

# Edição genética contra o HIV

A técnica CRISPR-Cas9 tem sido considerada a mais nova e promissora arma para combater infecções virais. Caberá a ela a missão de curar a Aids?

Por Karina Fusco



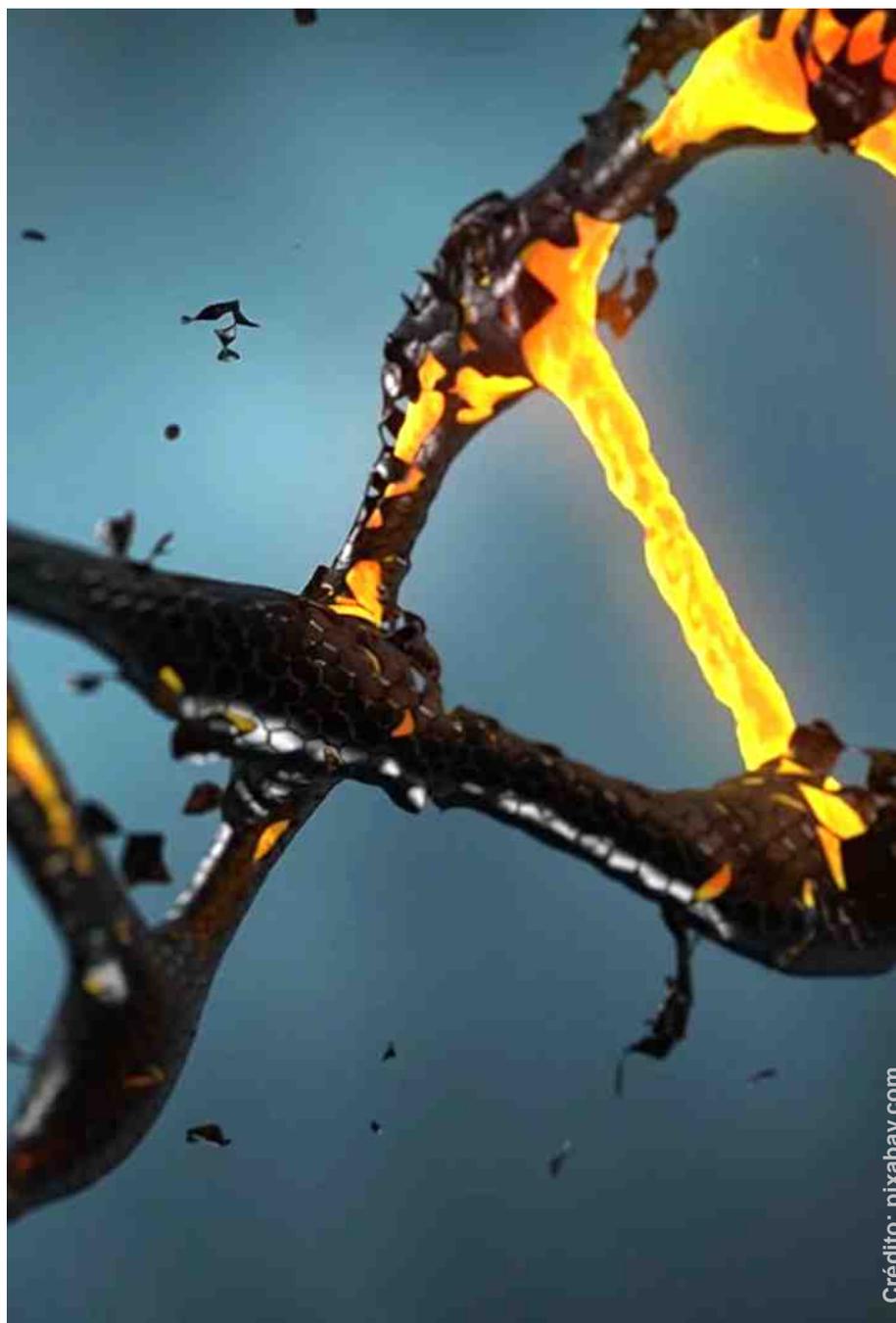
Crédito: pixabay.com

Há alguns meses, pesquisadores da Universidade Temple, na Filadélfia, Estados Unidos, anunciaram que conseguiram reeditar os genes do HIV presentes em animais vivos infectados por meio do emprego da técnica CRISPR-Cas9. Publicado na revista *Molecular Therapy*, o experimento conduzido em parceria com a Universidade de Pittsburgh, nos Estados Unidos, eliminou totalmente o vírus de camundongos que haviam recebido, previamente, células humanas infectadas com o HIV.

Ao demonstrar que a replicação do HIV-1 pode ser completamente suprimida e o vírus eliminado de células infectadas, a pesquisa despontou como uma nova esperança para 36,7 milhões de pacientes soropositivos em todo mundo, apresentando-se como uma das mais promissoras para frear a doença que, segundo a OMS, somente no ano de 2016 teve 1,8 milhão de novos casos identificados, ou seja, um a cada 17 segundos.

CRISPR é a sigla para Conjunto de Repetições Palindrômicas Regularmente Espaçadas, que, em associação com a proteína Cas, permite editar com precisão o DNA. O pesquisador Luciano Abreu Brito, do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano, ligado ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), explica que a técnica consiste em introduzir nas células um sistema composto basicamente por dois ingredientes: uma endonuclease, enzima que corta a dupla fita do DNA, chamada Cas, e um RNA-guia, que contém uma sequência que interage com a enzima Cas. Na prática, o RNA-guia recruta a enzima Cas – que funciona como uma tesoura molecular – à região-alvo do DNA onde haverá a quebra. “Em consequência da quebra, mecanismos de reparo do DNA da própria célula são ativados para corrigir o dano, e podem tanto introduzir mutações aleatórias que levam ao truncamento da proteína codificada por determinado gene, inativando-o, quanto introduzir ou corrigir mutações específicas”, diz o pesquisador.

Metodologias anteriores ao CRISPR-Cas9 já possibilitavam a edição genética, porém havia diversos pontos negativos. A pesquisadora Ângela Saito, do



Crédito: pixabay.com

Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em Campinas (SP), pontua que esta é, atualmente, a técnica mais simples, eficiente, rápida e de menor custo para gerar modificações específicas no genoma de organismos-modelo e em diversos tipos de células. “As modificações feitas no genoma são decorrentes da tentativa de

mecanismos de reparo da célula em corrigir a quebra no DNA”, afirma.

### Potencial e limitações

Com o domínio da nova técnica, pesquisas voltadas para a cura de diversas doenças se intensificaram nos laboratórios de biologia

molecular espalhados pelo mundo. Muitas delas focaram nas patologias desencadeadas por vírus. Segundo Brito, da USP, a mesma lógica da defesa contra ataques virais em bactérias – na qual o sistema CRISPR-Cas9 é direcionado para promover a quebra do DNA viral, destruindo assim o vírus –

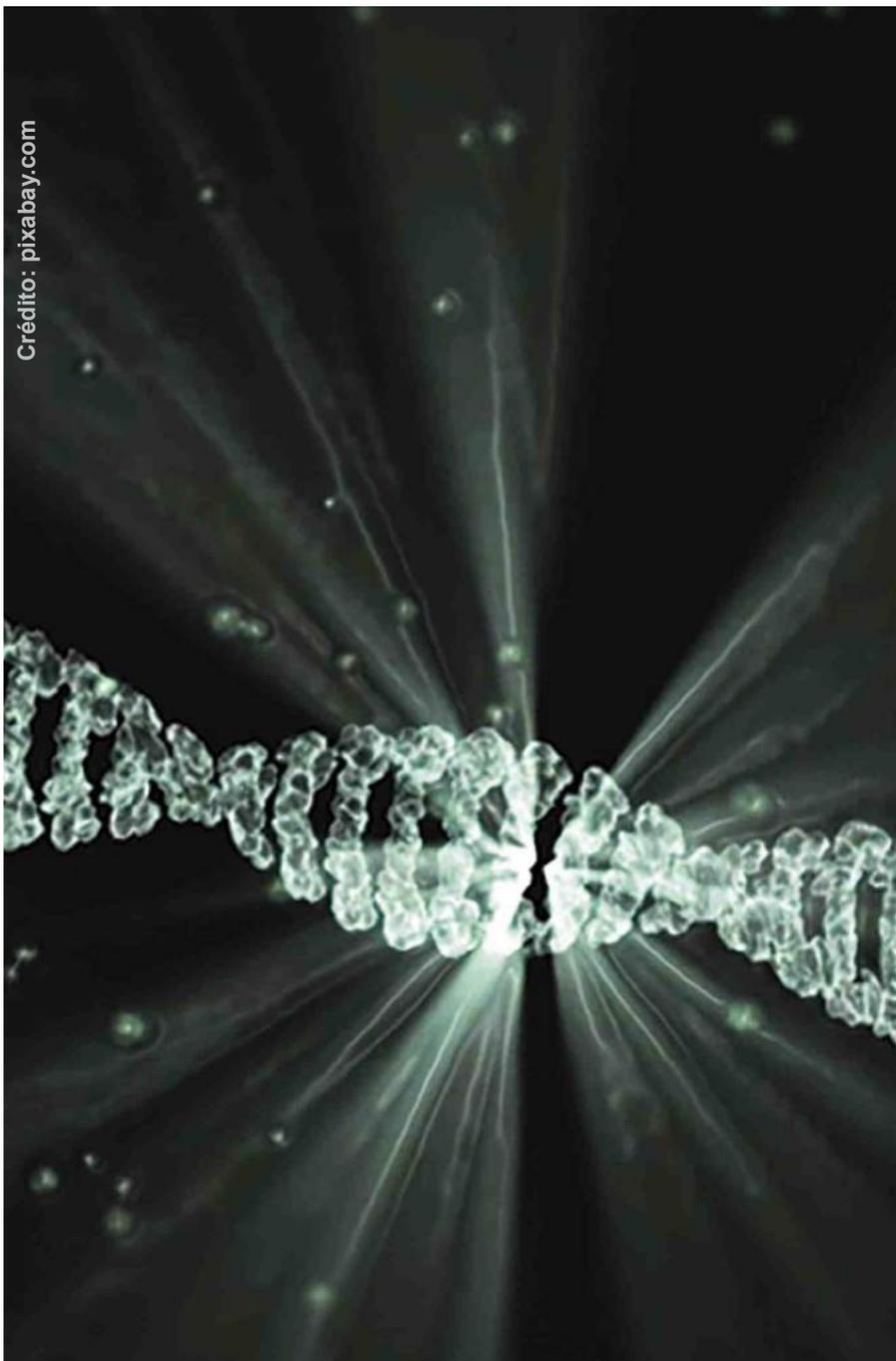
pode ser aplicada para combater infecções virais em humanos. “Se, em vez de construirmos um RNA-guia que mire num gene contido no genoma humano, o sintetizarmos para ter o genoma viral como alvo, consequentemente, o sistema vai procurar o DNA viral para quebrá-lo”, exemplifica.

Ângela Saito chama a atenção para alguns obstáculos que ainda limitam o uso da metodologia como terapia antiviral em humanos. “Existe a possibilidade de um 'escape viral', com o surgimento de variantes virais resistentes à clivagem pelo sistema”, afirma.

Outra preocupação, segundo ela, é a entrega *in vivo* do maquinário do sistema CRISPR-Cas9 na célula infectada do hospedeiro. “Muitas vezes, a infecção viral ocorre em células circulantes e pode ser desafiador combatê-la, uma vez que isso exige uma entrega eficaz em múltiplos órgãos. Uma alternativa seria a introdução *ex vivo* de CRISPR-Cas9 em culturas de células-tronco hematopoiéticas ou de células-tronco pluripotentes induzidas, para a geração de populações de células resistentes ao vírus e que poderiam, depois, ser administradas nos indivíduos infectados”, explica.

### **A promissora cura do HIV**

Um dos aspectos de maior destaque dessa metodologia tem sido seu potencial de cura para a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids), doença provocada pelo vírus HIV, que já matou cerca de 35 milhões de pessoas desde o início da epidemia, na década de 1980,



Crédito: pixabay.com

segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS).

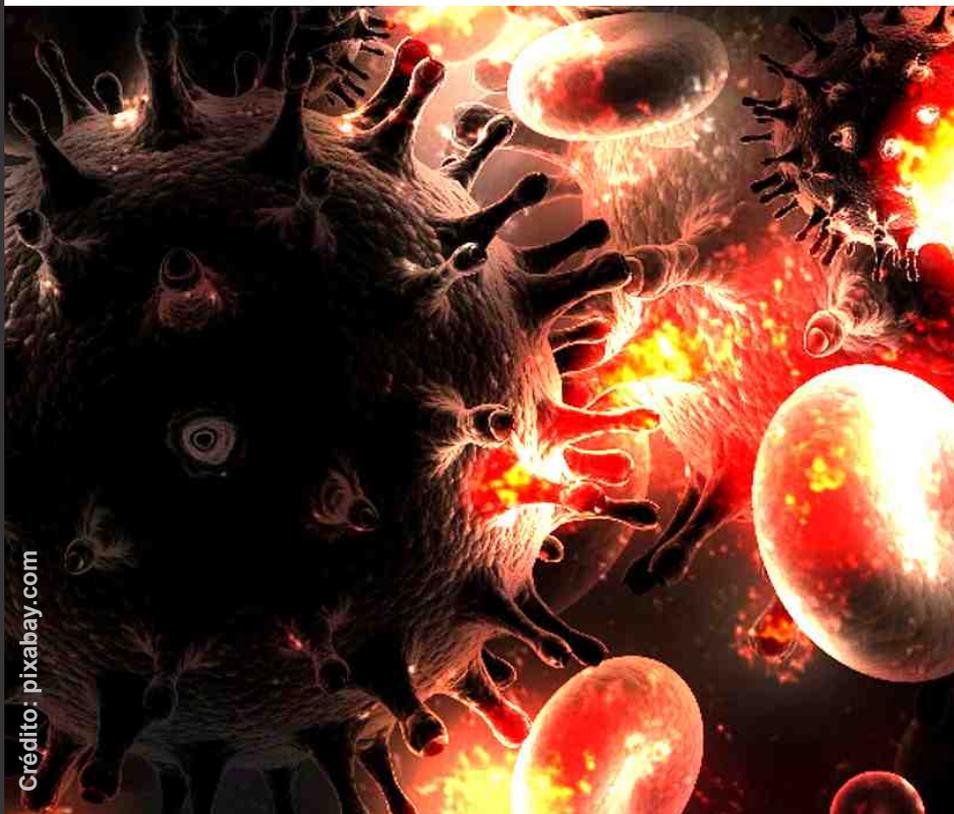
Para Brito, a pesquisa apresentada no início desta reportagem representa um avanço significativo no combate ao HIV, ao promover a eliminação do vírus tanto durante a fase de infecção aguda quanto no estágio de latência. “Resumidamente, genes codificando a endonuclease Cas9 e RNAs-guias tendo como alvo sequências do DNA viral foram inseridas em outro vetor viral – um adenovírus inócuo ao animal, mas capaz de infectar um amplo espectro de tipos celulares. Os infectados por esse vírus apresentaram uma drástica redução da carga viral a níveis indetectáveis por



Crédito: pixabay.com

métodos de bioluminescência e quantificação de RNA.”, afirma.

A pesquisadora do LNBio destaca também que, para a entrega do maquinário do CRISPR-Cas9, os pesquisadores americanos usaram um vírus adeno-associado considerado o mais eficaz e seguro para aplicações in vivo, pois pode infectar vários tecidos distintos sem se integrar ao genoma do hospedeiro, reduzindo o risco de mutagênese e toxicidade. Este vírus adeno-associado fez a entrega de diferentes RNAs-guias – desenhados para parear em sequências distintas do genoma viral – e de uma versão menor da enzima Cas9. Atualmente, o estudo considerado promissor para mudar o cenário da Aids



Crédito: pixabay.com

está sendo repetido em primatas e os cientistas já declararam que o objetivo final é um ensaio clínico em pacientes humanos.

“Um grande avanço dessa abordagem é a possibilidade de remoção do genoma viral em células que atuam como reservatórios latentes do vírus, isto é, em células em que o vírus HIV permanece 'silenciado' no genoma humano, sem se manifestar e fora do alcance de terapias antirretrovirais. Sendo assim, pode representar um passo que substitui o uso de coquetéis antirretrovirais e se aproxima da cura permanente da AIDS”, afirma Ângela Saito.

### Combate a outras doenças

Outras infecções virais crônicas, como hepatite B, HPV e herpes também poderão vir a ser combatidas com a técnica CRISPR-Cas9. “O potencial tratamento segue



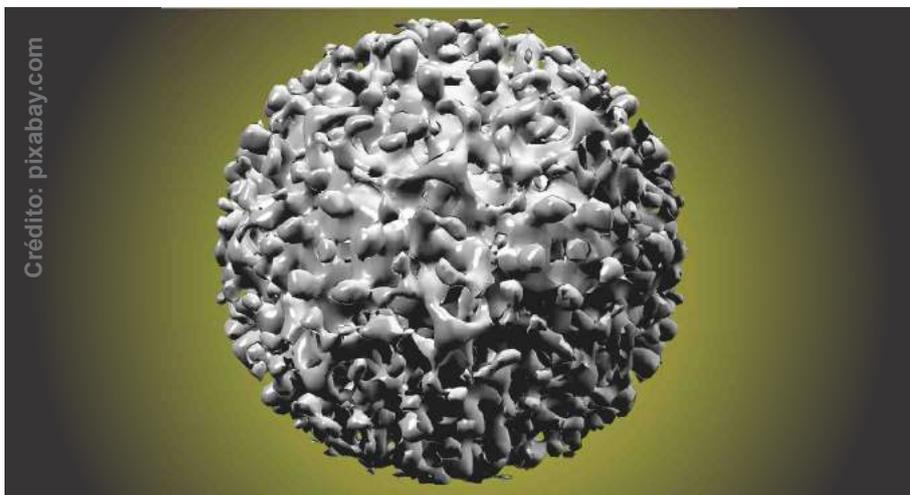
Foto: Cecília Bastos / Oswaldo Emolo / Francisco Emolo / José dos Santos / USP Imagem

**Pesquisadora Cyntia Esteves de Lima extraíndo DNA no Laboratório de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH – IB – USP).**

a mesma lógica do HIV, porém com algumas particularidades relacionadas à especificidade

dos DNA/RNA-alvos e ao método de entrega do sistema nas células infectadas”, diz Luciano Brito.

No caso da hepatite B, diversos estudos realizados desde 2014 mostraram que a técnica é promissora quando usada para inativar o DNA do vírus HBV e impedir a replicação viral em linhagens de células in vitro e em modelos animais in vivo. Posteriormente, o método foi utilizado como ferramenta para fazer uma varredura genética e descobrir as



**Vírus da Hepatite B**

Crédito: pixabay.com

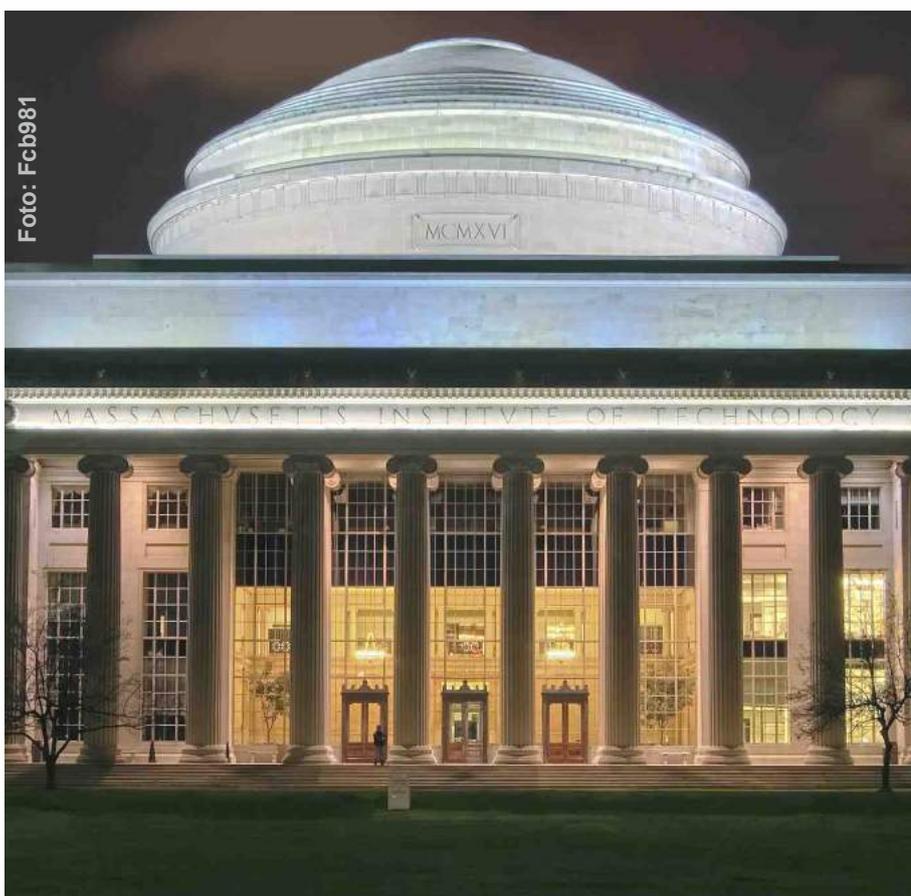


Foto: Fcb981

**Campus do Instituto de Tecnologia de Massachusetts**

proteínas humanas que o Zika vírus utiliza para invadir células e se replicar. “Proteínas que o vírus usa para entrar na célula hospedeira e para processamento e maturação foram identificadas e representam potenciais alvos terapêuticos que podem ajudar a tratar e prevenir a doença”, diz Ângela Saito. Ela reforça, ainda, que o uso desta abordagem para estudar os fatores de interação entre vírus e hospedeiro tem sido estendida a outras doenças humanas, como dengue e hepatite C, e pode trazer contribuições importantes em busca de terapias antivirais.

Mas a técnica CRISPR-Cas não é útil apenas para tratamento de infecções. Ela pode ser utilizada também para auxiliar diagnósticos. Cientistas do Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT), nos Estados Unidos,

recentemente desenvolveram um sistema, batizado de Sherlock, que permite ao método CRISPR-Cas, combinado a outra endonuclease – a Cas13a – procurar DNA ou RNA viral, como os de vírus Zika ou da dengue, em amostras de sangue, saliva ou urina. Ao entrar em contato com uma amostra biológica contendo o vírus investigado, o sistema inicia uma sequência de quebras de moléculas de RNA, e o sinal gerado por ela pode ser captado por métodos de detecção de fluorescência. “O Sherlock mostrou-se robusto o suficiente para diferenciar subtipos e linhagens dos vírus analisados, bem como detectar frações mínimas de carga viral”, afirma o pesquisador do Instituto de Biociências da USP. Sinal de que o potencial da metodologia ainda deve render muitos capítulos no combate aos vírus que historicamente afligem a humanidade.



Foto: Marcos Santos / USP Imagens

**Fachada do Instituto de Biociências da USP, em São Paulo**