pesquisa nos bancos de dados pré-determinados, aplicando os critérios e elegibilidade para identificar os estudos que preencherem corretamente os critérios de exclusão e inclusão. Os artigos duplicados e trabalhos que não cumpriram os

critérios de elegibilidade foram retirados. Então, foi feita a leitura na íntegra dos estudos selecionados, assegurando os critérios da revisão sistemática.

4.5 EXTRAÇÃO DE DADOS E ANÁLISE

Extração de dados foi feita através de tabela de preenchimento pelo autor. As características de interesse dos estudos incluíram: ano de publicação do estudo, origem geográfica, tipo de estudo, mudanças observadas com o tratamento, forma de entrega da CRISPR/CAS9 e alvo da CRISPR/CAS9.

4.6 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE METODOLÓGICA DOS ARTIGOS

Para a avaliação da qualidade metodológica dos estudos selecionados e inclusão na revisão sistemática foi utilizada a ferramenta ARRIVE, a qual se traduz pelo emprego de uma lista de checagem (*checklist*) e que avalia informações que deveriam estar presentes na introdução, resumo, objetivos, metodologia, resultados e discussão de artigos que descrevem estudos *in vivo* e *in vitro*. Os estudos tiveram que apresentar, obrigatoriamente, pontuação igual ou superior de 70% em sua avaliação para serem incluídos (Anexo B).

4.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

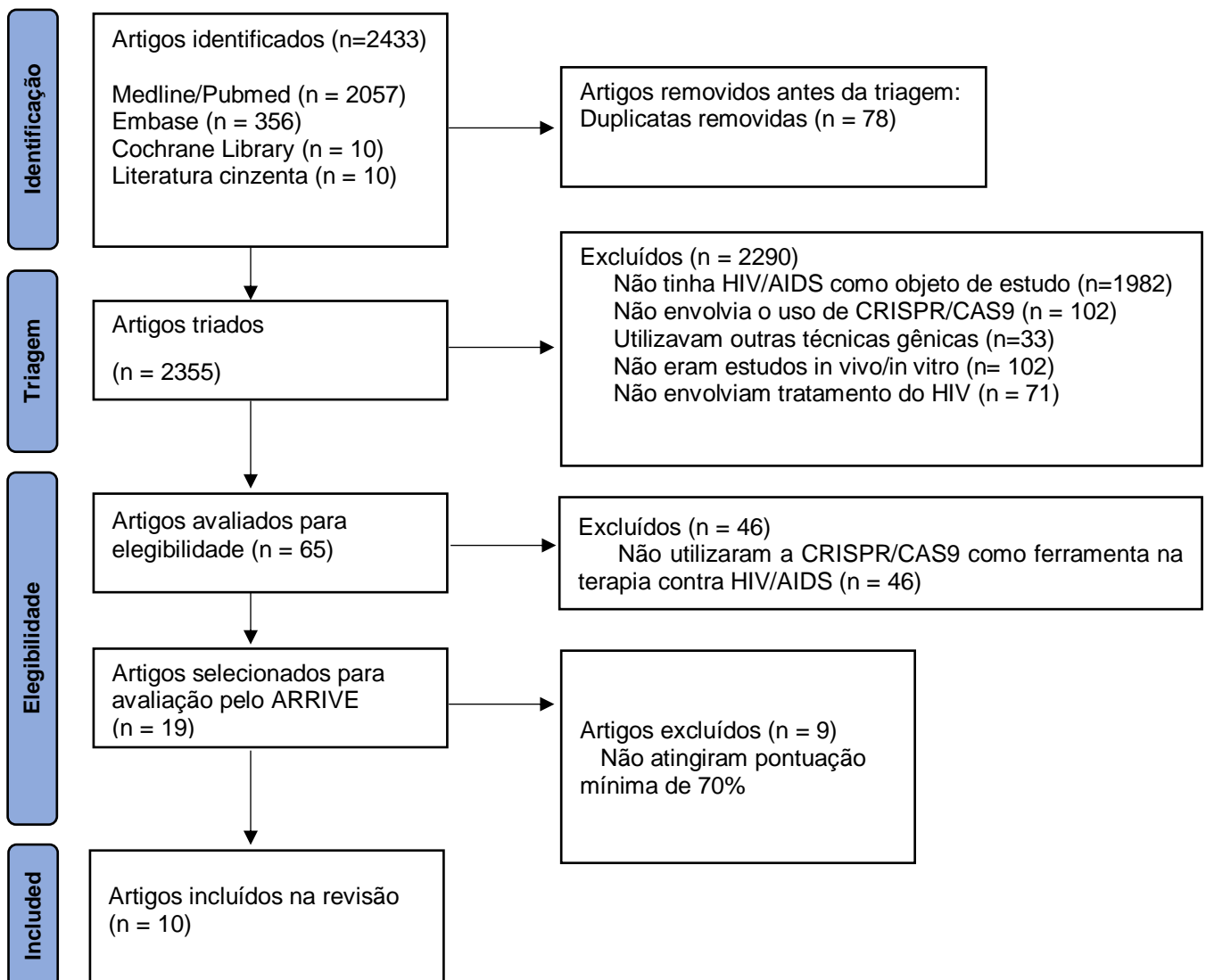
Considerando as recomendações da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, este projeto, por tratar-se de uma revisão sistemática, não foi necessário submeter ao Comitê de Ética em Pesquisa

5. RESULTADOS

5.1 SELEÇÃO DOS ESTUDOS

A busca bibliográfica resultou em 2433 artigos, dos quais 1982 foram excluídos por não utilizar o HIV como objeto de estudo, 102 não envolviam o uso da CRISPR/CAS9 como ferramenta, 33 utilizavam outras técnicas gênicas, 102 não eram estudos *in vivo* ou *in vitro* e 71 não envolviam o tratamento do HIV. Após essa análise inicial, 65 artigos foram submetidos à revisão completa, dos quais 46 foram excluídos por não utilizar a CRISPR/CAS9 como ferramenta na terapia contra HIV/AIDS. Em seguida, os 19 estudos restantes foram submetidos a avaliação de qualidade metodológica (Figura 1).

Figura 1 – Fluxograma dos estudos avaliados nesta revisão.



5.2 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

Após avaliação de qualidade pelo ARRIVE, restaram 10 estudos que foram incluídos nessa revisão sistemática. Todos os artigos foram publicados entre 2015 e 2017, em inglês, sendo 20% dos estudos *in vivo* e 80% estudos *in vitro*. A pontuação do ARRIVE variou entre 70 e 90%, demonstrando bom nível de qualidade dos estudos selecionados. A maioria dos estudos foram realizados em países asiáticos, sendo 4 realizados na China e 2 no Japão. Três artigos foram estudos multicêntricos, tendo sido 2 deles realizados nos E.U.A e China e 1 nos E.U.A e Japão. Apenas 1 estudo foi realizado nos E.U.A somente (Tabela 1).

Tabela 1 – Características gerais dos estudos

Nome do autor	Ano de publicação	Local	Desenho do estudo	Pontuação no ARRIVE
Limsirichai et al. ⁴¹	2016	E.U.A	Estudo <i>In vitro</i>	90%
Xiao et al. ⁴²	2019	China	Estudo <i>In Vivo</i>	80%
Teng et al. ⁴³	2018	China	Estudo <i>In Vitro</i>	80%
Ophinni et al. ⁴⁴	2018	Japão	Estudo <i>In Vitro</i>	80%
Ueda et al. ⁴⁵	2016	Japão	Estudo <i>In Vitro</i>	70%
Liao et al. ⁴⁶	2015	E.U.A, Japão	Estudo <i>In Vitro</i>	80%
Liu et al. ⁴⁷	2017	China	Estudo <i>In Vitro</i>	70%
Xu et al. ¹⁶	2017	China	Estudo <i>In Vivo</i>	80%
Wang et al. ⁴⁸	2017	E.U.A, China	Estudo <i>In Vitro</i>	80%
Hou et al. ⁴⁹	2015	E.U.A, China	Estudo <i>In Vitro</i>	70%

Limsirichai et al.⁴¹ projetou sete sgRNAs para se sobrepor às principais regiões do LTR. A região U3 foi alvo dos sgRNAs 1–5, já a região R foi direcionada pelo sgRNA 6, enquanto a região U5 foi direcionada pelo sgRNA 7. Foi avaliada a capacidade de dois complexos de CRISPR distintos para induzir a ativação do gene: dCas9-VP64 e o complexo de mediador de ativação sinérgica/SAM (*synergistic activation mediator*). Foi verificado que a expressão do gene ativado por SAM a partir do LTR excedeu o sistema dCas9-VP64. Ademais, foi observado que os sistemas CRISPR conseguiram a induzir a expressão latente do HIV-1.

Xiao et al.⁴² identificou dois sgRNAs (sgRNA- # 6 e # 8) que poderiam guiar a CRISPR/CAS9 de forma específica e eficiente para ter como alvo o *CCR5*. Foram testados tanto um vector lentiviral, quanto um vetor adenoviral para entrega da CRISPR/CAS9. Em seguida, os autores utilizaram uma cepa com tropismo para o *CCR5* para infectar células TZM.bl, células T Jurkat e células T CD4⁺ primárias. Nas células TZM.bl foi testado primeiramente, o vector adenoviral. Foi verificado uma redução de 10,6% e 21,5% da expressão de *CCR5* após o tratamento com sgRNA- # 6 e # 8 entregue pelo vector adenoviral, respectivamente. Após a infecção dessas células com HIV-1, foi observado que as células com o gene *CCR5* editado, apresentaram níveis menores da infecção. Posteriormente, foi testada a edição das células TZM.bl, utilizando CRISPR/CAS9 entregue por um vector lentiviral. A análise da citometria de fluxo demonstrou que a redução da expressão de *CCR5* mediada por sgRNA- # 6 e # 8 pode chegar a 45,5% e 58,8%, respectivamente. Foi verificado, também, que as células conseguiram alcançar a interrupção altamente eficiente do *CCR5* e, assim, conferir resistência celular contra a infecção por HIV-1. Nas células T Jurkat, as tentativas de interromper o *CCR5* por meio da CRISPR/CAS9 entregue por adenovírus foram malsucedidas. Assim, foi utilizado um vetor lentiviral para entrega. Foi observado a clivagem eficiente do gene *CCR5* em células T Jurkat, levando ao aumento da resistência celular à infecção por HIV-1. Já nas células T CD4⁺, verificou-se menor eficácia da edição do gene *CCR5*. Porém, após infecção das células editadas, ainda assim verificou-se que a edição do *CCR5* poderia inibir a infecção do HIV. Após a aplicação in vitro, os autores transplantaram células CD34⁺ hematopoiéticas humanas contendo a edição do *CCR5* em camundongos diabéticos não obesos e não grávidos. Após infecção por HIV dos camundongos, foi observado

carga viral reduzida e resistência à infecção pelo HIV nos camundongos com células editadas. Ademais, não foi demonstrada nenhuma edição fora de alvo nos locais selecionados para potenciais mutações *off-target*.

Teng et al.⁴³ utilizou o sistema CRISPR/Cas9 na edição do gene *miR-146a* em células A549, MT2, C11 e HEK293. Para testar a eficácia da proteção contra HIV das células editadas, essas células foram infectadas com o HIV-1. O autor transfectou lentiCRISPR *miR-146a* ou plasmídeo de controle em células HEK293T ou infectou células A549 com CRISPR / Cas9-*miR-146a* entregues por lentivírus empacotado ou lentivírus de controle (sem CRISPR/CAS9). A deleção de *miR-146a* levou ao aumento da produção de citocinas em células A549 estimuladas por LPS. Resultados semelhantes foram obtidos em células MT2 e C11. Em células Mt2, a edição do *miR-146a* aumentou a expressão de citocinas e interferons do tipo I, bem como reduziu os níveis de PD-1 e CTLA-4 durante a infecção por HIV-1. Em células C11, foi avaliado os níveis de proteína fluorescente verde/GFP (*green fluorescent protein*), que permite a avaliação e quantificação da infecção pelo HIV-1 por citometria de fluxo. O nocaute do *miR-146a* reduziu a porcentagem de células GFP-positivas para 5,35%, em comparação com as células de controle não editadas (17,6%). Além disso, os resultados encontrados indicaram que a edição de genes foi altamente específica, não sendo encontradas nenhuma mutação fora de alvo.

Ophinni et al.⁴⁴ simulou uma infecção real com linhas de células HeLa e HEK 293T estáveis com expressão dos genes *tat* e *rev* infeccionadas com o HIV-1, utilizando o sistema CRISPR/CAS9 para edição desse genes. Foi observado uma redução significativa da expressão de luciferase induzida pelo promotor de HIV-1 em células 293T-Tat em 61%, 76% e 77% para *tatA*, *tatB* e *tatC* ($P = 0,024$, $P = 0,01$ e $P = 0,012$), respectivamente. Já em células HeLa, os níveis de supressão foram ainda mais fortes: 97%, 97% e 94% ($P = 0,007$, $P = 0,007$ e $P = 0,008$), respectivamente para *tatA*, *tatB* e *tatC*. Ademais, o sistema CRISPR/CAS9 tendo como alvo o gene *rev* conseguiu abolir a expressão da gp120 após transdução. Nenhuma mutação fora de alvo foi detectada e a edição pela CRISPR/CAS9 não teve efeito na viabilidade celular.

Ueda et al.⁴⁵ projetou dois gRNA entregue por plasmídeo, um tendo como alvo os genes *gag* e *pol* do HIV-1 e outro, tendo o LTR como alvo. Para examinar a potência

anti-HIV-1 deste sistema CRISPR / Cas9 durante a infecção, foram transduzidas células MT-4 com dois vetores lentivirais para expressão da CAS9 e um dos gRNAs projetados e foram infectadas com vírus do HIV-1. As células editadas pelos gRNAs que tinham como alvo o gene *gag* ou *pol* apresentaram níveis claramente menores da forma integrada do DNA viral. No entanto, as células editadas com gRNA tendo como alvo o LTR, não apresentaram diferença significativa nos níveis de DNA viral pós infecção. Após isso, os autores utilizaram células Mt-4 duplamente transduzidas com gRNA específico para HIV-1 e vetores lentivirais Cas9 e verificaram que o sistema de vetor lentiviral anti-HIV-1 CRISPR / Cas9 pode suprimir, mas não abolir totalmente, a replicação total do HIV-1. Não foi feita a análise prévia do potencial para mutações fora de alvo.

Liao et al.⁴⁶ aplicou o sistema CRISPR / Cas9 para ter como alvo direto os produtos da transcriptase reversa do RNA lentiviral. O RNA guia foi direcionado para diferentes posições do genoma do HIV-1 em células T humanas primárias e células embrionárias (HEKT293) infectadas. Os gRNAs foram projetados contra a região codificadora da GFP e LTR de um lentivírus. Para a análise se o genoma proviral do HIV pode ser interrompido ou erradicado do hospedeiro pelo sistema CRISPR/CAS9, foram utilizadas linhas de células HEK293 infectadas com diferentes números de provírus integrados. Após a aplicação da CRISPR/CAS9, os níveis de GFP nas células editadas foram de 48 a 92% menores do que no grupo controle e esses níveis reduziram progressivamente até chegar no mesmo nível das células não infectadas. Já em células T latentes contendo o genoma integrado do HIV, foi verificado que a carga viral latente nessas células foi significativamente reduzida. Enquanto isso, não foi detectado efeito fora do alvo nas células editadas ao examinar os cinco principais locais possíveis para mutações *off-target*.

Liu et al.⁴⁷ projetou duas combinações diferentes de gRNA (lenti-X4R5-Cas9- # 1 e lenti-X4R5-Cas9- # 2) tendo como alvo ambos o *CXCR4* e o *CCR5*, em um único vetor. Os autores testaram a abordagem usando a cepa HIV-1NL4-3 (X4-trópico) e a cepa HIV-1YU-2 (R5-trópico) para infectar células TZM.bl, células T Jurkat e células T CD4 + primárias. Nas células TZM.bl, a edição simultânea de *CXCR4* e *CCR5* por lenti-X4R5-Cas9- # 1 e lenti-X4R5-Cas9- # 2 teve eficácia de 23,8% e 23,6%, respectivamente, em comparação com o grupo de células não editadas, sendo que

72 horas após a infecção as células editadas demonstraram resistência contra as cepas de HIV com tropismo para X4 ou para R5. Nas células Jurkat, a análise da eficácia da edição foi feita utilizando o CXCR4 apenas, devido à baixa expressão do CCR5 na superfície dessas células. Os resultados da citometria de fluxo e Western Blot indicaram diminuição da expressão do CXCR4 na superfície celular ou os níveis totais de *CXCR4* e *CCR5* e as células Jurkat editadas se mostraram resistentes a infecção por HIV 1NL4-3 com tropismo para CXCR4 ou infecção por HIV-1YU-2 com tropismo para CCR5. Nas células T CD4⁺ primárias, também foi verificada a edição dos genes *CXCR4* e *CCR5*, bem como a proteção contra infecção por cepas com tropismo para X4 ou R5 cerca de 7 dias após a infecção. A análise de potencial para mutações *off-target* foi realizada, e nenhuma mutação fora de alvo evidente foi detectada em nenhum dos locais previstos das células T CD4⁺ primárias, o que confirmou a especificidade dos sgRNAs projetados.

Xu et al.¹⁶ usou pares de sgRNA nucleofectados com CAS9 para ter como alvo o gene *CCR5* em células tronco hematopoiéticas e progenitoras/HSPCs (*hematopoietic stem and progenitor cells*). A partir disso, células CD34⁺ hematopoiéticas humanas contendo a deleção do *CCR5* foram transplantadas em camundongos diabéticos não obesos e não grávidos e o DNA de células sanguíneas periféricas e de células T CD4⁺ humanas foi analisado. Nas células sanguíneas periféricas, a eficiência média de edição do *CCR5* foi de 24,7% ($\pm 3,8\%$, n = 9), enquanto que nas células T CD4⁺, essa eficiência foi de 27,3% ($\pm 6,7\%$, n = 3). Após serem infectados com cepas R5 de HIV-1, foi observado diminuição significativa nos níveis de RNA viral nos camundongos transplantados com células editadas 8 semanas após infecção, enquanto que no grupo controle os níveis de RNA viral aumentaram e a reconstituição das células T CD4⁺ foi cerca de três vezes menor do que no grupo com células editadas. Assim, os autores conseguiram estabelecer um sistema de edição genômica em HSPCs com alta eficácia de clivagem e baixo efeito fora do alvo.

Wang et al.⁴⁸ selecionou dois SaCas9 / sgRNAs com alta especificidade para CXCR4 após a triagem de 12 sgRNAs em linhas de células HEK293T usando vetores lentivirais. Em seguida, foi testada a eficácia de edição dos dois sgRNAs selecionados (sgRNA # 8 e # 9) para interromper a expressão do CXCR4 em células GHOST-X4. As células GHOST-X4 editadas pelo SaCas9 / sgRNA # 8 e # 9 tornaram-se 64,7% e

87,0% negativas para a expressão de superfície *CXCR4*, respectivamente. Em seguida, testou-se o efeito da interrupção do gene *CXCR4* na infecção por HIV-1NL4-3 com tropismo para X4 e foi verificado que as células GHOST-X4 editadas se tornaram negativas para a expressão de GFP, bem como, os níveis de p24 liberado das células transduzidas diminuíram significativamente em comparação com as células não editadas. Resultados semelhantes foram encontrados nas células T.ZM.bl e Jurkat. Em ambas as linhagens a expressão de *CXCR4* foi interrompida por SaCas9 /sgRNA # 8 e # 9 e, especificamente nas células t jurkat, os níveis de p24 foram significativamente diminuídos nas células editadas. Já nas células T CD4⁺, não foi possível usar o vector lentiviral para entrega dos componentes CRISPR/CAS9. Assim, foi utilizado um vector adenoviral, percebendo um nível de p24 menor nas células editadas. Ademais, não foram identificadas mutações fora de alvo, indicando que CRISPR/CAS9 apresentou alta especificidade de edição gênica.

Hou et al.⁴⁹ projetou um lentivírus que expressa Cas9 e 10 gRNAs diferentes tendo como alvo o gene *CXCR4*, sendo escolhidos os dois gRNAs de maior eficiência (gRNA # 6 e gRNA # 7) após testagem. Os autores testaram a abordagem infectando células derivadas de osteossarcoma (Ghost X4), células T Jurkat e células T CD4 + humanas primárias com HIV-1NL4-3, um vírus HIV-1 com tropismo para *CXCR4*. Nas células Ghost X4, para testar se a interrupção do gene *CXCR4* mediada por CRISPR / Cas9 poderia inibir a infecção por HIV-1, foi usado células Ghost X4 contendo GFP e Foi observado a perda completa da expressão de GFP nas células *CXCR4* editadas em comparação com as células não editadas do grupo controle, sugerindo uma infecção limitada por HIV-1 nas células com *CXCR4* modificado. Nas células Jurkat T, foi observada alta eficiência no alvo para gRNA # 6 e # 7 com 45,03% e 44,31% de deleção do gene *CXCR4*, respectivamente. Para analisar se houve proteção contra a cepa X4 do HIV-1, realizou-se ensaios de ELISA com pesquisa do antígeno p24 após a infecção. O nível de p24 de HIV 1NL4-3 verificado foi muito mais baixo nas células editadas em comparação com o controle. Já nas células T CD4⁺ primárias foi observado que ambos os gRNA # 6 e # 7 induziram mutações do tipo indel no gene *CXCR4* em células T primárias, porém estas foram menos eficientes do que nas células Jurkat. Os ensaios de ELISA mostraram que o nível de p24 diminuiu em mais de 64% nas células editadas. Assim, a interrupção da expressão de *CXCR4* em

células T CD4 + humanas por CRISPR / Cas9 conferiu apenas proteção parcial à infecção por HIV-1. Por fim, as células T CD4 + editadas tiveram funções imunológicas, aparentemente preservadas e não foram identificadas mutações fora de alvo significativas (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados e sumário dos estudos pre-clínicos selecionados

Nome do autor	Alvo da CRISPR/CAS9	Mecanismo de entrega da CRISPR/CAS9	Amostra celular	Mudanças observadas com o tratamento
Limsirichai et al. ⁴¹	HIV-1-LTR	Lentivírus	HEKT293T, células Jurkat,	Ativação do gene viral em modelos de células latentes de HIV-1
Xiao et al. ⁴²	<i>CCR5</i>	Lentivírus e Adenovírus	Células HeLa, Células Jurkat, células tronco hematopoiéticas CD34+ e T CD4+	Redução da Expressão do <i>CCR5</i>
Teng et al. ⁴³	<i>miR-146a</i>	Lentivírus	HEKT293, células A549, MT2 e C11	Aumento de citocinas
Ophinni et al. ⁴⁴	Genes regulatórios <i>tat</i> e <i>rev</i>	Lentivírus	HEKT293, Células HeLa	Redução da luciferase induzida pelo promotor de HIV-1 e expressão de gp120
Ueda et al. ⁴⁵	<i>Gag, pol</i> e HIV-1-LTR	Lentivírus	HEKT293T e células CD4+HTLV+ MT-4	Redução da forma integrada do DNA viral na fase inicial a infecção
Liao et al. ⁴⁶	Produtos da transcriptase reversa viral	Lentivírus	HEKT293T e HEKT293A, Células T primárias.	Redução do marcador genético GFP
Liu et al. ⁴⁷	<i>CCR5</i> E <i>CXCR4</i>	Lentivírus	Células TzM-bl, Jurkat e TCD4+	Redução da produção de P24, menor expressão de <i>CXCR4</i> e/ou <i>CCR5</i>
Xu et al. ¹⁶	<i>CCR5</i>	Plasmídeo	Células hematopoiéticas T CD4+	Redução da titulação viral e enriquecimento de células T CD4+
Wang et al. ⁴⁸	<i>CXCR4</i>	Lentivírus e Adenovírus	Células HEKT293T, GHOST-x4, Jurkat e TzM-bl	Redução dos níveis de p24 e da expressão do marcador gênico GFP
Hou et al. ⁴⁹	<i>CXCR4</i>	Lentivírus	Células Jurkat, T CD4+ e Ghost-CXCR4	Redução da expressão <i>CXCR4</i>

6. DISCUSSÃO

Essa revisão buscou avaliar a eficácia da CRISPR/CAS9 como um tratamento do HIV/AIDS. Para isto, foram selecionados 2.433 artigos de periódicos e escolhidos 10 artigos que continham informações qualitativas sobre a aplicação *in vivo* e *in vitro* da ferramenta gênica. Todos os estudos, reconheceram a capacidade da CRISPR/CAS9 em reduzir, pelo menos em algum grau, o nível de infecção viral. Dos estudos analisados, 90% demonstraram melhora significativa no desfecho após a edição gênica com a CRISPR/CAS9. O estudo de Ueda et al.⁴⁵ foi o único que apresentou a técnica como insuficiente para inibir completamente a replicação viral em células T, ainda assim, os autores reconhecem e indicam a possibilidade do uso da CRISPR/CAS9 no tratamento do HIV-1, se usada em conjunto com a TARV.

Ao todo, os estudos inclusos nessa revisão demonstraram quatro modos de regulação da expressão gênica do HIV-1. Metade dos estudos utilizaram a CRISPR/CAS9 para introduzir mutações de perda de função nos correceptores CCR5 e/ou CXCR4 em diversos tipos celulares e observaram a edição eficiente dos genes alvos, tornando as linhagens de células modificadas mais resistentes à infecção. Resultado semelhante foi descrito por Cho et al.³⁷ e Ye et al.⁵⁰, que conseguiram editar com sucesso o gene *CCR5*, sugerindo que a imunização celular é uma possibilidade real. Já, Ophinni et al.⁴⁴, Ueda et al.⁴⁵ e Teng et al.⁴³, focaram em inibir a replicação viral direcionando gRNAs para pontos distintos do genoma viral, incluindo LTR, *gag*, *pol*, *tat*, *rev* e *miR-146a*. Enquanto, Liao et al.⁴⁶ utilizaram a CRISPR/CAS9 para inibir a transcrição reversa.

Até o momento desta pesquisa, a presença do HIV latente é o maior empecilho para erradicação completa da doença. Nessa perspectiva, Limsirichai et al.⁴¹ focaram na ruptura do genoma proviral de reservatórios latentes com alvo na região LTR, conseguindo reativar a expressão viral em células com HIV latente. Esses resultados corroboram com os achados de Ebina et al.¹⁴ e Hu et al.⁵¹, que suprimiram a expressão dos genes virais de HIV ao ter como alvo o LTR e eliminou genes virais integrados do cromossomo da célula infectada. Assim, esses resultados sugerem que a CRISPR/CAS9 é uma ferramenta promissora para tratar a infecção latente.

Sobre a entrega da CRISPR/CAS9 os vetores virais foram utilizados em 90% dos estudos analisado, o que é reconhecido por Lino et al.⁵², que em sua revisão sobre os desafios e técnicas para entregar a CRISPR/CAS9, propõe que os vetores virais são os vetores de entrega mais utilizados e favoráveis, especialmente em trabalhos in vivo. Em concordância, Luther et al.⁵³, sugerem que essa preponderância se deve à capacidade inerente dos vetores virais de introduzir material genético exógeno na célula. Dentre os vetores virais, o vetor lentiviral foi o mais utilizado nos estudos avaliados, sendo uma possível explicação para isso a alta imunogenicidade do vetor adenoviral e a capacidade do vetor lentiviral integrar ao genoma viral e ter uma expressão mais estável.⁵⁴

Em relação ao potencial de mutações *off-target*, a maioria (80%) dos artigos avaliados fizeram avaliação de possíveis mutações *off-target*, não sendo detectadas edições *off-target* nos locais potenciais para essas mutações. Em consonância com esse achado, estudos feitos por Hu et al.⁵¹, Duan et al.⁵⁵ e Sanches da Silva et al.¹³, relataram que a atividade fora do alvo da clivagem pela CRISPR/Cas9 no genoma é muito limitada. Contudo, é importante salientar que os métodos atuais para identificar mutações *off-target*, servem como uma triagem preliminar e podem não detectar completamente as sequências fora de alvo, necessitando assim, de uma investigação mais minuciosa do assunto.^{9,56}

Devido à falta de estudos em modelos animais e ensaios clínicos, todos os artigos analisados nessa revisão sistemática foram estudo in vivo ou in vitro, sendo a maioria in vitro. Diante disso, não se pode obter informações definitivas sobre a segurança do tratamento em humanos ou sobre os efeitos da terapia a longo prazo. Assim, faz-se necessário empreender esforços em pesquisas com modelos animais otimizados e ensaios clínicos de fase 1. Ademais, estudos futuros devem levar em conta a perspectiva da CRISPR/CAS9 como uma terapia combinada, e não de maneira isolada. Podendo ser útil, por exemplo, utilizar os vetores da ferramenta em conjunto com a TARV, administrando os vetores CRISPR/Cas9 durante a TARV continuada. Assim, com o acúmulo de dados e pesquisas e o avanço constante da tecnologia, a CRISPR/CAS9 pode trazer progresso inovador no campo do tratamento do HIV/AIDS.

7. CONCLUSÃO

Torna-se cada vez mais claro que para uma solução mais permanente para o HIV/AIDS, será necessário mais do que a abordagem tradicional feita pela TARV, sendo crescente o desenvolvimento de terapia alternativas, com o sistema CRISPR/CAS9 sendo uma das mais promissoras. Os resultados obtidos na presente pesquisa, sugerem que a CRISPR/CAS9 constitui uma grande promessa para o tratamento do HIV/AIDS no futuro, já que é uma ferramenta eficaz para edição gênica *in vivo* e *in vitro*, conseguindo editar os alvos do HIV com sucesso e diminuir o nível de infecção viral. Contudo, são necessários estudos subsequentes, principalmente em modelos animais clinicamente relevantes e ensaios clínicos, para determinar a eficácia a longo prazo da técnica, bem como sua ação em humanos.

REFERÊNCIAS:

1. Brasil. Ministério da Saúde. Aids: etiologia, clínica, diagnóstico e tratamento. Brasília, 1999; 17. Ministério da Saúde.
2. UNAIDS - Joint United Nations Program on HIV/AIDS. Additional guidance for Latin American and Caribbean countries-GAM 2021.
3. UNAIDS - Joint United Nations Program on HIV/AIDS. WITH THE RIGHT INVESTMENT , AIDS CAN BE OVER A US \$ 29 BILLION INVESTMENT TO END AIDS BY THE END OF. 2019;1–16.
4. World Health Organization. HIV/AIDS [Internet]. 19/07. 2018 [cited 2020 Dec 7]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
5. UNAIDS - Joint United Nations Program on HIV/AIDS. Global HIV & AIDS statistics — 2020 fact sheet | UNAIDS [Internet]. [cited 2021 Mar 31]. Available from: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
6. Boletim Epidemiológico HIV / Aids | 2019. 2019;72.
7. Xiao Q, Guo D, Chen S. Application of CRISPR/Cas9-based gene editing in HIV-1/AIDS therapy. Vol. 9, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019.
8. Herrera-Carrillo E, Gao Z, Berkhout B. CRISPR therapy towards an HIV cure. *Brief Funct Genomics*. 2020;19(3):201–8.
9. Saayman S, Ali SA, Morris K V., Weinberg MS. The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(6):819–30.
10. Das AT, Binda CS, Berkhout B. Elimination of infectious HIV DNA by CRISPR–Cas9. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2019;38:81–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.07.001>
11. NCI staff. How CRISPR Is Changing Cancer Research and Treatment - National Cancer Institute [Internet]. 2020. Available from: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2020/crispr-cancer-research-treatment>
12. June CH. Emerging Use of CRISPR Technology — Chasing the Elusive HIV Cure. *N Engl J Med*. 2019;381(13):1281–3.
13. Sanches-Da-Silva GDN, Medeiros LFS, Lima FM. The Potential Use of the CRISPR-Cas System for HIV-1 Gene Therapy. *Int J Genomics*. 2019;2019.
14. Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. [cited 2021 Mar 1]; Available from: www.nature.com/scientificreports
15. Dash PK, Kaminski R, Bella R, Su H, Mathews S, Ahooyi TM, et al. Sequential LASER ART and CRISPR Treatments Eliminate HIV-1 in a Subset of Infected Humanized Mice. *Nat Commun* [Internet]. 2019;10(1):1–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10366-y>
16. Xu L, Yang H, Gao Y, Chen Z, Xie L, Liu Y, et al. CRISPR/Cas9-Mediated CCR5

Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. *Mol Ther* [Internet]. 2017 Aug 2 [cited 2021 Mar 1];25(8):1782–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.04.027>.

17. Hou P, Chen S, Wang S, Yu X, Chen Y, Jiang M, et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Oct 20 [cited 2021 Mar 1];5. Available from: [/pmc/articles/PMC4612538/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2612538/)
18. World Health Organization. HIV/AIDS [Internet]. [cited 2021 Feb 27]. Available from: https://www.who.int/health-topics/hiv-aids#tab=tab_1
19. Bedard M, Makvandi-Nejad S. Human Immunodeficiency Virus (HIV) Category: Pathogens and Disease.
20. Ministério da Saúde. HIV e aids [Internet]. [cited 2021 Feb 27]. Available from: <http://bvsmms.saude.gov.br/dicas-em-saude/2409-hiv-e-aids>
21. Da Saúde M. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA MANEJO DA INFECÇÃO PELO HIV EM ADULTOS.
22. Phanuphak N, Gulick RM. HIV treatment and prevention 2019: Current standards of care. *Curr Opin HIV AIDS*. 2020;15(1):4–12.
23. Luz PM, Veloso VG, Grinsztejn B. The HIV epidemic in Latin America: Accomplishments and challenges on treatment and prevention. *Curr Opin HIV AIDS*. 2019;14(5):366–73.
24. Ministério da Saúde. Diretrizes para o fortalecimento das ações de adesão ao tratamento para pessoas que vivem com HIV e AIDS. Ministério da Saúde. 2007;32.
25. Costa JDM, Torres TS, Coelho LE, Luz PM. Adherence to antiretroviral therapy for HIV/AIDS in Latin America and the Caribbean: Systematic review and meta-analysis: Systematic. *J Int AIDS Soc*. 2018;21(1).
26. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet* [Internet]. 2014;384(9939):258–71. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60164-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60164-1)
27. Hadwick KAC, Ierson THP, Mith KES, Isziewicz JUL, Osenberg ERICR, Alker BRW, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* [Internet]. 1999;5(5):512–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/8394> http://www.nature.com/nm/journal/v5/n5/pdf/nm0599_512.pdf
28. Archin NM, Sung JM, Garrido C, Soriano-Sarabia N, Margolis DM. Eradicating HIV-1 infection: Seeking to clear a persistent pathogen [Internet]. Vol. 12, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2014 [cited 2021 Feb 28]. p. 750–64. Available from: [/pmc/articles/PMC4383747/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24383747/)
29. Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4+ T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(15):8869–73.

30. Carr A. Toxicity of antiretroviral therapy and implications for drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(8):624–34.
31. Dybul M, Attoye T, Baptiste S, Cherutich P, Dabis F, Deeks SG, et al. The case for an HIV cure and how to get there. *Lancet HIV*. 2021;8(1):e51–8.
32. Mojica FJM, Rodriguez-Valera F. The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *FEBS J* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2021 Feb 28];283(17):3162–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.13766>
33. Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* (80-) [Internet]. 2014 [cited 2021 Feb 28];343(6176):1247997. Available from: </pmc/articles/PMC4184034/>
34. Palermo G, Miao Y, Walker RC, Jinek M, McCammon JA. Striking plasticity of CRISPR-Cas9 and key role of non-target DNA, as revealed by molecular simulations. *ACS Cent Sci* [Internet]. 2016 Oct 26 [cited 2021 Feb 28];2(10):756–63. Available from: </pmc/articles/PMC5084073/>
35. Clarke R, Terry AR, Pennington H, Hasty C, MacDougall MS, Regan M, et al. Sequential Activation of Guide RNAs to Enable Successive CRISPR-Cas9 Activities. *Mol Cell*. 2021 Jan 21;81(2):226-238.e5.
36. Wang G, Zhao N, Berkhout B, Das AT. CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. *Virus Res* [Internet]. 2018;244:321–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.020>
37. Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*. 2013;31(3):230–2.
38. Belman AL, Maletic-Savatic M. Human Immunodeficiency Virus and Acquired Immunodeficiency Syndrome. In: *Textbook of Clinical Neurology: Third Edition*. Elsevier Inc.; 2007. p. 981–1018.
39. National Institute on Drug Abuse. Antiretroviral Therapy Combined With CRISPR Gene Editing Can Eliminate HIV Infection in Mice | National Institute on Drug Abuse (NIDA) [Internet]. [cited 2021 May 4]. Available from: <https://www.drugabuse.gov/news-events/nida-notes/2020/02/antiretroviral-therapy-combined-crispr-gene-editing-can-eliminate-hiv-infection-in-mice>
40. Deng Q, Chen Z, Shi L, Lin H. Developmental progress of CRISPR/Cas9 and its therapeutic applications for HIV-1 infection. *Rev Med Virol*. 2018;28(5):1–7.
41. Limsirichai P, Gaj T, Schaffer D V. CRISPR-mediated activation of latent HIV-1 expression. *Mol Ther* [Internet]. 2016;24(3):499–507. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2015.213>
42. Xiao Q, Chen S, Wang Q, Liu Z, Liu S, Deng H, et al. CCR5 editing by *Staphylococcus aureus* Cas9 in human primary CD4+ T cells and hematopoietic stem/progenitor cells promotes HIV-1 resistance and CD4+ T cell enrichment in humanized mice. *Vol. 16, Retrovirology*. 2019.
43. Teng Y, Luo M, Yu T, Chen L, Huang Q, Chen S, et al. CRISPR/Cas9-mediated

- deletion of miR-146a enhances antiviral response in HIV-1 infected cells. *Genes Immun* [Internet]. 2018;20(4):327–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41435-018-0036-x>
44. Ophinni Y, Inoue M, Kotaki T, Kameoka M. CRISPR/Cas9 system targeting regulatory genes of HIV-1 inhibits viral replication in infected T-cell cultures. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-26190-1>
 45. Ueda S, Ebina H, Kanemura Y, Misawa N, Koyanagi Y. Anti-HIV-1 potency of the CRISPR/Cas9 system insufficient to fully inhibit viral replication. *Microbiol Immunol*. 2016;60(7):483–96.
 46. Liao HK, Gu Y, Diaz A, Marlett J, Takahashi Y, Li M, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat Commun*. 2015;6:1–10.
 47. Liu Z, Chen S, Jin X, Wang Q, Yang K, Li C, et al. Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Cell Biosci*. 2017;7(1):1–15.
 48. Wang Q, Chen S, Xiao Q, Liu Z, Liu S, Hou P, et al. Genome modification of CXCR4 by *Staphylococcus aureus* Cas9 renders cells resistance to HIV-1 infection. *Retrovirology*. 2017;14(1):1–12.
 49. Hou P, Chen S, Wang S, Yu X, Chen Y, Jiang M, et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Sci Rep*. 2015;5:1–12.
 50. Ye L, Wang J, Beyer AI, Teque F, Cradick TJ, Qi Z, et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2022 Apr 9];111(26):9591–6. Available from: </pmc/articles/PMC4084478/>
 51. Hu W, Kaminski R, Yang F, Zhang Y, Cosentino L, Li F, et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Aug 5 [cited 2022 Mar 20];111(31):11461–6. Available from: </pmc/articles/PMC4128125/>
 52. Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv* [Internet]. 2018 [cited 2022 Mar 31];25(1):1234. Available from: </pmc/articles/PMC6058482/>
 53. Luther DC, Lee YW, Nagaraj H, Scaletti F, Rotello VM. Delivery Approaches for CRISPR/Cas9 Therapeutics In Vivo: Advances and Challenges. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2018 Sep 2 [cited 2022 Apr 1];15(9):905. Available from: </pmc/articles/PMC6295289/>
 54. Khalili K, White MK, Jacobson JM. Novel AIDS therapies based on gene editing. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2022 Mar 31];74(13):2439. Available from: </pmc/articles/PMC5474186/>
 55. Duan J, Lu G, Xie Z, Lou M, Luo J, Guo L, et al. Genome-wide identification of

- CRISPR/Cas9 off-targets in human genome. *Cell Res* 2014 248 [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2022 Apr 1];24(8):1009–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/cr201487>
56. Zhang Y, Yin C, Zhang T, Li F, Yang W, Kaminski R, et al. CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. *Sci Rep*. 2015;5(October):1–14.

ANEXO A

PRISMA 2020 checklist

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
TITLE			
Title	1	Identify the report as a systematic review.	
ABSTRACT			
Abstract	2	See the PRISMA 2020 for Abstracts checklist.	
INTRODUCTION			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of existing knowledge.	
Objectives	4	Provide an explicit statement of the objective(s) or question(s) the review addresses.	
METHODS			
Eligibility criteria	5	Specify the inclusion and exclusion criteria for the review and how studies were grouped for the syntheses.	
Information sources	6	Specify all databases, registers, websites, organisations, reference lists and other sources searched or consulted to identify studies. Specify the date when each source was last searched or consulted.	
Search strategy	7	Present the full search strategies for all databases, registers and websites, including any filters and limits used.	
Selection process	8	Specify the methods used to decide whether a study met the inclusion criteria of the review, including how many reviewers screened each record and each report retrieved, whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Data collection process	9	Specify the methods used to collect data from reports, including how many reviewers collected data from each report, whether they worked independently, any processes for obtaining or confirming data from study investigators, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Data items	10a	List and define all outcomes for which data were sought. Specify whether all results that were compatible with each outcome domain in each study were sought (e.g. for all measures, time points, analyses), and if not, the methods used to decide which results to collect.	
	10b	List and define all other variables for which data were sought (e.g. participant and intervention characteristics, funding sources). Describe any assumptions made about any missing or unclear information.	
Study risk of bias assessment	11	Specify the methods used to assess risk of bias in the included studies, including details of the tool(s) used, how many reviewers assessed each study and whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Effect measures	12	Specify for each outcome the effect measure(s) (e.g. risk ratio, mean difference) used in the synthesis or presentation of results.	
Synthesis methods	13a	Describe the processes used to decide which studies were eligible for each synthesis (e.g. tabulating the study intervention characteristics and comparing against the planned groups for each synthesis (item #5)).	
	13b	Describe any methods required to prepare the data for presentation or synthesis, such as handling of missing summary statistics, or data conversions.	
	13c	Describe any methods used to tabulate or visually display results of individual studies and syntheses.	
	13d	Describe any methods used to synthesize results and provide a rationale for the choice(s). If meta-analysis was performed, describe the model(s), method(s) to identify the presence and extent of statistical heterogeneity, and software package(s) used.	
	13e	Describe any methods used to explore possible causes of heterogeneity among study results (e.g. subgroup analysis, meta-regression).	

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
	13f	Describe any sensitivity analyses conducted to assess robustness of the synthesized results.	
Reporting bias assessment	14	Describe any methods used to assess risk of bias due to missing results in a synthesis (arising from reporting biases).	
Certainty assessment	15	Describe any methods used to assess certainty (or confidence) in the body of evidence for an outcome.	
RESULTS			
Study selection	16a	Describe the results of the search and selection process, from the number of records identified in the search to the number of studies included in the review, ideally using a flow diagram.	
	16b	Cite studies that might appear to meet the inclusion criteria, but which were excluded, and explain why they were excluded.	
Study characteristics	17	Cite each included study and present its characteristics.	
Risk of bias in studies	18	Present assessments of risk of bias for each included study.	
Results of individual studies	19	For all outcomes, present, for each study: (a) summary statistics for each group (where appropriate) and (b) an effect estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval), ideally using structured tables or plots.	
Results of syntheses	20a	For each synthesis, briefly summarise the characteristics and risk of bias among contributing studies.	
	20b	Present results of all statistical syntheses conducted. If meta-analysis was done, present for each the summary estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval) and measures of statistical heterogeneity. If comparing groups, describe the direction of the effect.	
	20c	Present results of all investigations of possible causes of heterogeneity among study results.	
	20d	Present results of all sensitivity analyses conducted to assess the robustness of the synthesized results.	
Reporting biases	21	Present assessments of risk of bias due to missing results (arising from reporting biases) for each synthesis assessed.	
Certainty of evidence	22	Present assessments of certainty (or confidence) in the body of evidence for each outcome assessed.	
DISCUSSION			
Discussion	23a	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence.	
	23b	Discuss any limitations of the evidence included in the review.	
	23c	Discuss any limitations of the review processes used.	
	23d	Discuss implications of the results for practice, policy, and future research.	
OTHER INFORMATION			
Registration and protocol	24a	Provide registration information for the review, including register name and registration number, or state that the review was not registered.	
	24b	Indicate where the review protocol can be accessed, or state that a protocol was not prepared.	
	24c	Describe and explain any amendments to information provided at registration or in the protocol.	
Support	25	Describe sources of financial or non-financial support for the review, and the role of the funders or sponsors in the review.	
Competing interests	26	Declare any competing interests of review authors.	
Availability of data, code and other materials	27	Report which of the following are publicly available and where they can be found: template data collection forms; data extracted from included studies; data used for all analyses; analytic code; any other materials used in the review.	

ANEXO B

ARRIVE GUIDELINES

The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Item	Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Study design	1 For each experiment, provide brief details of study design including: <ol style="list-style-type: none"> The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals). 	
Sample size	2 <ol style="list-style-type: none"> Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used. Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done. 	
Inclusion and exclusion criteria	3 <ol style="list-style-type: none"> Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established <i>a priori</i>. If no criteria were set, state this explicitly. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group. 	
Randomisation	4 <ol style="list-style-type: none"> State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly. 	
Blinding	5 Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).	
Outcome measures	6 <ol style="list-style-type: none"> Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes). For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size. 	
Statistical methods	7 <ol style="list-style-type: none"> Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met. 	
Experimental animals	8 <ol style="list-style-type: none"> Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures. 	
Experimental procedures	9 For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including: <ol style="list-style-type: none"> What was done, how it was done and what was used. 	

		<ul style="list-style-type: none"> b. When and how often. c. Where (including detail of any acclimatisation periods). d. Why (provide rationale for procedures). 	
Results	10	<p>For each experiment conducted, including independent replications, report:</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range). b. If applicable, the effect size with a confidence interval. 	

