

CRISPR-Cas9: Edição Genética e novas perspectivas terapêuticas no tratamento da infecção pelo HIV

CRISPR-Cas9: Genetic Editing and new therapeutic perspectives in the treatment of HIV infection

Carla Pereira de Oliveira^a, Emily Grandini de Moraes^a, Geicy Lohana L. Santos^a, Liliane de Jesus Santos^a, Raphael de Oliveira Lopes^a, Vanessa Tricia G. Garcia^a, Charlotte Cesty Borda de Saenz^b

a: Graduanda do Curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas - FMU, Brasil

b: Bióloga, Docente e coordenadora do Curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas - FMU, Brasil

RESUMO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) continua sendo um dos maiores desafios da saúde global, afetando milhões de pessoas e persistindo sem uma cura definitiva devido à presença de reservatórios virais latentes. Embora a terapia antirretroviral (TAR) tenha transformado o tratamento do HIV, novas abordagens são necessárias para avançar no controle da infecção. Nesse contexto, a tecnologia CRISPR/Cas9 surge como uma ferramenta inovadora de edição genética, permitindo a remoção seletiva do genoma viral integrado às células hospedeiras. Esta revisão de literatura analisa o potencial da CRISPR/Cas9 na terapia genética contra o HIV, com foco na modificação do gene CCR5, um co-receptor essencial para a entrada viral. O estudo do EBT-101, terapia baseada em CRISPR desenvolvida para eliminar fragmentos do DNA do HIV, representa um avanço promissor na busca por estratégias terapêuticas mais eficazes. Além disso, a análise de casos como o do "Paciente de Berlim" destaca a relevância da mutação CCR5Δ32 na resistência ao HIV e inspira novas direções na pesquisa biomédica. Este trabalho discute os avanços científicos recentes, bem como os desafios técnicos, clínicos e bioéticos da aplicação da CRISPR/Cas9 no tratamento do HIV, ressaltando a importância da inovação contínua e do compromisso da comunidade científica na evolução das terapias disponíveis.

Descritores: HIV, CRISPR/Cas9, CCR5, EBT-101, terapia genética, edição genética

ABSTRACT

Human immunodeficiency virus (HIV) infection remains one of the greatest global health challenges, affecting millions of people and persisting without a definitive cure due to latent viral reservoirs. Although antiretroviral therapy (ART) has transformed HIV treatment, new approaches are needed to further improve infection control. In this context, CRISPR/Cas9 technology emerges as an innovative gene-editing tool, enabling the selective removal of integrated viral genomes from host cells. This literature review examines the potential of CRISPR/Cas9 in gene therapy against HIV, focusing on the modification of the CCR5 gene, a critical co-receptor for viral entry. The study of EBT-101, a CRISPR-based therapy designed to eliminate fragments of HIV DNA, represents a promising advancement in the search for more effective therapeutic strategies. Additionally, the analysis of cases such as the "Berlin Patient" highlights the relevance of the CCR5Δ32 mutation in HIV resistance and inspires new directions in biomedical research. This paper discusses recent scientific advances, as well as the technical, clinical, and bioethical challenges of CRISPR/Cas9 applications in HIV treatment, emphasizing the importance of continuous innovation and the scientific community's commitment to advancing available therapies.

Descriptors: HIV, CRISPR/Cas9, CCR5, EBT-101, gene therapy, gene editing

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) continua sendo um dos maiores desafios globais de saúde, afetando aproximadamente 39 milhões de pessoas em todo o mundo em 2024, de acordo com dados da UNAIDS¹.

Apesar dos avanços significativos no tratamento, principalmente com a terapia antirretroviral (TAR), que atualmente permite a cerca de 29,8 milhões de pessoas viverem com qualidade de vida ao controlar a replicação viral, ainda não existe uma cura definitiva para o HIV². A TAR não é capaz de eliminar completamente o vírus, que permanece em reservatórios latentes no organismo². Esses reservatórios representam o principal obstáculo para a erradicação do HIV, uma vez que o vírus pode ressurgir caso o tratamento seja interrompido³.

Nos últimos anos, a tecnologia de edição genética CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9, ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Inter Espaçadas/proteína associada ao CRISPR 9) tem ganhado destaque como uma ferramenta promissora para tratar uma série de doenças genéticas e infecciosas⁴. O sistema CRISPR/Cas9, derivado do mecanismo de defesa bacteriano contra vírus, permite a edição precisa do genoma, possibilitando a modificação, inserção ou deleção de sequências específicas de DNA⁵. No contexto do HIV, essa tecnologia tem sido explorada como uma possível abordagem para erradicar o vírus, atuando diretamente sobre o genoma viral integrado às células hospedeiras⁶.

O receptor CCR5 (C-C chemokine receptor type 5) é uma proteína encontrada na superfície de algumas células do sistema imunológico, como os linfócitos T⁷. Ele desempenha um papel importante na resposta imune, atuando como co-receptor para certas quimiocinas, moléculas envolvidas na sinalização entre células do sistema imunológico⁷. Entretanto, o CCR5 é também uma porta de entrada crítica para o HIV-1, facilitando sua entrada nas células hospedeiras⁷. Por essa razão, ele tem sido alvo de diversas terapias voltadas para o tratamento e a prevenção da infecção pelo HIV⁸.

A EBT-101 é uma terapia genética experimental que utiliza a tecnologia CRISPR/Cas9 para tentar curar a infecção pelo HIV, removendo o DNA viral das células infectadas⁹. Diferentemente das terapias antirretrovirais tradicionais, que apenas suprimem a replicação do HIV, a EBT-101 visa eliminar completamente o vírus ao editar o genoma das células infectadas⁹.

Essa abordagem inovadora busca uma cura funcional para o HIV, concentrando-se, entre outros alvos, na edição do gene CCR5, que desempenha um papel fundamental na entrada do vírus nas células do sistema imunológico⁸. A modificação do CCR5 visa impedir a replicação do HIV e conferir imunidade às células hospedeiras, oferecendo uma estratégia promissora para superar as limitações das terapias existentes^{8,6}.

O objetivo dessa revisão de literatura é avaliar a terapia gênica e tecnologia CRISPR/Cas9 na edição genética voltada para o tratamento e possível cura da infecção pelo HIV.

MÉTODO

Essa pesquisa foi realizada através de uma revisão bibliográfica de artigos científicos utilizando bases de dados de relevância internacional foram utilizados os termos “terapia gênica”, “HIV e edição gênica”, “técnicas de edição de gênica”, “CRISPR/Cas9 aplicado ao HIV”, como: *PubMed* (biomedicina e ciências da saúde), *ScienceDirect* (multidisciplinar), *Web of Science* (ciência e tecnologia), *Google Acadêmico* (pesquisa acadêmica em geral). Onde foi selecionado apenas artigos publicados entre os anos 2013 até 2023, utilizando estudos em português e inglês.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Surgimento da Tecnologia CRISPR/Cas9: Uma Revolução na Edição Genética

A tecnologia CRISPR/Cas9 emergiu nas últimas décadas como uma ferramenta revolucionária para a terapia gênica, com aplicações em diversas áreas, como biotecnologia, medicina e agricultura⁵. Originalmente identificada como parte de um mecanismo de defesa bacteriano nos anos 1980, a tecnologia evoluiu para uma poderosa técnica de manipulação genética após descobertas subsequentes que demonstraram como esse sistema pode ser programado para modificar DNA em organismos complexos^{5,6}.

A descoberta do sistema CRISPR/Cas9 marcou um avanço significativo na biologia molecular, destacando-se pela precisão, simplicidade e custo relativamente baixo quando comparado a métodos anteriores de edição gênica³. Antes do advento da CRISPR, as técnicas de manipulação genética, como as nucleases de dedos de zinco (ZFNs) e as nucleases TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases), eram caras e desafiadoras de implementar³. Em contraste, a CRISPR/Cas9 possibilitou o corte preciso de sequências específicas de DNA com maior facilidade e eficiência, tornando-se uma ferramenta essencial para a pesquisa genética e terapias baseadas em edição gênica³.

Mecânica Molecular do Sistema CRISPR/Cas9

O mecanismo de CRISPR/Cas9 envolve três componentes principais:

- Cas9: uma endonuclease responsável por cortar o DNA.
- RNA guia (gRNA): uma sequência de RNA projetada para ser complementar ao alvo de DNA.
- DNA alvo: o trecho de material genético que se deseja modificar⁵.

O processo começa com o RNA guia direcionando a Cas9 até uma região específica do genoma por complementaridade de bases⁵. Uma vez localizado o alvo, a proteína Cas9 cria uma quebra de fita dupla no DNA. Essa quebra induz um mecanismo de reparo do DNA que pode ser explorado para inserir, deletar ou substituir sequências genéticas⁵. Dependendo do objetivo, o reparo pode ser mediado por dois processos principais: o reparo por junção de extremidades não homólogas (NHEJ), que geralmente resulta em inserções ou deleções, ou o reparo por recombinação homóloga (HDR), que permite inserções precisas de novos genes^{7,8}.

Aplicações e Potencial Científico

Desde sua introdução, a CRISPR/Cas9 tem sido aplicada em diversas áreas da ciência. Na pesquisa biomédica, a tecnologia tem permitido a criação de modelos de doenças em animais, a edição de genes defeituosos para terapias gênicas e o desenvolvimento de novos tratamentos para doenças genéticas, como a distrofia muscular e a anemia falciforme^{9,10}. No campo da agricultura, a CRISPR/Cas9 tem sido usada para modificar geneticamente plantas, tornando-as mais resistentes a pragas, estresses ambientais e melhorando o valor nutricional dos alimentos¹¹.

Além disso, a CRISPR tem grande potencial em campos emergentes, como a biologia sintética, onde pode ser empregada para criar organismos com novas capacidades metabólicas ou para a produção de compostos úteis, e na ecologia, para controlar populações de espécies invasoras ou de vetores de doenças, como os mosquitos transmissores da malária^{11,12}.

O Efeito Off-Target na Terapia com CRISPR

A técnica CRISPR-Cas9 revolucionou a biotecnologia e a medicina molecular, oferecendo um sistema preciso e eficiente para a edição de genes⁵. No entanto, como qualquer tecnologia emergente, a terapia baseada em CRISPR apresenta desafios significativos⁵. Entre eles, o efeito *off-target* tem recebido considerável atenção da comunidade científica⁵. Esse efeito refere-se a edições indesejadas que ocorrem em locais do genoma que não são o alvo pretendido, o que pode comprometer a segurança e a eficácia da terapia^{13,14}.

Impacto do Efeito Off-Target

As edições fora do alvo *off-target* podem resultar em mutações indesejadas que podem ter consequências imprevisíveis, como a inativação de genes essenciais ou a ativação de oncogenes, aumentando o risco de doenças, incluindo o câncer^{13,15}.

As mutações off-target podem ocorrer em qualquer região do genoma com uma sequência que tenha semelhança suficiente com a sequência alvo, mesmo que haja apenas algumas discrepâncias de nucleotídeos¹⁵.

Em modelos de estudo, o efeito off-target tem mostrado ocorrer com frequências variáveis, dependendo de fatores como a qualidade do design do gRNA, o tipo de célula em estudo e as características do genoma do organismo. Uma alta especificidade no design do gRNA e o uso de técnicas para minimizar o reconhecimento de sequências semelhantes são essenciais para reduzir esses efeitos indesejados¹⁶.

Métodos para mitigar o Efeito Off-Target

A engenharia de novas variantes da enzima Cas9, como a *SpCas9-HF1* (Cas9 de alta fidelidade), demonstrou melhorar significativamente a especificidade de corte do DNA, reduzindo as edições *off-target*¹⁵. Além disso, métodos de triagem genômica, como o uso de CRISPR baseado em epigenética (Cas9 sem atividade de corte), têm sido explorados para limitar o impacto das edições erradas¹⁵.

Outra abordagem é o uso de CRISPR em conjunto com tecnologias de sequenciamento de nova geração para monitorar as edições em todo o genoma, possibilitando a detecção precoce de efeitos *off-target*¹⁵. Futuros avanços nessas tecnologias permitirão uma detecção mais precisa e métodos de correção eficazes para evitar os riscos associados a mutações não intencionais¹⁵.

EBT-101: Terapia de Cura Genética para o HIV

A EBT-101 é uma terapia de edição genética experimental desenvolvida pela Excision BioTherapeutics, que visa curar o HIV utilizando a tecnologia CRISPR-Cas9¹⁷. Diferente das terapias atuais, que apenas controlam a replicação viral, a EBT-101 busca erradicar o DNA viral integrado nas células humanas, uma capacidade que os tratamentos convencionais ainda não conseguem alcançar¹⁷. Embora promissora, a EBT-101 foi testada em modelos animais infectados com HIV simiano (SIV), e os resultados foram positivos até o momento¹⁷.

No entanto, dados de ensaios clínicos iniciais indicaram que, apesar da segurança e biodistribuição favoráveis, a terapia não foi capaz de evitar o retorno do HIV quando os participantes interromperam o tratamento antirretroviral¹⁷. Isso sugere que, embora a terapia

tenha grande potencial, ainda existem desafios para garantir sua eficácia a longo prazo em humanos¹⁷.

Mecanismo de Ação

A EBT-101 utiliza o sistema CRISPR-Cas9 para identificar e remover partes específicas do genoma viral integradas ao DNA das células infectadas¹⁷. O HIV insere seu material genético no DNA da célula hospedeira, onde pode permanecer latente por longos períodos, dificultando a erradicação do vírus¹⁷. Essa latência dificulta a erradicação, pois o HIV pode "escapar" do tratamento antirretroviral (TAR) e reativar a infecção após a interrupção da medicação¹⁷.

O CRISPR-Cas9 utilizado na EBT-101 é projetado para atacar múltiplas regiões do DNA viral, minimizando a probabilidade de escape do vírus devido a mutações. A técnica funciona ao "cortar" o material genético do HIV presente nas células infectadas, resultando na eliminação ou na incapacidade do vírus de se replicar¹⁸.

Estudos Pré-Clínicos e Ensaios Clínicos

Antes de avançar para os testes em humanos, a EBT-101 foi submetida a extensivos testes pré-clínicos em modelos animais¹⁷. A terapia demonstrou eficácia na redução significativa do DNA do HIV em tecidos de camundongos humanizados¹⁷. Isso sugeriu um potencial de cura, pois o tratamento visou diretamente os reservatórios virais que atualmente desafiam as terapias convencionais¹⁷.

A transição para os ensaios clínicos em humanos foi autorizada em 2021 pela FDA (Food and Drug Administration) dos EUA, marcando um avanço importante para essa terapia de edição genética (Excision BioTherapeutics, 2021)¹⁷. Os ensaios clínicos de Fase 1/2 começaram em 2022 e têm como objetivo avaliar a segurança, tolerabilidade e eficácia do EBT-101 em pacientes vivendo com HIV¹⁷.

Potencial Terapêutico

O principal objetivo da EBT-101 é permitir que pacientes com HIV possam interromper a terapia antirretroviral (TAR) sem o risco de o vírus ressurgir¹⁷. Atualmente, o TAR suprime a replicação viral, mas não elimina os reservatórios do HIV no corpo, o que significa que a medicação deve ser tomada por toda a vida¹⁷. Um estudo sugere que uma terapia como a, que pode eliminar o HIV latente, teria um impacto transformador no tratamento do HIV, possivelmente resultando em uma cura funcional ou até mesmo uma cura completa¹⁷.

Se bem-sucedida, a EBT-101 representaria um avanço sem precedentes no campo da terapia genética e do tratamento de doenças virais crônicas¹⁷. Essa abordagem pode ser

estendida para o tratamento de outras infecções virais persistentes, como a hepatite B, o que ampliaria ainda mais o impacto da tecnologia CRISPR na medicina¹⁷.

Desafios e Limitações

Apesar do potencial da EBT-101, ainda existem desafios significativos a serem superados. Um dos principais é garantir que a edição genética atinja todas as células infectadas pelo HIV, incluindo as que estão em reservatórios profundos no corpo, como o cérebro e os órgãos linfáticos¹⁸. Além disso, a tecnologia CRISPR-Cas9 pode induzir efeitos "off-target", ou seja, edições acidentais no genoma, o que levanta preocupações sobre segurança a longo prazo¹⁸.

Outro desafio é a heterogeneidade do HIV, existem muitas variantes do vírus, e é possível que algumas cepas possam escapar do ataque do CRISPR, exigindo ajustes contínuos na terapia¹⁸. Além disso, a aplicação de CRISPR em humanos ainda é relativamente nova, e a comunidade científica está monitorando de perto os possíveis efeitos adversos em tratamentos de edição genética¹⁹.

O desenvolvimento da EBT-101 marca uma nova era nas terapias baseadas em edição genética, com a promessa de curar uma das pandemias mais devastadoras da história recente¹⁹. Se os ensaios clínicos forem bem-sucedidos, o impacto da EBT-101 poderá ir além do HIV, abrindo caminho para a aplicação do CRISPR no tratamento de outras doenças infecciosas e genéticas¹⁸.

A terapia oferece uma nova esperança para milhões de pessoas que vivem com HIV, especialmente em regiões onde o acesso a terapias antirretrovirais é limitado¹⁹. A Excision BioTherapeutics continua a liderar esse esforço, em parceria com universidades e centros de pesquisa para tornar a cura do HIV uma realidade nas próximas décadas¹⁹.

Casos de Cura, e Perspectivas Futuras.

O "Paciente de Londres", Adam Castillejo, passou por um procedimento semelhante em 2016, e em 2019, foi declarado o segundo paciente conhecido a ser curado do HIV após um transplante de células-tronco com a mutação CCR5-delta32²⁰. Assim como Timothy Ray Brown, o "Paciente de Berlim", Adam Castillejo, também conhecido como o "Paciente de Londres", passou por um transplante de células-tronco para tratar seu linfoma de Hodgkin em 2016²⁰. Esse transplante, realizado com células-tronco de um doador portador da mutação CCR5-Δ32, conferiu ao paciente resistência natural ao HIV, similar à que Brown obteve em 2007²⁰. Após o procedimento, Castillejo conseguiu interromper a terapia antirretroviral, e o HIV não foi detectado em seu corpo, consolidando a possibilidade de uma cura funcional para o HIV em casos extremamente raros²⁰.

Esses dois casos têm sido fundamentais para validar a ideia de que o HIV pode ser curado por meio de intervenções genéticas ou celulares²¹. O tratamento com células-tronco, especialmente de doadores com a mutação CCR5-Δ32, tem se mostrado uma abordagem eficaz para erradicar o HIV, oferecendo novas perspectivas para pesquisas focadas em terapias genéticas e de edição de genes, como o uso de CRISPR-Cas9 para criar resistência ao HIV^{20,21}. O sucesso desses casos abriu novas avenidas para o desenvolvimento de terapias que podem, em um futuro próximo, proporcionar uma cura mais acessível e menos invasiva para o HIV²¹.

O professor Ravindra Gupta, que liderou o tratamento do "Paciente de Londres", destacou que esses sucessos indicam que a cura para o HIV, embora difícil, é cientificamente possível²⁰. Além dos casos de sucesso com transplantes de células-tronco, a pesquisa para replicar esses resultados sem a necessidade de um procedimento invasivo e complexo está avançando²². Uma abordagem promissora envolve a edição genética, especificamente a utilização de tecnologias como CRISPR-Cas9 para induzir uma mutação semelhante à CCR5-Δ32, a qual confere resistência ao HIV²². Estudos recentes têm se concentrado em maneiras de editar geneticamente as células T dos pacientes para torná-las resistentes ao HIV, sem a necessidade de transplantes de células-tronco²². Esses estudos visam criar um tratamento mais acessível, menos invasivo e aplicável a um maior número de pacientes²².

Implicações para a Cura do HIV

O caso do "Paciente de Berlim" catalisou novas abordagens na pesquisa do HIV, inspirando cientistas a explorar intervenções genéticas e imunológicas para erradicar o vírus. A história de Timothy Ray Brown, que obteve uma cura funcional para o HIV após um transplante de células-tronco, levou à exploração da manipulação do receptor CCR5, uma proteína essencial para a entrada do HIV nas células CD4²³. Estudos subsequentes aprofundaram a compreensão sobre o CCR5, contribuindo para o desenvolvimento de terapias baseadas no bloqueio dessa proteína²³.

O bloqueio do CCR5 é uma das estratégias mais promissoras²³. Medicamentos como o Maraviroc, um inibidor do CCR5, impedem a infecção das células CD4 pelo HIV ao bloquear o receptor, limitando a replicação viral, especialmente quando combinados com outras terapias antirretrovirais²³. Esses avanços têm mostrado eficácia significativa no controle da infecção²³.

Além disso, a edição genética de células do sistema imunológico, como o uso de CRISPR-Cas9 para criar células T resistentes ao HIV, tem sido investigada para replicar os resultados observados no caso de Brown e Castillejo¹⁸. O objetivo é desenvolver terapias

que possibilitem a cura funcional do HIV sem a necessidade de intervenções tão invasivas, como os transplantes de células-tronco¹⁸.

Essas descobertas abrem novos caminhos não apenas para a cura do HIV, mas também para o tratamento de outras infecções virais, representando um avanço significativo na medicina imunológica e genética¹⁸.

No entanto, como esses medicamentos apenas impedem a entrada do vírus, e não o eliminam, a cura permanente ainda exige estratégias mais agressivas²⁴.

Além do foco no CCR5, cientistas estão explorando a terapia gênica para modificar células T, de forma que estas não possam ser infectadas pelo HIV²⁴. Essas terapias estão em estágio experimental, mas têm o potencial de transformar o tratamento do HIV em algo mais próximo de uma cura²⁴.

O caso do "Paciente de Berlim" representou um marco histórico na pesquisa sobre a cura do HIV, mostrando pela primeira vez que a erradicação funcional do vírus seria possível²³. O tratamento realizado com Timothy Ray Brown, que recebeu um transplante de células-tronco de um doador com a mutação CCR5-delta32, demonstrou que a modificação genética das células imunológicas poderia oferecer uma solução para a infecção por HIV²³. No entanto, apesar do sucesso notável, essa abordagem não é viável para a maioria das pessoas com HIV²³. O transplante de células-tronco é um procedimento complexo e arriscado, envolvendo desafios significativos, como a compatibilidade do doador e os riscos de rejeição e infecções²³.

CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS

O surgimento da tecnologia CRISPR/Cas9 representa um marco na ciência moderna, oferecendo uma maneira poderosa e acessível de editar o genoma de quase todos os organismos. No entanto, a sua implementação requer um debate cuidadoso sobre as implicações éticas e um avanço contínuo na melhoria de sua segurança e eficiência. A CRISPR/Cas9 continuará a transformar campos como medicina, agricultura e biotecnologia nas próximas décadas, mas sua adoção plena precisa ser guiada por considerações éticas e regulamentações adequadas.

A mutação CCR5-Δ32 e o desenvolvimento do EBT-101 representam avanços significativos a terapia gênica antiretroviral. A terapia gênica EBT-101 utiliza a tecnologia CRISPR-Cas9 para editar o DNA do paciente, eliminando o gene CCR-5 que codifica o receptor necessário

para a entrada do HIV, proporcionando uma abordagem potencialmente curativa para o tratamento da infecção pelo HIV.

Essas inovações destacam a importância das terapias gênicas na luta contra doenças crônicas como a infecção pelo HIV. Embora ainda estejam em fases de pesquisa e desenvolvimento, os resultados preliminares são promissores e indicam que essas tecnologias podem oferecer soluções duradouras e eficazes para o controle e possível erradicação do HIV. A combinação da mutação CCR5-Δ32 e da terapia gênica EBT-101 pode revolucionar o tratamento do HIV, oferecendo esperança renovada para milhões de pessoas afetadas pela doença em todo o mundo.

REFERÊNCIAS

1. UNAIDS. Global HIV & AIDS Statistics — 2024 Fact Sheet [Internet]. UNAIDS. UNAIDS; 2024. Available from: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
2. Siliciano JD, Siliciano RF. Recent developments in the effort to cure HIV infection: going beyond N = 1. *Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2016 Feb 1;126(2):409–14. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/86047>
3. Barrangou R, Doudna JA. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature Biotechnology* [Internet]. 2016 Sep 8;34(9):933–41. Available from: <https://www.nature.com/articles/nbt.3659>
4. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012 Jun 28;337(6096):816–21.
5. Yin C, Zhang T, Qu X, Zhang Y, Putatunda R, Xiao X, et al. In Vivo Excision of HIV-1 Proivirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models. *Molecular Therapy* [Internet]. 2017 May;25(5):1168–86. Available from: [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016\(17\)30110-7](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016(17)30110-7)
6. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. *Science*. 1996 Apr 12;272(5259):263–7.
7. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Molecular Therapy* [Internet]. 2016 Mar;24(3):430–46. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4786923/>
8. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology* [Internet]. 2014 Mar 2;32(4):347–55. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4022601/>
9. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution* [Internet]. 2005 Feb;60(2):174–82. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00239-004-0046-3>
10. Ansori AN, Antonius Y, Susilo RJ, Hayaza S, Kharisma VD, Parikesit AA, et al. Application of CRISPR-Cas9 genome editing technology in various fields: A review. *Narra J*. 2023 Aug 31;3(2):e184–4.

11. Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature Biotechnology*. 2013 Aug 11;31(9):839–43.
12. Tycko J, Myer Vic E, Hsu Patrick D. Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. *Molecular Cell*. 2016 Aug;63(3):355–70.
13. Cong Gan W, P.K. Ling A. CRISPR/Cas9 in Plant biotechnology: Applications and Challenges. *BioTechnologia* [Internet]. 2022;103(1):81–93. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9642946/>
14. Walther W, Stein U. Viral Vectors for Gene Transfer. *Drugs*. 2000 Aug;60(2):249–71
15. Joseph,STAT A. CRISPR Babies Scientist Sentenced to 3 Years in Prison [Internet]. *Scientific American*. 2019. Available from: <https://www.scientificamerican.com/article/crispr-babies-scientist-sentenced-to-3-years-in-prison/>
16. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyne D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*. 2013 Jun 23;31(9):822–6.
17. Doudna JA, Charpentier E. The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014 Nov 28;346(6213):1258096–6.
18. Bhowmik R, Chaubey B. CRISPR/Cas9: a tool to eradicate HIV-1. *AIDS Research and Therapy* [Internet]. 2022 Dec 1;19(1). Available from: <https://aidsrestherapy.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12981-022-00483-y>
19. Excision BioTherapeutics Announces Data from the Phase 1/2 Trial of EBT-101 in HIV And In Vivo Efficacy Data in Herpes Virus and Hepatitis B [Internet]. Excision BioTherapeutics, Inc. 2024. Available from: <https://www.excision.bio/news/press-releases/detail/43/excision-biotherapeutics-announces-data-from-the-phase-12>
20. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*. 2013 Jan 3;339(6121):819–23.
21. Hsu Patrick D, Lander Eric S, Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* [Internet]. 2014 Jun;157(6):1262–78. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4343198/>
22. Herskovitz J, Hasan M, Patel M, Blomberg WR, Cohen JD, Machhi J, et al. CRISPR-Cas9 Mediated Exonic Disruption for HIV-1 Elimination. *EBioMedicine* [Internet]. 2021 Nov 1;73. Available from: [https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964\(21\)00472-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964(21)00472-2/fulltext)
23. K A, G H, J H, C L, K R, E T, et al. Evidence for the Cure of HIV Infection by CCR5Δ32/Δ32 Stem Cell Transplantation [Internet]. *Blood*. 2011. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21148083/>
24. Lanphier E, Urnov F, Haecker SE, Werner M, Smolenski J. Don't Edit the Human Germ Line. *Nature* [Internet]. 2015 Mar 12;519(7544):410–1. Available from: <https://www.nature.com/articles/519410a>

CONTATO

Carla Pereira de Oliveira: carlapereira3r@hotmail.com