



CAPÍTULO 11

COMO O HIV RESISTE ÀS TERAPIAS GÊNICAS BASEADAS EM EDIÇÃO DO GENOMA (CRISPR-CAS9)

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.16125161011>

Vanessa Mazzardo

Graduanda em Medicina
Universidade Paranaense
Umuarama, Paraná, Brasil

Elisângela de Oliveira Pereira

Graduanda em medicina
Universidade Estácio de Sá
Angra dos Reis, Rio de Janeiro

Hoctávio Pereira de Sá

Graduando em Medicina
Centro Universitário de Mineiros
Mineiros, Goiás

Luiz Vicente Antunes Zappellini

Graduado em Medicina
Universidade do Extremo Sul Catarinense
Criciúma, Santa Catarina

Mayara Zandona Boscarl

Graduanda de medicina
Fundação Assis gurgacz
Cascavel, Paraná

Henrique Muller Genero

Graduado em Medicina
Universidade da Região de Joinville
Joinville, Santa Catarina

RESUMO: O vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) permanece como um dos maiores desafios da biomedicina moderna devido à sua capacidade de persistir em reservatórios celulares e de desenvolver resistência a diferentes estratégias terapêuticas. A tecnologia CRISPR-Cas9, ao permitir a clivagem específica do DNA

proviral integrado, surgiu como uma abordagem promissora para a eliminação do HIV. Contudo, a elevada taxa de mutação e a plasticidade adaptativa do vírus possibilitam o surgimento de mecanismos de escape, que comprometem a eficácia dessa ferramenta. Nesta revisão narrativa, foram analisadas as evidências atuais sobre os processos de resistência do HIV ao CRISPR-Cas9, incluindo mutações nos sítios-alvo, reparo impreciso por NHEJ, seleção de variantes de quasispecies, variabilidade intersubtipo e manutenção de reservatórios latentes. Também foram discutidas estratégias de contorno, como o uso de múltiplos sgRNAs, o direcionamento a regiões altamente conservadas, a combinação com terapia antirretroviral, a exploração de nucleases alternativas e a otimização dos sistemas de entrega. Conclui-se que, embora o HIV apresente diversas rotas adaptativas de escape, avanços tecnológicos e terapêuticos integrados podem ampliar a eficácia do CRISPR-Cas9, aproximando a comunidade científica do objetivo de uma cura funcional ou esterilizante da infecção.

PALAVRAS-CHAVE: HIV; CRISPR-Cas9; resistência viral; escape viral; edição genômica.

INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) permanece como um dos maiores desafios biomédicos globais, mesmo após mais de quatro décadas de intensa investigação científica. Os avanços na terapia antirretroviral combinada (TARV) transformaram a infecção por HIV em uma condição crônica controlável, mas a eliminação definitiva do vírus continua fora do alcance devido à formação de reservatórios virais latentes em células do sistema imune, principalmente linfócitos T CD4⁺ de memória (Ghosh, 2023). Diante dessa limitação, novas estratégias curativas têm sido exploradas, entre elas a aplicação do sistema CRISPR-Cas9, uma ferramenta de edição genômica capaz de reconhecer e clivar sequências específicas de DNA viral integrado (Vosoo *et al.*, 2025).

Em modelos experimentais, a utilização de nucleases CRISPR-Cas9 guiadas por RNA (sgRNA) mostrou-se capaz de remover ou inativar fragmentos essenciais do genoma do HIV, reduzindo significativamente a replicação viral e prevenindo a reativação dos reservatórios. Essa abordagem abriu perspectivas inéditas para terapias funcionais e até curativas, baseadas não apenas no bloqueio da replicação, mas na eliminação direta do provírus integrado (Zubair *et al.*, 2025).

Contudo, resultados subsequentes revelaram um obstáculo importante: a alta plasticidade genética do HIV permite o surgimento de mutações que conferem escape viral frente ao ataque do CRISPR-Cas9 (Lebbink *et al.*, 2017). Esse fenômeno ocorre porque o vírus, caracterizado por uma taxa de mutação extremamente elevada, pode adquirir alterações nos sítios de reconhecimento do sgRNA ou aproveitar mecanismos de reparo celular (como o Non-Homologous End Joining, NHEJ) para

introduzir indels que impedem a clivagem subsequente (Das; Binda; Berkhout, 2019). Além disso, a presença de múltiplas variantes quasiespecies e a integração do provírus em diferentes regiões genômicas aumentam ainda mais a resiliência do HIV frente à edição genética (Borrajó, 2025).

Assim, compreender como o HIV desenvolve resistência ao CRISPR-Cas9 não é apenas um exercício teórico, mas uma etapa crucial para o avanço de terapias baseadas em edição genômica. A identificação dos mecanismos moleculares de escape pode orientar o desenvolvimento de estratégias combinatórias, como o uso de múltiplos sgRNAs, o direcionamento a regiões altamente conservadas e a integração com TARV, de modo a reduzir as chances de seleção de variantes resistentes (Cisneros; Cornish; Hultquist, 2022).

O presente artigo de revisão narrativa tem como objetivo explorar, de forma crítica e abrangente, os mecanismos pelos quais o HIV consegue escapar da ação do CRISPR-Cas9, analisando as evidências experimentais disponíveis e discutindo potenciais caminhos para superar essas barreiras no futuro.

METODOLOGIA

Este trabalho caracteriza-se como uma revisão narrativa da literatura, voltada a reunir, analisar criticamente e discutir as evidências disponíveis sobre os mecanismos de escape do HIV frente ao sistema de edição genômica CRISPR-Cas9. Diferentemente das revisões sistemáticas, que seguem protocolos de seleção altamente padronizados, a revisão narrativa permite maior flexibilidade na incorporação de diferentes tipos de publicações, incluindo artigos originais, revisões, estudos pré-clínicos e relatos conceituais, possibilitando uma compreensão mais ampla e contextualizada do tema.

Foram consultadas bases de dados acadêmicas amplamente reconhecidas, incluindo PubMed, Scopus e Web of Science, publicados entre 2020 e 2025, utilizando combinações dos seguintes descritores em inglês: *"HIV"*, *"CRISPR-Cas9"*, *"viral escape"*, *"resistance"*, *"genome editing"*, *"provirus"*, *"multiplex guide RNA"* e *"latency"*. Termos equivalentes em português foram também aplicados para identificar publicações nacionais e regionais.

Incluiu-se artigos que tratassem especificamente da interação entre CRISPR-Cas9 e o HIV, com foco nos mecanismos moleculares de escape viral, bem como estratégias de mitigação desse fenômeno. Excluíram-se estudos que abordassem exclusivamente a edição de correceptores celulares (como CCR5 e CXCR4) sem análise direta dos mecanismos de resistência viral, bem como artigos de opinião sem fundamentação experimental ou revisão crítica consistente.

A análise dos textos selecionados foi realizada em três etapas. Primeiramente, procedeu-se à leitura exploratória dos títulos, resumos e palavras-chave, a fim de verificar a pertinência do conteúdo. Em seguida, efetuou-se a leitura integral das publicações elegíveis, com extração das principais informações referentes a mutações no sítio-alvo, diversidade de quasiespecies, reparo impreciso por NHEJ, variabilidade intersubtipo, integração em reservatórios latentes e estratégias de contorno. Por fim, os dados foram organizados de maneira descritiva e comparativa, permitindo a identificação de convergências, divergências e lacunas no conhecimento atual.

A redação seguiu uma estrutura clássica de revisão narrativa, iniciando-se pela introdução e contextualização do problema, seguida da discussão dos mecanismos de escape, análise das estratégias propostas na literatura para superá-los, e considerações finais sobre implicações clínicas e perspectivas futuras. O rigor metodológico foi garantido pela busca em múltiplas bases de dados, pelo uso de palavras-chave variadas, pela inclusão de artigos de diferentes naturezas (experimentais e revisões) e pela análise crítica da qualidade e relevância de cada estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

MECANISMOS DE ESCAPE VIRAL

A eficácia terapêutica do CRISPR-Cas9 contra o HIV-1 depende diretamente da habilidade do complexo Cas9-sgRNA em reconhecer e clivar sequências específicas do DNA proviral integrado no genoma da célula hospedeira. No entanto, a elevada taxa de mutação do HIV, aliada à sua plasticidade adaptativa, confere ao vírus a capacidade de escapar à pressão seletiva exercida por essa tecnologia. A seguir, descrevem-se os principais mecanismos identificados experimentalmente (Borrajó, 2025).

O mecanismo mais frequente de escape ocorre por mutações pontuais, inserções ou deleções (indels) no local de ligação do sgRNA. O HIV apresenta uma taxa de erro de transcrição de 3×10^{-5} por nucleotídeo, resultante da baixa fidelidade da transcriptase reversa. Essas alterações podem afetar regiões críticas, como a sequência de seed (10–12 nucleotídeos iniciais) e a sequência adjacente ao motivo PAM (Protospacer Adjacent Motif). Estudos mostraram que uma única substituição de nucleotídeo pode abolir a ligação do sgRNA e impedir a clivagem pela Cas9, resultando em vírus resistentes que continuam replicando-se eficientemente. Esse fenômeno foi confirmado em culturas celulares onde o HIV rapidamente adquiriu mutações protetoras após ciclos de replicação sob pressão seletiva do CRISPR (Kostyushev *et al.*, 2019; Riesenber *et al.*, 2022).

O HIV circula em cada indivíduo como um conjunto de variantes genéticas denominadas quasispecies, produto da alta taxa de mutação e recombinação durante a replicação viral. Quando o CRISPR-Cas9 é direcionado contra uma sequência específica, variantes pré-existentes que possuem mutações parciais nesse alvo são selecionadas positivamente, passando a dominar a população viral. Esse processo é análogo ao escape observado frente a fármacos antirretrovirais e ilustra como a pressão seletiva de uma única intervenção pode não ser suficiente para controlar o vírus (Okoli *et al.*, 2018).

Após a clivagem do DNA proviral pela Cas9, a célula hospedeira utiliza o mecanismo de reparo Non-Homologous End Joining (NHEJ) para religar a fita dupla quebrada. Esse processo é notoriamente propenso a erros, gerando pequenas inserções ou deleções que, em vez de inativar o vírus, podem modificar o sítio de reconhecimento do sgRNA de modo a impedir novos cortes. Em alguns casos, esse reparo resulta em um provírus funcional, mas resistente à ação da Cas. Assim, paradoxalmente, a tentativa de erradicar o HIV pode favorecer a emergência de variantes mais resistentes (Das; Binda; Berkhout, 2019).

A diversidade genética do HIV-1 é também observada em nível intersubtipo, com diferenças significativas entre os subtipos A, B, C e outros grupos circulantes. Como o design de sgRNAs geralmente é baseado em sequências de referência de determinados subtipos (frequentemente o subtipo B, mais estudado em países ocidentais), guias projetados podem não ter eficiência equivalente contra outras variantes predominantes em diferentes regiões geográficas. Essa variabilidade intersubtipo reduz a aplicabilidade universal do CRISPR-Cas9 e abre espaço para escape em populações infectadas por subtipos divergentes (Bhowmik; Chaubey, 2022).

O HIV integra seu DNA em múltiplos sítios do genoma do hospedeiro, estabelecendo reservatórios latentes principalmente em linfócitos T de memória. Essa integração múltipla significa que diferentes cópias provirais coexistem em um mesmo indivíduo, e nem todas são igualmente acessíveis ou suscetíveis ao ataque do CRISPR-Cas9. Mesmo que parte dessas cópias seja inativada, outras podem permanecer intactas, garantindo a persistência da infecção e funcionando como fontes de reinfeção após interrupção da terapia. Esse mecanismo reforça a dificuldade de alcançar a cura esterilizante apenas com a edição genômica (Magro; Calistri; Parolin, 2022).

Na prática, o escape do HIV frente ao CRISPR-Cas9 ocorre por uma combinação dos mecanismos descritos: mutagênese direta, seleção de variantes pré-existentes, reparo celular impreciso e heterogeneidade viral. Essa rede de estratégias adaptativas reflete a robustez evolutiva do HIV e explica porque abordagens de edição com alvos únicos tendem a falhar a médio prazo (Saifullah *et al.*, 2024).

ESTRATÉGIAS DE CONTORNO

A elevada plasticidade genética do HIV e sua capacidade de desenvolver resistência frente ao CRISPR-Cas9 exigem o desenvolvimento de abordagens mais sofisticadas para reduzir a probabilidade de escape viral. Uma das principais estratégias propostas é o uso de múltiplos RNAs guias simultaneamente, configurando um ataque multiplexado. Essa abordagem tem demonstrado bons resultados em estudos *in vitro*, pois força o vírus a acumular diversas mutações em diferentes regiões do genoma de maneira concomitante, algo altamente improvável em função das restrições funcionais impostas ao próprio ciclo replicativo. Outra alternativa importante é o direcionamento da edição para regiões altamente conservadas do genoma viral, como os long terminal repeats (LTRs) e genes estruturais e regulatórios essenciais, entre eles *tat*, *rev* e *gag*. Essas regiões apresentam baixa tolerância a mutações, de modo que alterações nelas tendem a comprometer a replicação viral, limitando as possibilidades de escape (Sandhu *et al.*, 2025).

O CRISPR-Cas9 também pode ser mais eficaz quando combinado com a terapia antirretroviral combinada (TARV). Nessa configuração, os fármacos reduzem a replicação ativa do vírus e, conseqüentemente, a chance de surgimento de mutações de resistência, enquanto a edição genômica atua sobre os provírus já integrados e latentes. Evidências experimentais indicam que a associação sequencial de antirretrovirais de ação prolongada, como a LASER-ART, com CRISPR-Cas9 conseguiu reduzir de forma significativa os reservatórios virais em modelos animais, eliminando inclusive a infecção em alguns indivíduos humanizados (Gendelman; Khalili, 2019; Gurrola *et al.*, 2024).

Além do uso combinado com a TARV, a exploração de nucleases alternativas tem recebido atenção crescente. Enzimas como Cas12a (Cpf1), que reconhece motivos PAM distintos e gera quebras com extremidades coesivas, ou Cas13, que atua diretamente sobre o RNA viral degradando transcritos essenciais, ampliam o leque de possibilidades terapêuticas. Variantes menores de Cas9, derivadas de diferentes espécies bacterianas, também oferecem vantagens na vetorização e podem reconhecer regiões adicionais do genoma viral. A eficácia dessas abordagens, contudo, depende de sistemas de entrega eficientes que atinjam reservatórios de difícil acesso, como os tecidos linfáticos e o sistema nervoso central. Nesse sentido, vetores adeno-associados (AAV), nanopartículas lipídicas e exossomos modificados têm sido avaliados como ferramentas de transporte mais precisas e seguras (Zhang *et al.*, 2025).

Há uma tendência crescente em considerar o monitoramento genômico em tempo real como parte essencial das futuras aplicações clínicas. Essa estratégia permitiria identificar precocemente mutações de escape e adaptar dinamicamente o design dos RNAs guias, de forma semelhante ao processo de atualização contínua das vacinas contra vírus sazonais. O enfrentamento da resistência do HIV ao CRISPR-Cas9 não dependerá apenas do aprimoramento de nucleases ou do desenho de

guias mais eficientes, mas da integração de múltiplas soluções complementares, combinando edição multiplexada, alvos conservados, terapias combinadas e vigilância adaptativa em longo prazo (Liao *et al.*, 2025).

CONCLUSÃO

O uso do CRISPR-Cas9 como estratégia terapêutica contra o HIV representa um avanço notável no campo da edição genômica aplicada a infecções virais crônicas. Estudos experimentais demonstraram que a tecnologia é capaz de inativar ou remover sequências provirais integradas, reduzindo a replicação viral e oferecendo perspectivas reais para intervenções curativas. No entanto, a elevada plasticidade genética do HIV impõe barreiras significativas, sobretudo pela ocorrência de mutações no sítio-alvo, reparo impreciso mediado por NHEJ, seleção de variantes de quasispecies, variabilidade intersubtipo e manutenção de reservatórios latentes. Esses mecanismos de escape, já amplamente documentados, reiteram a resiliência adaptativa do vírus e a dificuldade histórica de sua erradicação.

As estratégias propostas na literatura apontam para a necessidade de uma abordagem multimodal e integrada, que combine múltiplos sgRNAs direcionados a regiões altamente conservadas, utilize variantes alternativas da família CRISPR (como Cas12 e Cas13), explore métodos otimizados de entrega a reservatórios inacessíveis e se associe de forma sinérgica à terapia antirretroviral combinada (TARV). Ensaios pré-clínicos, como aqueles que combinaram LASER-ART e CRISPR-Cas9, já indicam o potencial dessa integração em reduzir significativamente a carga viral e até alcançar a eliminação completa do provírus em modelos animais.

Apesar dos avanços, diversos desafios permanecem, incluindo a necessidade de segurança a longo prazo, a prevenção de efeitos off-target, a viabilidade da entrega sistêmica em humanos e a adaptação contínua do sistema frente às mutações emergentes do HIV. O futuro da aplicação clínica dependerá, portanto, da capacidade da comunidade científica em desenvolver terapias de edição genômica dinâmicas, adaptativas e combinatórias, capazes de superar a rápida evolução viral.

Em síntese, embora o HIV tenha demonstrado múltiplas formas de escapar ao CRISPR-Cas9, a própria evolução da tecnologia, aliada ao conhecimento crescente sobre os mecanismos de resistência, abre espaço para o desenho de estratégias cada vez mais precisas e resilientes. A transição desse conhecimento para a prática clínica exigirá não apenas inovação tecnológica, mas também rigor ético, monitoramento genético em tempo real e integração com abordagens terapêuticas já consolidadas. Nesse cenário, a edição genômica não deve ser vista como substituto da TARV, mas como uma ferramenta complementar capaz de aproximar a ciência da tão almejada cura funcional ou esterilizante da infecção pelo HIV.

REFERÊNCIAS

BHOWMIK, Ruchira; CHAUBEY, Binay. CRISPR/Cas9: a tool to eradicate HIV-1. **AIDS Research and Therapy**, v. 19, n. 1, p. 58, 2022.

BORRAJO, Ana. Breaking barriers to an HIV-1 cure: innovations in gene editing, immune modulation, and reservoir eradication. **Life**, v. 15, n. 2, p. 276, 2025.

CISNEROS, William J.; CORNISH, Daphne; HULTQUIST, Judd F. Application of CRISPR-Cas9 gene editing for HIV host factor discovery and validation. **Pathogens**, v. 11, n. 8, p. 891, 2022.

DAS, Atze T.; BINDA, Caroline S.; BERKHOUT, Ben. Elimination of infectious HIV DNA by CRISPR-Cas9. **Current opinion in virology**, v. 38, p. 81-88, 2019.

GENDELMAN, Howard E.; KHALILI, Kamel. J-109 Sequential administration of LASER ART and CRISPR-Cas9 can facilitate HIV-1 elimination in humanized mice. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 81, p. 55, 2019.

GHOSH, Arun K. Four decades of continuing innovations in the development of antiretroviral therapy for HIV/AIDS: Progress to date and future challenges. **Global health & medicine**, v. 5, n. 4, p. 194-198, 2023.

KOSTYUSHEV, Dmitry et al. Orthologous CRISPR/Cas9 systems for specific and efficient degradation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 9, p. 1779-1794, 2019.

LEBBINK, Robert Jan et al. A combinational CRISPR/Cas9 gene-editing approach can halt HIV replication and prevent viral escape. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 41968, 2017.

LIAO, Yu et al. Biomedical Interventions for HIV Prevention and Control: Beyond Vaccination. **Viruses**, v. 17, n. 6, p. 756, 2025.

MAGRO, Gloria; CALISTRI, Arianna; PAROLIN, Cristina. How to break free: HIV-1 escapes from innovative therapeutic approaches. **Frontiers in Virology**, v. 2, p. 933418, 2022.

OKOLI, Arinze et al. CRISPR/Cas9—advancing orthopoxvirus genome editing for vaccine and vector development. **Viruses**, v. 10, n. 1, p. 50, 2018.

RIESENBERG, Stephan et al. Improved gRNA secondary structures allow editing of target sites resistant to CRISPR-Cas9 cleavage. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 489, 2022.

SAIFULLAH, M. et al. The CRISPR-Cas9 induced CCR5 Δ 32 mutation as a potent gene therapy

methodology for resistance to HIV-1 variant: a review. **European Review for Medical & Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 6, 2024.

SANDHU, Abdul Sami et al. Precision Strikes on HIV: CRISPR/Cas9-Mediated Disruption of CCR5 and CXCR4 to Block Viral Entry and Establish Cellular Immunity. **Indus Journal of Bioscience Research**, v. 3, n. 6, p. 663-669, 2025.

VOSOO, Kmrn et al. Innovative Treatments and New Strategies in the Control of HIV. **International Journal of Medical Reviews**, v. 12, n. 3, p. 954-958, 2025.

ZHANG, Chen et al. Unique molecular signatures in rebound viruses from antiretroviral drug and CRISPR-treated HIV-1-infected humanized mice. **Communications Biology**, v. 8, n. 1, p. 1077, 2025.

ZUBAIR, Akmal et al. Current Challenges With Highly Active Antiretroviral Therapy and New Hope and Horizon With CRISPR-CAS9 Technology for HIV Treatment. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 105, n. 5, p. e70121, 2025.