



A UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR NO TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS HIV-1

THE USE OF MOLECULAR BIOLOGY IN THE TREATMENT OF HIV-1 VIRUS INFECTION

Jessica Marszalek Bauer¹, Paulo Roberto Worfel²

Resumo

O HIV é um vírus de RNA pertencente à subfamília dos lentivírus dos retrovírus. Ele é o causador da doença AIDS (Síndrome da imunodeficiência adquirida). Atualmente já foi desenvolvido tratamentos para diminuir os sintomas da doença, porém ela possui efeitos colaterais como a cefaleia e não desenvolve a cura da infecção. A técnica de RNA de interferência (RNAi) propõem ser um grande potencial para o tratamento de HIV-1, trazendo o silenciamento eficiente e seletivo geneticamente do correceptor CCR5, impedindo a entrada do vírus nas células. A tecnologia de CRISPR-CAS9 atualmente demonstra a capacidade de cura e tratamento para doenças como o HIV. Por meio da alteração direta no DNA a tecnologia combate o vírus manipulando a proteína CCR5, impedindo a entrada do vírus dentro das células. Devido a importância desse tema o presente trabalho tem como objetivo relatar sobre o desenvolvimento atual das tecnologias de RNAi e CRISPR-CAS9 no tratamento de HIV-1. Para isso foi realizada uma revisão bibliográfica nos bancos de dados PubMed, Google Acadêmico, Scielo e Ministério da Saúde. Esse estudo irá colaborar sobre a visualização do tratamento de HIV-1 pela biologia molecular que possui grande potencial terapêutico e de cura, visando a procura de metodologias que evitem os efeitos colaterais dos medicamentos atuais e que tenham potencial de cura ao indivíduo infectado. Em estudos realizados é demonstrado que o RNAi e o CRISPR-CAS9 possuem alta competência para suprir a necessidade de inibir o correceptor CCR5 in vitro e in vivo, porém a aplicabilidade ainda é limitada devido a fatores como citotoxicidade para o RNAi e para CRISPR a clivagem de locais fora do alvo. As metodologias dispõem da capacidade de substituir a medicação atual fornecida no mercado contra HIV-1, mas há consequência e possíveis efeitos adversos que devem ser considerados antes de ser realizado testes em humanos.

Palavras-chave: RNAi. Vírus da imunodeficiência-1. CCR5. CRISPR-CAS9.

Abstract

HIV is an RNA virus belonging to the lentivirus subfamily of retroviruses. It causes the disease AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). Currently, treatments have been developed to reduce the symptoms of the disease, but they have side effects such as headaches and do not cure the infection. The RNA interference (RNAi) technique offers great potential for the treatment of HIV-1, providing efficient and genetically selective silencing of the CCR5 receptor, preventing the virus from entering cells. CRISPR-CAS9 technology currently demonstrates the ability to cure and treat diseases such as HIV. By directly altering DNA, the technology combats the virus by manipulating the CCR5 protein, preventing the virus from entering cells. HIV is an RNA virus belonging to the lentivirus subfamily of retroviruses. It causes the disease AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). Currently, treatments have been developed to reduce the symptoms of the disease, but they have side effects such as headaches and do not cure the infection. The RNA interference (RNAi) technique offers great potential for the treatment of HIV-1, providing efficient and genetically selective silencing of the

1 Acadêmica do curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR); Endereço para correspondência: marsz.bauer.jess@gmail.com

2 Docente do curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR). Endereço para correspondência: paulo.worfel@utp.br



CCR5 receptor, preventing the virus from entering cells. CRISPR-CAS9 technology currently demonstrates the ability to cure and treat diseases such as HIV. By directly altering DNA, the technology combats the virus by manipulating the CCR5 protein, preventing the virus from entering cells. Studies have shown that RNAi and CRISPR-CAS9 are highly competent in meeting the need to inhibit the CCR5 coreceptor in vitro and in vivo, but their applicability is still limited due to factors such as cytotoxicity for RNAi and cleavage of off-target sites for CRISPR. The methodologies have the capacity to replace the current medication provided on the market against HIV-1, but there are consequences and possible adverse effects that must be considered before testing on humans.

Keywords: RNAi. Immunodeficiency virus-1. CCR5. CRISPR.

1 Introdução

O vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1) é o causador da doença AIDS, onde o sistema imunológico é enfraquecido devido ao ataque do vírus em células T CD4⁺, que compõem um papel fundamental na proteção do corpo. Em 2021 foram contatados 38,4 milhões de pessoas convivendo com HIV no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Para o controle da infecção foi criado o HAART (terapia antirretroviral ativa), constituído por uma gama de medicações. A utilização dos medicamentos fornecidos no mercado atualmente proporciona ao paciente inicialmente efeitos colaterais como cefaleia, náuseas, vômitos, mal-estar, síndrome de reconstituição imunológica, anorexia e insônia levando a muitos indivíduos optarem por não iniciar o tratamento (CRESPO et al., 2015).

Com os avanços da tecnologia ao longo dos anos surgiram diversas técnicas moleculares com grande potencial de aplicação no combate de uma numerosa gama de doenças que atualmente são grandes desafios a medicina. Pode-se citar duas metodologias que se destacam no mercado com capacidade de futuramente darem aporte no tratamento contra a infecção de HIV-1 ou promover a cura contra tal contaminação, sendo elas o RNA de interferência (RNAi) e Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR).

Esta pesquisa tem como finalidade realizar uma sondagem acerca das bibliografias específicas sobre HIV-1, RNAi e CRISPR esclarecendo a performance das tecnologias e aplicação para o combate do HIV-1. O artigo também apresentará a finalidade de avaliar o atual ponto de desenvolvimento dos artifícios como terapia para a doença alvo.

2 Metodologia

O artigo foi baseado em uma revisão bibliográfica aplicando dados retirados das bases de dados PubMed, Google Acadêmico, LILACs, Scielo e Organização mundial da saúde, Ministério da Saúde. Foram consultados artigos originais, de revisão, teses de pós-graduação através dos seguintes descritores: RNAi, CCR5, tratamento, vírus da imunodeficiência humana 1, CRISPR. A realização é do período de fevereiro a novembro de 2023 contando com artigos publicados nos últimos 10 anos.



Discussão

3.1 Vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1)

A história do HIV se inicia na década de 80 quando indivíduos manifestaram sintomas de uma nova patologia que foi denominada AIDS (síndrome da imunodeficiência humana adquirida), contendo casos nos Estados Unidos, Haiti e na África Central, sendo o causador da doença desconhecido (BRUNS, FERNANDES, 2020).

O causador da patologia é um vírus de RNA pertencente a subfamília dos lentivírus dos retrovírus. Sua transmissão decorre durante relações sexuais desprotegidas (sem preservativo) com indivíduos contaminados, sendo classificado como IST (doença sexualmente transmissível), também pode ocorrer a transmissão quando objetos perfuro cortantes contaminados entram em contato com a pele (agulhas ou alicates) ou uma mãe soropositiva que pode contaminar o bebê (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

O vírus possui como principal alvo células com receptores CD4, atingindo principalmente o sistema imune do indivíduo, atacando sobretudo os linfócitos e macrófagos. Essa preferência leva a uma imunodeficiência do organismo infectado e quanto mais avançada a progressão da AIDS mais chances do paciente ser infectado por outros hospedeiros, como fungos (RACHID, SCHECHTER, 2017).

3.1.1 Componentes estruturais

O vírus do HIV é composto por um núcleo, encapsulado por uma camada proteica (nucleocapsídeo) e um envelope externo. Seu genoma é composto por três genes principais, que são responsáveis para a produção das proteínas estruturais, são eles: gag, pol e env. O gene gag é o encarregado da criação das proteínas de nucleocapsídeo, onde é codificado a proteína p55 que gera outras 4: p6, p9, p17 e p24 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O gene pol possui a função de codificação de enzimas virais formando as proteínas p66, p51, p31 e p10. Já a o gene env é encarregado pela produção do envelope, codificando inicialmente a p160 que é clivada formando a gp120 e gp41 (ROSA, SILVA, HORA, 2015).

3.1.2 Ciclo de vida

O processo de replicação viral se inicia quando o vírus adentra o sistema humano e interage com células que possuem receptores CD4+ (linfócitos e macrófagos), devido ao tropismo da glicoproteína gp120. Ao se ligar ele promove a ação dos correceptores CCR5 e CXCR4, que auxiliam na entrada do vírus. Esse procedimento desencadeia a interação da glicoproteína gp41 que permite a interação das membranas viral e celular para a passagem do capsídeo (ALCAMI, OLMEIDA, 2013).



Após a entrada o material enviado se reorganiza para a realização da transcriptase reversa onde o material genético RNA é transformado em DNA para a integração no genoma humano. Em seguida a enzima integrase introduz o material gênico para dentro do núcleo da célula. Quando ocorrer a produção de proteínas novas o RNAm (RNA mensageiro) leva informações para a produção de novos vírus. A figura 1 representa o ciclo completo de replicação viral (ALVES, 2014).

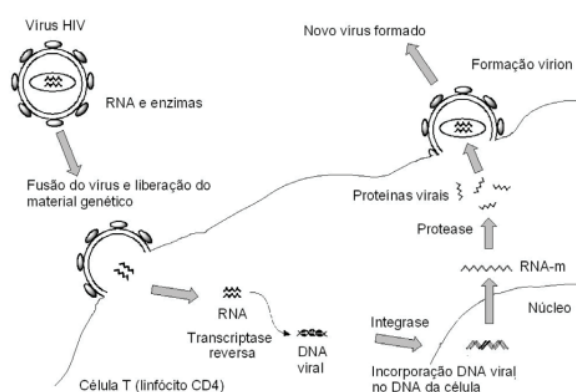


Fig.1 Representa o ciclo de replicação viral dentro da célula.
Fonte: CUNICO et al, 2008.

3.2 RNA de interferência

O fenômeno de RNA de interferência foi observado pela primeira vez em 1988 quando os cientistas Andrew Fire e Craig Mello publicaram seu artigo em que descrevia o evento de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) no nematódeo *Caenorhabditis elegans* através de RNAs de dupla fita (SETTEN et al., 2019).

O processo de RNA usufrui de um mecanismo altamente eficiente é seletivo para o silenciamento de genes tendo um grande potencial de tratamento de uma série de doenças com desenvolvimento rápido para a indústria farmacêutica (HAUSSECKER, 2014).

3.2.1 Silenciamento por RNAi

A produção de proteínas é baseada na leitura do DNA para a transcrição de RNA mensageiro (RNAm) que será transportado ao citosol, onde o ribossomo fará a tradução, com a subsequente síntese de proteínas. O RNAm contém as informações necessárias para a biossíntese, ele é formado por uma fita simples de RNA adquirida através de um molde do DNA presente no núcleo (BERG et al., 2021).

A ação do RNAi possui a proposta de utilizar pequenos RNAs interferentes sintéticos (siRNA) que possuem dupla fita. Sua estrutura é produzida conforme o gene alvo a ser silenciado. Ao entrar ao citoplasma, através da via endocitose, o RNA longo é clivado pela proteína DICER,



o transformando em pequenas fitas de RNA ou siRNA. O siRNA promove a ação de um complexo de proteínas chamado RISC que é responsável pela regulação da expressão genica. Através desse estímulo causado pelo siRNA o RISC promove a degradação da molécula de RNAm, silenciando o gene alvo. A figura 2 ilustra o processo de silenciamento pela tecnologia de RNA (SETTEN et al., 2019).

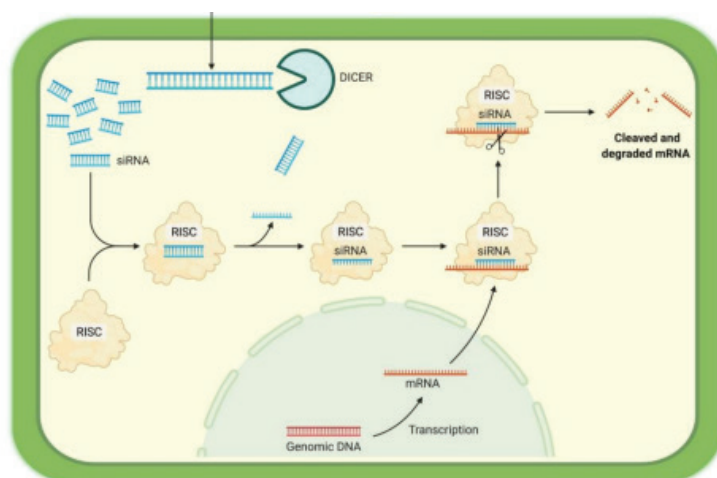


Fig.2 Ilustração do processo de funcionamento da RNAi dentro da célula alvo.
Fonte: SOTO, CERDAS, 2021.

3.2.2 Utilização de RNAi no HIV-1

Segundo os autores Swamy, Wu e Shankar (2016) para a prática é necessário observar que existem múltiplos alvos para o emprego de RNAi. A utilização do receptor CD4 e CXCR4 não são ideais para aplicação da técnica, pois a ruptura da sua presença pode causar uma imunodeficiência, por ser essencial as células T, e na retenção de células tronco hematopoiéticas respectivamente. A proteína CCR5 já é ideal para utilização pois proporciona muitos efeitos contra o vírus HIV-1 e não apresenta problemas significativos ao corpo humano.

Em um estudo realizado por Cardona et al. (2022) foram utilizadas células MAGI-CCR5 derivadas do epitélio humano que expressam CXCR4, CCR5 e CD4 (THERMOFISHER, 2023). Elas foram transfectadas com shCCR5, small hairpin (pequeno RNA de grampo de cabelo, uma alusão ao seu formato) com alvo na proteína CCR5, aplicada a técnica RNAi. A transfecção é o processo de inserção de material genético em células através de métodos como eletroporação, que utiliza correntes elétricas para desestabilizar as membranas aumentando a permeabilidade (MERCK, 2023). Também foram utilizadas células humanas U937 provenientes de linhagem de monócitos com expressão de CD4, que foram contaminadas com o isolado primário HIV-1 6920 clade (cepa viral) durante 9 dias (THERMOFISHER, 2023). Os resultados obtidos apontaram que a expressão transitória do shCCR5 inibiu em 47% a expressão de CCR5 nas células MAGI-CCR5. Na cultura protegida pelo shCCR5 houve uma diminuição na replicação do vírus, analisada através da



presença de p24, ao longo dos dias 4, 7 e 9 da pesquisa, significando que mesmo com a expressão parcial do CCR5 já contribui para o combate do vírus.

Na pesquisa realizada por Shimizu et al. (2015) foram injetadas células CD34+ com inclusão o vetor sh1005, que é um RNA em small hairpin (shRNA), para o knockdown de CCR5 em camundongos BLT humanizados, que possuem o sistema imune humano de forma funcional, foi obtido como resultado que essa metodologia atingiu uma estratégia eficaz na supressão do gene do CCR5 nos camundongos, fornecendo células TCD4⁺ resistentes a infecção do vírus de HIV-1 (DAHARSH et al., 2019).

No momento atual de acordo com o autor supracitado, mesmo com os constantes avanços, a tecnologia de RNAi ainda possui desafios para conquistar o sucesso e implementação de seu uso como tratamento de HIV-1. A muitos aperfeiçoamentos a serem realizados na questão de toxicidade, farmacocinética e farmacodinâmica para o uso definitivo a metodologia.

3.3 CRISPR

A metodologia de CRISPR foi inspirada a partir da observação de células procariontes que possuíam incorporado em sistema de defesa o Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) que combate elementos genéticos móveis estranhos (MGEs) (PAUL, MONTTOYA, 2019).

Segundo Chen et al. (2019) a tecnologia de CRISPR vem demonstrado nos últimos anos uma grande potência em tratamentos na edição de alvos únicos, se sobressaindo em meio das tecnologias do mercado atual. A metodologia é uma ferramenta de edição versátil atraindo muitos cientistas ao longo do mundo.

3.3.1 Edição genética por CRISPR

A ferramenta genética mais desenvolvida atualmente é o CRISPR-CAS9. O sistema CRISPR-CAS dentro de células procariontes funciona através da entrada do vírus nas bactérias e na primeira infecção e armazenado um pedaço do código genético viral dentro do DNA da bactéria, como um método de "memória", criando uma região genômica chamada CRISPR (JIANG, DOUDNA, 2017).

Após uma reinfecção é acionado o processo CRISPR-CAS, onde o fragmento do genoma viral é traduzido em uma molécula de RNA e se associa a uma enzima chamada CAS, que é capaz de realizar um screening do RNA viral injetado na célula até parear com a região complementar, quebrando a molécula do vírus (HRYHOROWICZ et al., 2017).

O sistema CRISPR foi classificado em seis tipos, sendo os tipos I-III mais estudados. O sistema CRISPR II requer apenas a proteína CAS9, originária do *S. pyogenes*, para realizar a varredura, ligar e clivar a sequência de DNA alvo. Ele é composto por três partes: o gene transativador do RNA CRISPR (tracrRNA), o gene Cas e as sequências espaçadoras e repetidas CRISPR. Posteriormente



a transcrição os elementos de tracrRNA e pré-crRNA são estabilizados pela enzima CAS9 e par de bases e a RNase III cliva o pré-crRNA em crRNA (LINO et al., 2018).

3.3.2 CRISPR-CAS9 no tratamento de HIV-1

Assim como a tecnologia de RNAi o alvo para o combate da infecção de HIV-1 é o correceptor CCR5, como anteriormente citado a proteína entre as possibilidades é a mais viável para o silenciamento, devido a não apresentar riscos significativos ao corpo e sua alteração possui um alto potencial para tratamento do HIV-1 (MOHAMED et al., 2022).

Em uma pesquisa realizada por Kang et al. (2015) foi utilizado uma linhagem de Células tronco de pluripotência induzida (iPSC) derivadas de fibroblastos livres de transgênicos DF19-9-7T em que foram rastreadas a linhas hematopoiéticas para a aplicação a tecnologia, aplicando o CRISPR em uma linha apenas um RNA guia (gRNA1) e outra com gRNAs duplos. Como resultado foi extraído que os gRNAs únicos que apresentaram uma eficiência de edição de 12,5%, sendo que em gRNAs duplos foi demonstrado o dobro de eficiência, concluindo que a edição do gene CCR5 pode ser realizada com sucesso e eficiência em iPSC. Porém a eliminação do CCR5 está associada a vulnerabilidade a vírus como *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis*, vírus Herpes Simplex, *Trypanosoma cruzi*, *Cryptococcus neoformans*, *Chlamydia trachomatis*, *Listeria* e *Plasmodium*.

Em estudos realizados em camundongos realizando o knockdown de CCR5 por meio do CRISPR em células Hematopoietic Stem and Progenitor Cells (HSPCs) que quando enxertadas nos camundongos apresentaram 32% de regulação negativa para CCR5, além do transplante secundário de células de medula óssea dos camundongos enxertados em camundongos virgens, obtendo uma produção de 27% de células T CD4⁺ com knockdown de CCR5 (MOHAMED et al., 2022).

Entretanto deve-se avaliar a segurança da aplicação clínica da metodologia, verificando os efeitos causados pela interação do CRISPR-CAS9 em locais que não são o alvo, que podem causar a clivagem sem especificidade levando a citotoxicidade. Além de a contante presença de gRNA/ CAS9 mediada por fatores lentivírus pode levar efeitos indesejáveis, aumentando a incompatibilidade com o local de clivagem do gene CCR5 (ZHANG et al., 2022)

Conclusão

Em base do estudo realizado nesse artigo é perceptível que os avanços na biologia molecular estão em um nível satisfatório. Tanto como a tecnologia de RNAi e CRISPR-CAS9 apresentam resultado *in vitro* e *in vivo* convincente com as expectativas aplicadas. A utilização de RNAi e CRISPR-CAS9 suprimiram a expressão do correceptor nas pesquisas realizadas, inibindo a atividade do vírus HIV-1.



Todavia a aplicação das duas tecnologias ainda possui seus interferentes. O RNAi ainda possui questões de gerar toxicidade, a farmacocinética e farmacodinâmica para sua evolução. Já o CRISPR-CAS9 possui os efeitos adversos fornecidos pela interação com células que não são alvo, gerando toxicidade ao indivíduo. Além do mais de gerar maior vulnerabilidade para outros vírus como *Mycobacterium tuberculosis*. A aplicação da biologia molecular possui grandes avanços, porém ainda possuem suas limitações.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Marcia e Rodolfo, que me forneceram todo suporte necessário para ingressar e finalizar os meus estudos, sempre me incentivando e dando os conselhos para concluir essa jornada. Agradeço a todas as minhas amigas que me forneceram companhia e assistência nos melhores e piores momentos, sempre me divertindo e trazendo boas sensações. Agradeço também aos meus colegas de trabalho que contribuíram com seus conhecimentos me ajudando a ficar mais tranquila em relação aos conteúdos que eu tinha dúvidas. Também agradeço aos professores que me acompanharam na minha jornada me repassando a sua sabedoria e trazendo momentos descontraídos em meio de tanto caos.

Referências

- ALCAMI, José; OLMEDA, Mayte P. Determination of HIV tropism and its use in the clinical practice. Expert review of anti-infective therapy, vol. 11,12, p. 1291-302, 2013.
- ALVES, Bruno C. Análise de mecanismos envolvidos no efeito inibitório sobre a replicação do HIV-1 resultante da ativação de TLR2. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 8-48, 2014.
- BERG, Jeremy M.; TYMOCZKO, John L.; J., Jr. Gatto G.; STRYER, Lubert. Bioquímica. São Paulo: Grupo GEN, E-book, p. 115-146, 2021.
- BRASIL. Ministério da saúde. Boletim epidemiológico HIV/AIDS. Brasília, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/centrais-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2022>. Data de acesso: 15/06/2023;
- BRASIL. Ministério da saúde. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV. Brasília, 2013. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_diagnostico_infeccao_hiv.pdf. Data de acesso: 15/06/2023.
- BRASIL. Ministério da saúde. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças. Brasília, 2018. Disponível em: https://www.gov.br/aids/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/2018/manual_tecnico_hiv_27_11_2018_web.pdf. Data de acesso: 22/06/2023.
- BRUNS, Maria A.T.; FERNANDES, Ítalo. Revisão sistematizada da literatura científica nacional acerca da história do hiv/aids. Revista Brasileira de sexualidade humana, Rio de Janeiro, p. 60-67, 2020.
- CARDONA, Maria E.; et al. Specific properties of shRNA-mediated CCR5 downregulation that enhance the inhibition of HIV-1 infection in combination with shRNA targeting HIV-1 rev. Springer Link, p. 1-6, 2022; Células magic-cc5. Thermofisher, 2023. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/technical-resources/cell-lines/m/cell-lines-detail-559.html>. Acesso em: 16/09/2023; Células u-937. Thermofisher, 2023. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/technical-resources/cell-lines/u/cell-lines-detail-315.1?gclid=CjwKCAjwpJWo>



BhA8EiwAHZFzfvVR6Dj8zuTRtbqmuVlplpdiJgqGIK7f2e0nVB0Rx2dufcq6TvYVRBoCGTMQAvD_BwE&ef_CAjwpJWoBhA8EiwAHZFzfvVR6Dj8zuTRtbqmuVlplpdiJgqGIK7f2e0nVB0Rx2dufcq6TvYVRBoCGTMQAvD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!541399016552!!!g!!!382790548!126051992563&cid=bid_clb_cce_r01_co_cp0000_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con&s_kwcid=AL!3652!3!541399016552!!!g!!!. Acesso em: 16/09/2023.

CHEN, Minjiang; MAO, Aiwu; XU, Min; WENG, Qiaoyou; MAO, Jianting; JI Jiansong. CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Cancer Letters*, volume 447, p. 48-55, 2019.

CRESPO, C.L; GONZALEZ, V.S; PEGAS, L.A.C.S; HONÓRIO, S.K.A; MELLO, J.N. Cefaleia em paciente hiv positivo: um diagnóstico diferencial entre doenças oportunistas neurológicas e uso de terapia antirretroviral (tarv). Centro Universitário de Volta Redonda, Rio de Janeiro, p. 1, 2015.

CUNICO, Wilson; GOMES, Claudia R.B.; JUNIOR, Walcimar T.V. HIV-recentes avanços na pesquisa de fármacos. Instituto de tecnologia em fármacos, Rio de Janeiro, p. 1-7, 2008.

DAHARSH, Lance; ZHANG, Jianshui; TAIT, Amanda R.; LI, Qingsheng. A Double Humanized BLT-mice Model Featuring a Stable Human-Like Gut Microbiome and Human Immune System. *Journal of Visualized Experiments*, Nebraska, p.1-8, 2019.

HAUSSECKER, Dirk. Current issues of RNAi therapeutics delivery and development. *Diário da liberação controlada*, Holanda, p. 49-54, 2014.

HRYHOROWICZ, Magdalena; LIPIN'SKI, Daniel; ZEYLAND, Joanna; SŸOMSKI, Ryszard. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Arch Immunol Ther Exp*, Polónia, p. 233-240, 2017;

JIANG, Fugou; DOUDNA, Jennifer A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, California, vol. 46, p. 505-529, 2017.

KANG, HyunJun; MINDER, Petra; AE, Parque M.; MESQUITTA, Walatta T.; TORBETT, Bruce; SLUKVIN, Igor I. CCR5 Disruption in Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9 Provides Selective Resistance of Immune Cells to CCR5-tropic HIV-1 Virus. *Official journal of the American Society of Gene & Cell Therapy*, Washington, p. 1-9, 2015.

LINO, Christopher A.; HARPER, Jason C.; CARNEY, James P.; TIMLIN Jerilyn A. Entregando CRISPR: uma revisão dos desafios e abordagens. *Drug Delivery*, 25:1, p. 1234-1257, 2018.

Transfecção e edição gênica. Merck, 2023. Acesso em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/applications/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-culture-by-technique/transfection-and-gene-editing>. Acesso em: 17/09/2023.

MOHAMED, Hager; GURROLA, Theodoro; BERMAN, Raquel; COLLINS, Mackenzie; SARIYER, Ilker; NONNEMACHER, Michael; WIGDAHL, Brian. Targeting CCR5 as a Component of an HIV-1 Therapeutic Strategy. *Frontiers in Immunology*, vol. 12 816515, p. 1-20, 2022.

PAUL, Bijoya; MONTROYA Guillermo. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. *Biomedical Journal*, volume 43, emissão 1, p. 8-17, 2020.

RACHID, Márcia; SCHECHTER, Mauro. **Manual de HIV/AIDS**. Thieme Revinter, Rio de Janeiro, E-book, 10ª Edição, p. 3-21, 2017.

ROSA, Matheus C.; SILVA, Naylê M.O.; HORA, Vanusa P. Patogênese do HIV- características do vírus e transmissão materno-infantil. *Revista brasileira de análises clínicas*, Rio de Janeiro, p. 1-6, 2015.

SETTEN, Ryan, et al. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Revista Nature reviews drug Discovery*, Alemanha, p. 421-46, 2019.

SHIMIZU, Saki, et al. RNAi-Mediated CCR5 Knockdown Provides HIV-1 Resistance to Memory T Cells in Humanized BLT Mice. *Molecular Therapy Nucleic Acids* 4, e227, 2015.



SOTO, Alejandro H.; CERDAS, Randall C. RNAi Crop Protection Advances. *Jornal internacional de ciências moleculares (MDPI)*, vol. 22, p. 12-148, 2022.

SWAMY, Manjunath N.; WU, Haoquan; SHANKAR Premlata. Recent advances in RNAi-based strategies for therapy and prevention of HIV-1/AIDS. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 103, página 174-186, 2016.

ZHANG, Zhihao; HOU, Wei; CHEN, Shuliang. Updates on CRISPR-based gene editing in HIV-1/AIDS therapy. *Virologica Sinica*, vol. 37, issue 1, p. 1-10, 2022.