

A ENGENHARIA GENÉTICA COMO NOVA METODOLOGIA DE COMBATE AO HIV: A TERAPIA GÊNICA, A INTERFERÊNCIA POR RNA E SUAS APLICAÇÕES

GENETIC ENGINEERING AS NEW METHODOLOGY HIV FIGHTING: A GENE THERAPY, THE RNA INTERFERENCE IN AND ITS APPLICATIONS

ARILTON JANUÁRIO **BACELAR JÚNIOR**^{1*}, ÁQUILA GRASIELE CARVALHO **PINHEIRO**², FABIANO DAS NEVES **SIMEÃO**², GEOVANA DIAS DE SOUZA **VALADARES**²

1. Professor do curso de Biomedicina. Coordenador do curso de Farmácia; 2. Graduandos do curso de Biomedicina na Faculdade Única de Ipatinga.

* Faculdade Única de Ipatinga, Rua Salermo, 299, Bethânia, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil. CEP: 35.160-214 dr.arilton@gmail.com

Recebido em 18/10/2015. Aceito para publicação em 05/12/2015

RESUMO

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), responsável pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), tem atingido milhões de pessoas em todo o globo. Desde então, os governos tem investido em ciência e tecnologia com o intuito de obterem a compreensão da patogênese da AIDS e assim, criar metodologias que permitam controlá-la e erradicá-la. No entanto, mais de 30 anos após o início das pesquisas, os métodos de controle da infecção são o estágio mais estável de que se tem registros na literatura, sendo os mais utilizados na atualidade. A evolução da tecnologia, juntamente com os resultados de pesquisas mais detalhadas sobre o HIV e a AIDS, permitiu que metodologias emergentes, como a Terapia Gênica e Interferência por RNA fossem utilizadas para combater às infecções pelo vírus e o desenvolvimento da síndrome, cujos resultados mostram-se favoráveis e expressivos.

PALAVRAS-CHAVE: HIV, AIDS, Terapia Gênica, Interferência por RNA.

ABSTRACT

Infection with Human Immunodeficiency Virus (HIV), responsible for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), has reached millions of people worldwide. Since then, the government has invested in science and technology in order to obtain the understanding of AIDS pathogenesis and thus create methodologies to control it and eradicate it. However, more than 30 years after the start of the research, infection control methods are the most stable stage that has records in the literature, the most used today. The evolution of technology, along with more detailed research findings on HIV and AIDS, allowed emerging methodologies such as the Gene Therapy and Interference RNA were used to fight the infection by the virus and the development of the syndrome; the results have been favorable and expressive.

KEYWORDS: HIV, AIDS, Gene therapy, RNA interference.

1. INTRODUÇÃO O HIV

Cerca de 35 milhões de pessoas são portadoras do HIV no mundo, sendo que, diariamente surgem 7.000 novos infectados, e do total, uma pessoa morre a cada 20 segundos^{1,2}. Estatísticas globais descritas pelo Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS - UNAIDS (2014)² apontam que, os maiores índices de incidência a nível global estão concentradas na região da África Subsaariana, Caribe, Leste Europeu e Ásia Central. Já no Brasil, o Departamento de DST, AIDS e hepatites virais; Martins *et al.* (2014)¹ descreveram que até Junho de 2014 foram registrados 734 mil novos casos de infecção pelo vírus, sendo 0,6 % dos casos relatados, ocorrentes entre pessoas de 15 a 49 anos (prevalecendo em homens), com as concentrações de pessoas infectadas distribuídas regionalmente em: Região Sudeste (54 % dos casos), Sul (20 % dos casos), Nordeste (14,3 % dos casos), Centro-Oeste (5,8 % dos casos) e Norte (5,4 % dos casos), e até dezembro de 2013 foram registrados 278.306 óbitos derivados da epidemia da AIDS, das quais os maiores números de ocorrências encontra-se nas regiões Sudeste, com 61, 8 % dos óbitos e Sul com 17, 3 %.

O vírus, que pertence ao gênero dos Lentivírus (*Lentiviridae*) e família dos Retrovírus (*Retroviridae*), é caracterizado pelo longo período de incubação e pela capacidade de gerar um genoma de DNA pela enzima transcriptase reversa, para interagir com as células hospedeiras³. Possui formato esférico medindo entre 100 e 120 nanômetros de diâmetro e apresenta um núcleo com duas cópias de RNA de cadeia simples, envolvidos por

uma camada de proteínas, capsídeo e um envelope, revestido por uma membrana bifosfolipídica repleta de glicoproteínas acopladas, como a gp-120 e gp-41^{4,5}. Além disso, é classificado em dois subgrupos: o HIV-1 e o HIV-2, que apesar de agirem da mesma forma no organismo, o HIV-2 tem uma taxa de virulência menor que o HIV-1 e é o responsável pela epidemia da transmissão, enquanto o tipo HIV-1 é o responsável pela pandemia e pela grande variabilidade genética desse microrganismo⁴.

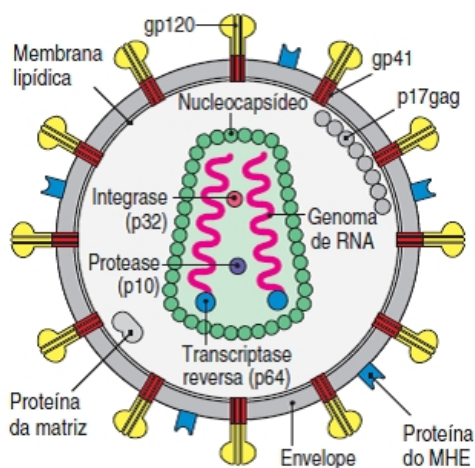


Figura 1. Estrutura do HIV. Fonte: Murphy *et al.* (2010)⁶.

A infecção acontece quando uma pessoa não contaminada entra em contato com um portador, seja por meio de relação sexual desprotegida, por meio do contato com fluidos corporais, agulhas contaminadas, transfusão sanguínea, contaminação vertical durante o parto, ou pela amamentação⁵. A progressão se dá através da entrada do genoma viral no meio intracelular, por meio do acoplamento do vírus às moléculas CD4⁺ de linfócitos T, macrófagos, células dendríticas e células da microglia, e interação entre as proteínas de superfície virais com os receptores de quimiocina CCR5 e CXCR4 das células hospedeiras, que permitem a união das membranas^{7,8}.

Os primeiros registros de sua ocorrência, na década de 1980, juntamente com o aumento do número de pessoas infectadas ao longo dos anos, trouxeram consigo a necessidade do desenvolvimento de uma metodologia terapêutica capaz de conter a progressão do vírus e o desenvolvimento da AIDS^{6,9}.

Os avanços nas pesquisas para encontrar uma cura para a AIDS possibilitou o desenvolvimento de quatro classes de medicamentos antirretrovirais: os inibidores da transcriptase reversa, inibidores de protease, inibidores de integrase e os inibidores de entrada, que visam as moléculas CD4⁺ ou os receptores de quimiocina CCR5 na célula hospedeira ou a gp-41 e a gp-120 no vírus, impedindo o seu acesso ao interior das células⁵. Apesar desses medicamentos diminuírem os níveis de vírus circulantes nos portadores e melhorarem sua qualidade de

vida, os efeitos colaterais apresentados pelos pacientes e a complexidade do tratamento devido à combinação regrada de remédios e seus respectivos horários, entre outras questões de caráter social e psicológica, impedem que muitos sigam com o tratamento, sendo esses alguns dos obstáculos no uso desses medicamentos, que tem levado os pesquisadores a continuarem buscando novas formas de combate ao HIV¹⁰.

Terapia Gênica e Interferência por RNA

A Terapia Gênica é uma metodologia terapêutica que surgiu na década de 1990, que utiliza técnicas de recombinação gênica para manipular, substituir, suplementar, regular ou inibir a expressão de genes de interesse, para assim, tratar as doenças genéticas humanas, hereditárias ou adquiridas, agindo nos pacientes de dentro para fora, intervindo nos processos patogênicos a nível molecular, desenvolvendo respostas genéticas, seguidas de reações bioquímicas e efeitos fisiológicos, manifestando em seu fenótipo as alterações realizadas no seu genótipo^{11,12,13}.

A Interferência por ácidos ribonucleicos (RNA), também conhecida como “efeito knock-down”, “efeito knock-out” ou silenciamento genético, é um modelo de terapia gênica, que foi desenvolvida tendo como base um mecanismo utilizado pelos organismos vivos para regular negativamente, a nível transcricional ou pós-transcricional, a expressão de um ou mais genes, através da degradação do RNA mensageiro (RNAm) ou bloqueio da síntese proteica, descoberto no final da década de 1990^{14,15}. Estudos complementares evidenciaram que há duas moléculas principais de RNA envolvidas nesse mecanismo: os microRNAs (miRNAs) e os pequenos RNAs de interferência (*small interfering RNA* - siRNA), que apesar de serem moléculas não codificantes, desempenham papéis importantes em diversas funções celulares, como a diferenciação, formação da cromatina, proliferação celular, formação de tecidos e homeostase^{16,17}.

A regulação genética por RNA se inicia quando um RNA de cadeia dupla (cdRNA), ou micro RNA primário (pri-miRNA), originado de partes não codificantes do genoma transcrito pela RNA polimerase II, é identificado e incorporado ao complexo enzimático Drosha, que dará origem ao pré-microRNA (pré-miRNA), a partir da clivagem do pri-miRNA, em uma estrutura de aproximadamente 70 pares de bases¹⁸. O pré-miRNA, ainda no núcleo, é associado à proteína exportina-5, por meio da qual é transportado do núcleo para o citoplasma, onde ao ser reconhecido pela RNA polimerase 3 Dicer, será clivado novamente em uma estrutura com cerca de 21 a 23 pares de bases, que posteriormente serão incorporados ao Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC), onde serão formados os miRNAs de cadeia simples, que servirão de guia para a interferência^{19,20}. O

RISC ativado se ligará ao fragmento de RNA mensageiro por meio da complementariedade das bases e causará a inibição da tradução ou a degradação do RNA mensageiro alvo^{17,21,22}, assim como mostra a Figura 2.

Em teoria, a Terapia Gênica e a Interferência por RNA podem ser desenvolvidas tanto em células somáticas, como também em células germinativas²³. Contudo, na prática, essas técnicas são desenvolvidas apenas em células somáticas, conforme o estabelecido pelo Artigo 8º da Lei de Informação genética pessoal e Informação de saúde (Lei nº 12, de 26 de janeiro de 2005)¹³.

Sistemas de entrega de transgenes e técnicas de inserção

Para que os transgenes cheguem aos seus respectivos sítios de ação, a sua entrega deve ser realizada de maneira segura e eficiente¹⁹. Na teoria, conforme Cecchi (2013)²⁴, Toledo (2013)²⁵; Bobina *et al.* (2015)²⁶ e Kormann (2015)²⁷, o vetor ideal deve ser capaz de transportar os transgenes de tamanhos variados, com baixa imunogenicidade e citotoxicidade, expressar os transgenes de maneira estável para diversos tipos específicos de células e tecidos e regular a expressão do transgene exógeno no tempo e na quantidade necessária.

Atualmente, existem vários tipos de vetores, vários tipos de moléculas e vários tipos de mecanismos de entrega abordados na Terapia, agrupados como vetores não virais e vetores virais, que podem ser utilizados para a transfecção do transgene *in vitro* (*ex vivo*), através da infusão de células em cultura retiradas do paciente e geneticamente modificadas, ou *in vivo*, através da injeção de soluções contendo o genoma nu, biomoléculas e através de técnicas que facilitem a entrega dos transgenes no citoplasma e no núcleo das células, conforme mostram as Figuras 2 e 3.

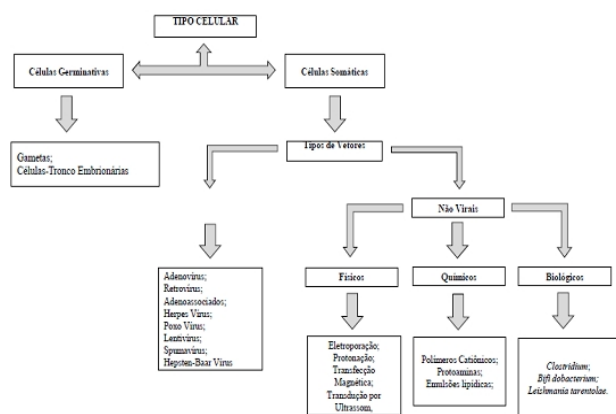


Figura 2. Sistemas de entrega de transgenes. **Fonte:** Nayerossadat; Maedeh; Ali, (2012)²⁸. Adaptado.

Aplicações no combate ao HIV

No que refere à utilização da Terapia Gênica e Interferência por RNA contra o HIV, os objetos de ensaios

laboratoriais podem ser os genes do vírus, as células do hospedeiro e o ciclo replicativo do HIV. Pereira (2013)¹⁵ afirma que a aplicação dessas técnicas no combate ao vírus é um processo com muitas possibilidades, pois o vírus apresenta uma grande variedade de potenciais alvos (genes) envolvidos nas etapas do seu ciclo replicativo, já que os vírus expõem seu material genético durante a replicação, sendo, assim, alvos frágeis do sistema de RNAi, independente de sua estrutura genômica (DNA ou RNA, de cadeia simples ou dupla), uma vez que todas as informações gênicas se fazem na forma de RNA.

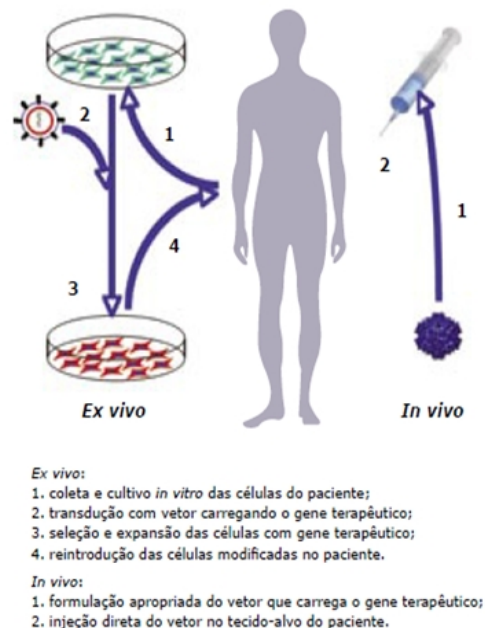


Figura 3. Terapia *ex vivo* e *in vivo*. **Fonte:** Menck; Ventura (2007)²⁹.

Quanto às células do hospedeiro, após a descoberta do tropismo do HIV pelas células CD4⁺ e pelos receptores de quimiocina CCR5 e CXCR4, seguida da publicação do caso do paciente de Berlim, que teve a cura funcional da AIDS, após ser transplantado com células da medula óssea de um doador que tinha a mutação CCR5 delta-32, na tentativa de se tratar para a leucemia mieloide aguda, diversas

estratégias vem sendo desenvolvidas para inibir a expressão do CCR5 nas células CD4⁺, e assim, tornar os pacientes imunes ao HIV por métodos laboratoriais, já que, apesar de estar presente entre 5% a 14% dos indivíduos de descendência europeia, a manifestação homozigótica da mutação CCR5 delta-32 (que concerne à imunidade ao HIV) é rara, ocorrendo em cerca de 1% a 2% dos descendentes caucasianos, apenas^{8,20,30,31,32,33}. Como estratégia alternativa, a inserção de genes que interagem com o ciclo reprodutivo do vírus também está sendo utilizada, interferindo em etapas importantes do ciclo, como a entrada dos vírus nas células e inibindo genes responsáveis pela replicação ou formação de novos vírus³⁴.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O referido trabalho constitui uma revisão bibliográfica de caráter exploratório relacionado ao tema proposto. Os materiais a serem utilizados serão de natureza diversificada (dentre livros, artigos, periódicos, monografias, dissertações, teses e materiais on-line de cunho científico), que serão reunidos através de pesquisas sobre temas como HIV, HIV-1, Terapia Gênica e Interferência por RNA, onde as partes de interesse para o trabalho serão organizados conforme o conteúdo apresentado, de modo a servirem como um auxílio para a obtenção de respostas às questões levantadas pelo trabalho.

3. DESENVOLVIMENTO

Silva (2012)⁴ e Yuan *et al.* (2012)⁷ descreveram que os ensaios laboratoriais com camundongos, cultura de tecidos e primatas não humanos, onde houve a manipulação genética do gene CCR5 em células tronco hematopoiéticas (ruptura do gene ou silenciamento), juntamente com terapias de inserção de genes que atuam interferindo no ciclo de replicação do HIV tem resultado na obtenção de células mielóides resistentes ao HIV e redução da carga viral nos indivíduos, respectivamente.

Tabela 1. miRNAs humanos e suas funções no combate ao HIV.

RELAÇÃO	RNAs	ALVOS	FUNÇÃO
Direta	miR-29a	<i>nef</i>	Diminui a infectividade do HIV.
	miR-28	3' LTR	Latência em células T CD4+ de repouso
	miR-125b		Restringe a replicação do HIV-1 em monócitos
	miR-150		
	miR-223		
	miR-382	3' LTR	Diminui a replicação do HIV.
miR-133b			
miR-138			
miR-149			
miR-326			
Indireta	miR-17-5p	PCAF	Diminui a infecção do HIV.
	miR-20a		
	miR-198	Ciclina T1	Restringe a replicação do HIV-1 em monócitos
	miR-27b	Ciclina T1	
	miR-29b	Ciclina T1	Restringe a replicação do HIV-1 em células T CD4+ de repouso
	miR-150		
	miR-223		
	miR-15a	Pur-alfa	Restringe a replicação do HIV em monócitos.
	miR-15b		
	miR-16		
miR-20a			
miR-93			
miR-106b			

A busca pelo conhecimento do mecanismo de interferência por RNA tem levado os pesquisadores à identificação de diversos RNAs interferentes, assim como as suas respectivas funções dentro das células, conforme as afirmações de Klase *et al.* (2012)¹⁶ e Vlachakis (2013)²⁰, e conforme o representado Tabela 1.

Protocolos clínicos

Até Julho de 2015, mais de 2200 protocolos de Terapia Gênica já foram registrados, sendo que, 174

protocolos (cerca de 5,5 %) envolvem doenças infecciosas (cerca de 7,9 %); 120 protocolos envolvem a regulação da expressão gênica, com genes anti-sentido (n=17 – 0,8 %), genes inibidores de replicação (n=92 – 4,2 %) e RNA interferentes (n=11 – 0,2 %) e 5 protocolos apresentam moléculas de RNAi como vetores (cerca de 0,2 %)³⁵.

Devido ao sucesso da técnica, relatado já nos primeiros protocolos, o número de doenças ponteciais para abordagens em Terapia Gênica e interferência por RNA só aumentou ao longo dos anos¹⁹.

Abordagens específicas da Terapia Gênica para o HIV foram descritas por Yang *et al.* (2011)¹⁹; Hoxie & June (2012)³⁰ e Bobina *et al.* (2015)²⁶, dentre os quais, as fases do protocolo variam de Fase 0 até a Fase III.

4. CONCLUSÃO

A Terapia Gênica e a Interferência por RNA representam uma grande promessa, no que concerne o tratamento de várias doenças, entre elas, as infecções por HIV e conseqüentemente, a AIDS. As diversas abordagens desenvolvidas (variabilidade de vetores e transgenes, com transgenia direta no indivíduo ou por processo autólogo por infusão de células em cultura do próprio indivíduo, para alvos virais ou nas células do hospedeiro) fazem dessas metodologias uma importante ferramenta de combate ao HIV, o que justifica a sua utilização em larga escala e efetivação de protocolos clínicos, com resultados plausíveis, em várias fases de importância médica e científica, em um período muito curto, se comparado aos demais eventos dessa natureza.

A Organização Mundial da Saúde estabeleceu em seu plano de metas para 2015, a redução da infecção pelo HIV em 50 %, em todo o mundo. Ainda que não consiga, há muitas expectativas para os próximos anos, considerando a taxa de crescimento da utilização dessas novas metodologias.

A grande questão para a qual o presente trabalho remete é a confirmação, ou não, do surgimento da metodologia que poderá ser considerada a “cura para a AIDS”. Caso não o seja, acredita-se, por meio dos resultados obtidos até o presente momento, que a tão almejada cura esteja próxima e, que a Terapia Gênica e a Interferência por RNA possam contribuir para o desenvolvimento de algo ainda mais promissor, ou abrir caminhos para a descoberta de algo que seja de fato, efetivo e conclusivo.

REFERÊNCIAS

- [01] UNAIDS. Fact Sheet: UNAIDS Global statistics. Geneva. 2014; 6 p. Disponível em: <http://www.unaids.org/sites/default/files/en/media/unaids/contentassets/documents/factsheet/2014/20140716_FactSheet_en.pdf>. Acesso em: Ago. 2015.

- [02] Martins M, *et al.* Cenário Epidemiológico da Infecção pelo HIV e AIDS no mundo. *Rev Fisioter S Fun.* 2014; 3(1):4-7. Disponível em: <<http://www.fisioterapiaesaudedefuncional.ufc.br/index.php/fisioterapia/article/view/425>>. Acesso em: Maio. 2015.
- [03] Gonçalves J. Características do genoma humano associadas à integração do HIV – análise bioinformática. 2014; 101 f. Dissertação (Mestre em Genética Molecular e Biomedicina) – Faculdade de Ciências e Tecnologia. Faculdade de Lisboa. Lisboa, 2014. Disponível em: <http://run.unl.pt/bitstream/10362/11069/1/Goncalves_2014.pdf>. Acesso em: Ago. 2015.
- [04] Silva JVMA. TERAPIA GÊNICA Uma fronteira para o tratamento da AIDS/HIV-1. Trabalho apresentado ao curso de biomedicina da Universidade católica de Petrópolis como requisito para aprovação na disciplina de metodologia do estudo e da pesquisa. 2012. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAfGdMAD/terapia-genica-no-tratamento-aids-hiv1>>
- [05] Bacelar Junior AJ, *et al.* Human Immunodeficiency Virus – HIV: A Review. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research.* 2014; 9(2):43-48. Disponível em: <http://www.mastereditora.com.br/periodico/20150101_110250.pdf>. Acesso em: Maio. 2015.
- [06] Murphy K, Travers PWM. *Imunobiologia de Janeway.* 7 ed. Porto Alegre: Artmed. 2010.
- [07] Yuan J, *et al.* Zinc-finger Nuclease Editing of Human *cxc4* Promotes HIV-1 CD4⁺ T Cell Resistance and Enrichment. *Molecular Therapy.* 2012; 20(4):849-59. Jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22273578>>. Acesso em: Set. 2015.
- [08] Ringpis G-EE, *et al.* Engineering HIV-1-Resistant T-Cells from Short-Hairpin RNA-Expressing Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in Humanized BLT Mice. *PLoS ONE.* 2012; 7(12). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23300932>>. Acesso em: Ago. 2015.
- [09] UNAIDS. Global Report: UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic. Geneva. 2013; 148 p. Disponível em: <http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf>. Acesso em Maio. 2015.
- [10] Alves PF, Alves RRL. Evolução no tratamento e preconceitos sofridos pelos pacientes de AIDS. 2013; 22 f. Monografia (Bacharel em Farmácia) – Faculdade de Pindamonhangaba. Pindamonhangaba, 2013. Disponível em: <<http://177.107.89.34:8080/jspui/bitstream/123456789/197/1/AlvesRachman.pdf>>. Acesso em: Ago. 2015.
- [11] Borges-Osório. *Terapia gênica humana.* 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013; 776 p.
- [12] Moraes TPB, Maia SPA. Jornalismo na web e clonagem biológica: Um estudo sobre o tema clonagem nos cadernos de ciência online dos jornais O Estado de São Paulo e Folha de São Paulo. *Ius Gentium.* 2013; 7(14):2-26. Disponível em: <<http://www.grupouninter.com.br/iusgentium/index.php/iusgentium/article/viewFile/93/pdf>>. Acesso em: Ago. 2015
- [13] Fécchio DC, Macedo LC, Ricci GC. O uso da Terapia Gênica no Tratamento de Doenças. *Revista UNINGÁ Review.* 2015; 21(1):44-49. Disponível em: <http://www.mastereditora.com.br/periodico/20150101_115516.pdf>. Acesso em: Out. 2015.
- [14] Devincenzo JP. The promise, pitfalls and progress of RNA-interference-based antiviral therapy for respiratory viruses. *Antiviral Therapy.* 2012; 17:213-25. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22311654>>. Acesso em: Ago. 2015.
- [15] Pereira TC. Introdução à Técnica de Silenciamento por RNA – RNAi. *Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética,* 2013; 170 p.
- [16] Klase Z, Houzet L, Jeang K. MicroRNAs and HIV-1: Complex Interactions. *The Journal of Biological Chemistry.* 2012; 287(49). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23043098>>. Acesso em: Ago. 2015.
- [17] Mollaie G, *et al.* RNAi and miRNA in Viral Infectious and Cancers. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2013; 14. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/259914563_RNAi_and_miRNA_in_viral_infections_and_cancers>. Acesso em: Ago. 2015.
- [18] Swaminathan S, Murray DD, Kelleher AD. The role of microRNAs in HIV-1 pathogenesis and therapy. *AIDS.* 2012; 26(11):1325-34. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22382145>>. Acesso em: Set. 2015.
- [19] Yang Y-L, Chang WT, Shih Y-W. Gene Therapy Using RNAi. In: *Gene Therapy: Developments and Future Perspectives.* 2011; DOI: 10.5772/19068. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/gene-therapy-developments-and-future-perspectives/gene-therapy-using-rnai>>. Acesso em: Set. 2015.
- [20] Vlachakis D, *et al.* Antiviral Stratagems Against HIV-1 Using RNA Interference (RNAi) Technology. *Evolutionary Bioinformatics.* 2013; 9:203-13. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3662398>>. Acesso em: Ago. 2015.
- [21] Sampey GC, *et al.* Transcriptional Gene Silencing (TGS) via the RNAi Machinery in HIV-1 infections. *Biology.* 2012; 1:339-69. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-7737/1/2/339/htm>>. Acesso em: Ago. 2015
- [22] Carneiro BM. Estudo *in vitro* do efeito da interferência por RNA (RNAi) na replicação do vírus da hepatite C. 2013. 155 f. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. São José do Rio Preto: 2013. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/108909/00778124.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: Ago. 2015.
- [23] Vogel M. *Genética humana: problemas e abordagens.* 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012; 684p.
- [24] Cechi CR. Obtenção de um modelo homólogo de terapia gênica mediante administração direta de um plasmídeo com o gene do hormônio de crescimento murinho em camundongos anões imunocompetentes. 2013; 69 f. Tese (Doutora em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013. Disponível em:

- <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-15042013-094237/en.php>>.
Acesso em: Out. 2015.
- [25] Toledo MAS. Tráfego intracelular de vetores não-virais: desenvolvimento de proteínas de fusão para transporte de DNA plasmidial através da interação com proteínas motoras. 2013. 107 f. Tese (Doutor em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2013. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000921679>>. Acesso em: Set. 2015.
- [26] Bobina ML, Burnett JC, Rossi JJ. RNA interference approaches for treatment of HIV-1 infection. *Genome Medicine*. 2015; 7(1). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4445287/>>. Acesso em: Jul. 2015.
- [27] Korman MSD. In vivo Gene Correction of Cystic Fibrosis. In: Medical Gene. InTech, DOI: 10.5772/60697 Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/cystic-fibrosis-in-the-light-of-new-research/in-vivo-gene-correction-of-cystic-fibrosis>>. Acesso em: Set. 2015
- [28] Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research*. 2012; 1(27). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3507026/>> Acesso em: Set. 2015.
- [29] Menck CFM., Ventura AM. Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. *Revista USP*. 2007; 75: 50-61. Disponível em: <<http://www.usp.br/revistausp/75/05-carlos-armando.pdf>>. Acesso em: Out. 2014.
- [30] Hoxie JA, June CH. Novel Cell and Gene Therapies for HIV. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012; 2. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/2/10/a007179.full.pdf+html>>. Acesso em: Ago. 2015.
- [31] Walker JE, *et al.* Generation of an HIV-1 Resistant Immune System with CD34⁺ Hematopoietic Stem Cells Transduced with a Triple-Combination Anti-HIV Lentiviral Vector. *Journal of Virology*. 2012; 85(10):5719-29. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/content/86/10/5719.full>>. Acesso em: Ago. 2015.
- [32] Centlivre M, *et al.* Preclinical In vivo Evaluation of the Safety of a Multi-shRNA-based Gene Therapy Against HIV-1. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2013; 2(120). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24002730>>. Acesso em: Ago. 2015.
- [33] Carrillo EH, Liu YP, Berkhout B. The Impact of Unprotected T Cells in RNAi-based Gene Therapy for HIV-AIDS. *Molecular Therapy*. 2014; 22(3):596-606. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336172>>. Acesso em: Ago. 2015.
- [34] Kiem A, *et al.* Hematopoietic Stem Cell Based Gene Therapy for HIV Disease. *Cell Stem Cell*. 2012; 10(2):137-47. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22305563>>. Acesso em: Ago. 2015.
- [35] The Journal of Gene Medicine. Disponível em: <<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>>.
- Acesso em: Out. 2015.
- [36] Lima PR. Caracterização de miRNA e siRNA de citrus. São Paulo, 2012; 75 f. Dissertação (Mestre em Sanidade Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. São Paulo, 2012. Disponível em: <www.biologico.sp.gov.br/pos_graduacao/pdf/2012/patricia.pdf> Acesso em: 03/11.
- [37] Ministério da Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites virais. *Boletim Epidemiológico HIV-AIDS*. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/boletim-epidemiologico>>. Acesso em: Abr. 2015.