



CURSO DE MEDICINA

LUCAS GARCIA GARRIDO

**VANTAGENS DA CRISPR-CAS9 PARA CURA DA INFECÇÃO POR HIV
COMPARADO AOS TRATAMENTOS TALEN E/OU ZFN: UMA REVISÃO
SISTEMÁTICA**

SALVADOR – BA

2023

LUCAS GARCIA GARRIDO

**VANTAGENS DA CRISPR-CAS9 PARA CURA DA INFECÇÃO POR HIV
COMPARADO AOS TRATAMENTOS TALEN E/OU ZFN: UMA REVISÃO
SISTEMÁTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial para aprovação no 4º ano de Medicina

Orientador(a): Rogério Grimaldi Sampaio

SALVADOR - BA

2023

RESUMO

É possível observar uma diminuição da mortalidade e do número de novos casos de infecção pelo HIV a medida que os anos se passam porém a taxa de prevalência dessa população acometida aumentou, demonstrando que o tratamento apresenta limitações no quesito cura definitiva da infecção, mostrando-se necessário novas formas de tratamento para que a cura seja alcançada de forma absoluta, sendo o uso de terapia gênica uma área em ascensão e com bastante potencial, desse modo, é importante avaliar as diferentes ferramentas disponíveis com essa finalidade. Dessa forma esse estudo foi realizado com o objetivo de analisar a viabilidade do uso da ferramenta de edição gênica Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated protein 9 (CRISPR-Cas9) no tratamento da infecção por HIV quando comparada as técnicas transcription activator-like effector nucleases (TALEN) e zinc-finger nucleases (ZFN). Para tanto foi realizada um estudo de revisão sistemática seguindo os critérios propostos no Preferred Report Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA), utilizando como principais descritores CRISPR-Cas9, TALEN, ZFN e HIV e as bases de dados EMBASE e PubMed tendo como resultados a demonstração da maior eficácia e especificidade da CRISPR-Cas9 em relação as demais técnicas. Por fim, sendo possível observar que mesmo com a superioridade da CRISPR-Cas9, ainda existem limitações em seu uso como a alta taxa de mutação viral, tornando necessário mais estudos sobre o tema para que possa ser desenvolvida uma terapia gênica contra o HIV mais eficaz e segura para as pessoas acometidas.

Palavras-chave: CRISPR-Cas9. ZFN. TALEN. HIV. Eficácia.

ABSTRACT

It is possible to observe a decrease in mortality and the number of new HIV infections over the years, but the prevalence rate of the affected population has increased, demonstrating that treatment has limitations in terms of achieving a definitive cure for the infection. Therefore, new treatment options are necessary to achieve an absolute cure, and gene therapy is a promising area for this purpose. This study aims to analyze the feasibility of using Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated protein 9 (CRISPR-Cas9) gene editing tool in HIV infection treatment, compared to transcription activator-like effector nucleases (TALEN) and zinc-finger nucleases (ZFN) techniques. A systematic review was conducted according to the Preferred Report Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) criteria, using CRISPR-Cas9, TALEN, ZFN, and HIV as the main descriptors in EMBASE and PubMed databases. The results demonstrate the greater efficacy and specificity of CRISPR-Cas9 compared to other techniques. However, despite the superiority of CRISPR-Cas9, there are still limitations in its use, such as the high viral mutation rate, requiring further studies to develop a more effective and safe gene therapy for people affected by HIV.

Keywords: CRISPR-Cas9. ZFN. TALEN. HIV. Effectiveness.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	8
2.1 Geral	8
2.2 Específicos	8
3 REVISÃO DE LITERATURA	9
4 METODOLOGIA	14
4.1 Desenho do estudo	14
4.2 Fontes de informação e estratégia de busca	14
4.3 Seleção e extração dos dados	14
4.4 Critérios de inclusão	15
4.5 Critérios de exclusão	15
4.6 Avaliação da qualidade metodológica e risco de viés	15
4.7 Variáveis	15
4.8 Análise de dados	15
4.9 Considerações éticas	15
5 RESULTADOS	16
5.1 Identificação e seleção dos estudos	16
5.2 Avaliação do risco de viés	17
5.3 Eficácia da técnica de terapia gênica utilizada	17
5.3.1 CRISPR-Cas9	17
5.3.2 ZFN	19
5.3.3 TALEN	20
5.4 Especificidade da técnica de terapia gênica	21
5.4.1 CRISPR-Cas9	21
5.4.2 ZFN	21
5.4.3 TALEN	21
6 DISCUSSÃO	23
7 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27

1. INTRODUÇÃO

Comparado com as estimativas de 2010, a incidência de HIV em 2019 caiu 23% e a mortalidade em 37%. Porém, mesmo com a diminuição de incidência e mortalidade, a taxa de prevalência da infecção pelo HIV aumentou nesse período em 24%¹, demonstrando que mesmo com melhoras na área de saúde quando se trata da prevenção e do tratamento utilizando a terapia antirretroviral (TARV), se mostra necessária um avanço nos tratamentos que busquem eliminar até mesmo a carga viral latente do paciente.

Além disso, no que diz respeito a TARV, é possível notar que a estimativa de vida aumentou drasticamente entre os pacientes portadores de HIV, porém essas milhões de pessoas agora estão destinadas a passar por décadas de tratamento médico crônico e viver com todo o estigma que existe sendo portador desse vírus. Dessa forma, revela-se uma necessidade de uma “cura funcional” que possa de fato ser uma ferramenta transformadora na vida desses milhões de indivíduos².

Em relação a terapia gênica, existe uma discussão para um mundo de possibilidades, como por exemplo curar doenças genéticas ou até mesmo infecções que até então aparentam ser incuráveis como a infecção pelo HIV. Sabe-se que já se possui algumas ferramentas de edição gênica como é o caso da TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*) e a ZFN (*zinc-finger nucleases*), porém com suas limitações³.

Em busca de novas ferramentas de edição gênica com alvos terapêuticos em humanos, e do avanço das diversas áreas da ciência, principalmente na medicina, biomedicina e biologia foi descoberta uma técnica, chamada CRISPR-Cas9 (*clustered regulatory interspaced short palindromic repeats associated protein 9*) que tem o potencial de ser uma importante tecnologia na área de pesquisa de edição material genético.

A ZFN é uma técnica constituída por fusões do domínio de clivagem do DNA não específico originado da endonuclease de restrição FokI com proteínas de dedo de zinco, a TALEN por sua vez se baseia em fusões do domínio de clivagem FokI com o domínio de ligação do DNA derivado das proteínas TAL. Por fim, a CRISPR-Cas é um locus que contém múltiplas pequenas sequências e provém imunidade adquirida para

bactéria e archaea⁴. O sistema CRISPR depende de uma sequência repetitiva derivada de plasmídeos conjugados juntamente com a enzima de clivagem Cas9⁵.

Em relação ao estado da arte sobre o uso das técnicas de edição gênica para o tratamento da infecção por HIV, podemos observar que o conteúdo é escasso. A técnica CRISPR-Cas9 recebeu um Nobel de Química em 2020, revelando ser uma técnica revolucionária quando comparada as demais como a ZFN e a TALEN.

Existem algumas propostas de como poderá ser alcançada a cura da infecção por HIV através dessa técnica como por exemplo: a estratégia de *shock and kill* que seria reativar a infecção latente viral para o sistema imune conseguir erradicar o vírus, bloqueio dos correceptores CCR5 ou CXCR4 para impedir a entrada do vírus na célula alvo, eliminar diretamente os provirus de HIV-1 através da edição genica ou a reativação de fatores de restrição da célula hospedeira⁵.

Há algumas vantagens da CRISPR-Cas9 em relação as outras técnicas como o fato de a CRISPR-Cas9 apresentar um custo menor e menor tempo para construção quando comparada a TALEN⁵, ou por exemplo o fato de a CRISPR apresentar o componente sgRNA que se revela facilmente “programável” e pode se direcionar a múltiplos locais do DNA quando expressadas simultaneamente com a mesma Cas9⁶.

No entanto, embora apresente muitos pontos fortes, a CRISPR-Cas9 também possui suas limitações como por exemplo as possíveis mutações fora do alvo⁷. Dessa forma, mais estudos em relação a essa nova tecnologia se revelam necessários para avaliar sua eficácia e segurança.

Diante o exposto, em busca de elucidar quais as vantagens do uso da terapia gênica com a ferramenta CRISPR-Cas9, em relação ao uso da ZFN e da TALEN, para o tratamento da infecção pelo HIV, será realizado esse estudo de revisão sistemática da literatura.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar a viabilidade do uso da ferramenta de edição gênica CRISPR-Cas9 no tratamento da infecção por HIV quando comparada as técnicas TALEN e ZFN.

2.2 Específicos

- Verificar os tipos celulares em que houve maior eficácia do uso das técnicas de terapia gênica no tratamento contra a infecção por HIV.
- Discutir a especificidade da CRISPR-Cas9 com a sequência alvo comparando com as metodologias TALEN e ZFN e suas possíveis consequências.
- Avaliar a eficácia do tratamento utilizando a CRISPR-Cas9 contra a infecção por HIV em comparação ao uso das técnicas ZFN e TALEN.
- Averiguar as limitações até então descritas da CRISPR-Cas9 para a terapia gênica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), é um retrovírus de RNA, ou seja, para que possa disseminar seu RNA, é preciso o uso da enzima transcriptase reversa. Além disso é o agente etiológico causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Apresenta um período de incubação que pode se estender por até 11 anos antes do aparecimento dos sinais e sintomas da AIDS⁸.

Tanto o HIV-1 quanto o HIV-2 são resultado de múltiplas transmissões entre espécies de Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) infectando naturalmente os primatas africanos. Algumas dessas transferências resultou em vírus que pudessem infectar humanos até certa extensão, porém em um evento de transferência envolvendo os SIVs ocorreu em chimpanzés no sudeste do país Camarões, originando o primeiro HIV-1.⁹

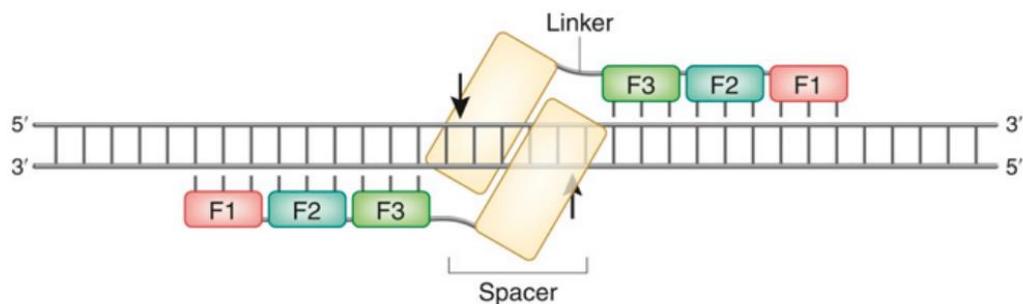
O HIV tem sua porta de acesso ao material intracelular dos linfócitos T através da sua ligação com os receptores CD4, com isso, o vírus insere seu material genético dentro da célula, tornando assim possível a sua replicação e disseminação pelo organismo. O sistema imune responde a essa condição clínica pela produção de linfócitos T CD8+ que por sua vez irão destruir os linfócitos T CD4+ auxiliares infectados, reduzindo o número de auxiliares no organismo, gerando assim uma imunodeficiência no indivíduo infectado⁸.

O HIV é disseminado principalmente por sangue ou por fluidos corporais, sendo assim indivíduos podem se infectar de tal agente através do contato sexual, transfusão sanguínea, compartilhamento de agulhas ou através da via vertical, da mãe para o filho através do leite materno¹⁰.

Como forma para combater a imunodeficiência causada pelo vírus da AIDS, foi criada a terapia antirretroviral (TAR). Os modelos mais modernos da terapia fazem o uso de drogas que tem como alvo as enzimas virais como a transcriptase reversa e a integrase viral. Porém com o uso dessa terapia, a cura definitiva da infecção do HIV ainda se encontra impossível, uma vez que a terapia não atinge os reservatórios virais celulares, permitindo que a infecção se dissemine tempos após a carga viral ter diminuído com o uso da TAR caso o paciente gere uma interrupção no tratamento¹¹.

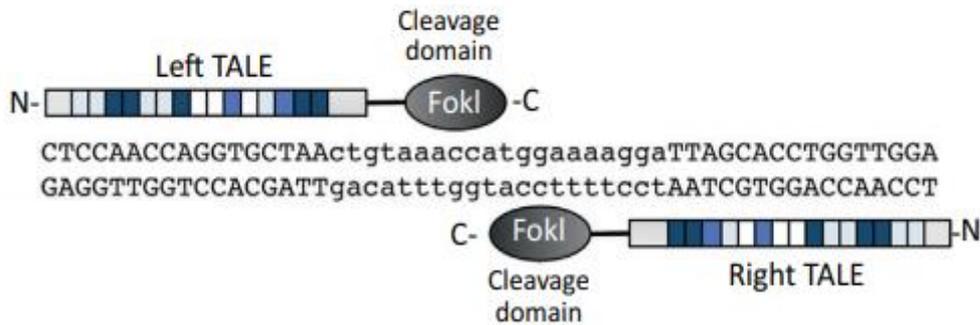
Dessa forma, com o objetivo de atingir a cura definitiva, a busca na área de terapia gênica aumentou bastante, fazendo-se o uso de três técnicas, sendo elas: Zinc-Finger Nucleases (ZFN), Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALEN) e Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR-Cas9).

Em relação a técnica ZFN, podemos observar que se trata de uma ferramenta gênica constituída por um par de domínios de clivagem FokI ligados a proteínas de dedo de zinco, sendo capaz de realizar uma quebra no material genético, abrindo assim um leque de possibilidades para a terapia gênica. As primeiras Zinc-Finger Nucleases foram criadas como endonucleases de restrição quiméricas e apresentaram atividade *in vitro*, enquanto o primeiro sucesso com o uso dessa técnica ocorreu em testes em espécimes do gênero *Drosophila*. As duas unidades do par apresentaram uma mutagênese direcionada e a substituição com o material genético de interesse foi demonstrado em células somáticas e em células germinais¹².



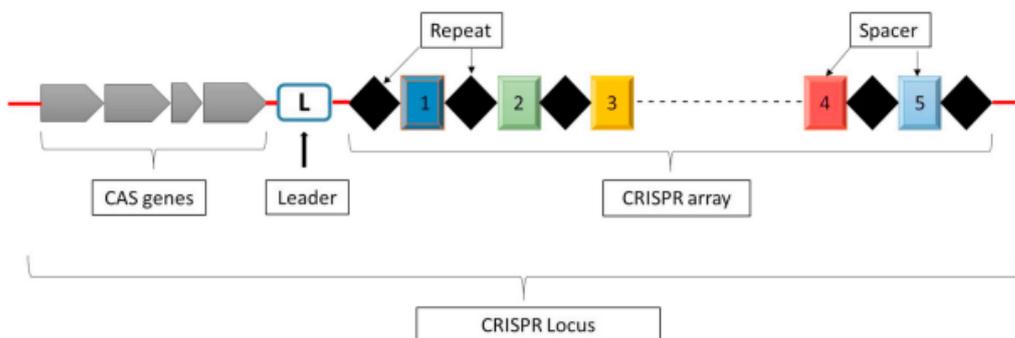
Fonte: Carroll , et al ¹²

Por outro lado, quando se trata da TALEN, é possível notar que se trata de uma estrutura similar a que observamos na ZFN, porém ao invés de possuir proteínas de dedo de zinco ligadas a domínios de clivagem FokI, na TALEN esses domínios estão ligados a proteínas TALE. Essas proteínas são naturalmente encontradas em bactérias do gênero *Xanthomonas* que são patológicas a plantas e contem domínios de ligação ao DNA composto por domínios de repetição de 33-35 aminoácidos os quais tem a capacidade individual de reconhecer um único par de bases¹³.



Fonte: Gaj, et al.¹³

Ademais, temos a ferramenta gênica CRISPR-Cas9 que é a mais recente entre as três citadas, a CRISPR foi descoberta em 1987, quando se notou a presença de uma repetição de 29 nucleotídeos na bactéria *Escherichia coli* que era interrompida por uma sequência sem repetição sendo ela observada novamente em vários outros estudos em bactérias. Em 2013, foi reportado que da mesma forma que os eucariotos, os procaríotos também possuem um sistema imune adaptativo e o sistema CRISPR é uma parte integral dele. No ano de 2008 a atividade desse sistema em alvos gênicos estava estabelecida, foi observado que os *spacers* (Sequência de Nucleotídeos Sem Repetição) podem ser transcritos em RNA CRISPR maduros que podem agir como pequenos RNA guias, permitindo que a Cas9, agora guiada, possa clivar a região alvo do DNA gerando em uma quebra da fita dupla do material genético¹⁴.



Fonte: Gupta, et al.¹⁴

Dessa forma, com o uso dessas três técnicas, os estudos de terapia gênica nas diversas áreas estão sendo realizados, inclusive na tentativa de cura completa da infecção pelo HIV.

A primeira estratégia para erradicar os reservatórios de HIV latentes nas linhagens celulares infectadas consiste na reativação do vírus dormente para que assim a terapia antirretroviral possa erradicá-los, estratégia essa conhecida como “shock and kill”. Porém essa reativação possui alguns riscos, sendo que até então outro estudo demonstrou que o uso da histona deacetilase (HDAC) inibidor suberoilânilda ácido hidroxâmico (Vorinostat) resultou apenas em uma ativação parcial desses vírus latentes, fora isso há preocupação sobre o risco de indução não específica do gene-alvo sendo possível gerar diversos efeitos colaterais.¹⁵ No entanto, há conquistas na ativação do gene específico com o uso da CRISPR-Cas9 para a reativação do HIV latente⁶.

Junto a isso, existem técnicas como a eliminação direta do provírus de HIV da célula hospedeira, sendo que a CRISPR-Cas9 demonstrou sucesso na inibição da transcrição e replicação do provírus do HIV-1, e ainda demonstrou que tem a capacidade de eliminar genes virais de cromossomos de linhagens celulares infectadas. O uso da CRISPR-Cas9 para bloquear os correceptores CCR5 e CXCR4 ao invés do receptor CD4 tendo em vista que é um receptor crítico para o funcionamento do sistema imune, não permitindo dessa forma a entrada do vírus na célula. Por fim ainda é possível como forma de combater a infecção, a reativação de proteínas como a SERINC5 que irá inibir a fusão do material genético do vírus com o da célula hospedeira, HUSH que tem como função inibir a transcrição viral e NONO que irá interagir diretamente com as proteínas do capsídeo, auxiliam como fatores de restrição para a replicação viral do HIV-1⁵.

É de extrema importância avaliar as vantagens e desvantagens das diversas técnicas de terapia gênica, uma vez que o sucesso do estudo pode depender da maquinaria molecular utilizada. Por exemplo, podemos inferir que o tamanho maior da TALEN comparada a outras técnicas é uma desvantagem uma vez que torna mais difícil que ela seja compartimentada em vetores como o adenovírus, sendo que as ZFN não apresentam nenhuma dificuldade em relação a isso, porém a técnica ZFN revela que ainda precisa evoluir no quesito de diminuir a toxicidade causada pelas mutações que ocorrem fora do gene alvo uma vez que tais regiões se assemelham muito a ele¹³.

Por fim, temos a CRISPR-Cas9 que apresenta como alguma de suas vantagens sua produção ser mais financeiramente acessível devido a seu baixo custo comparado com as outras técnicas e como uma de suas desvantagens, apresenta a mesma dificuldade da ZFN em relação a toxicidade, porém em menor escala¹⁴.

Diante o exposto, observando as diversas estratégias possíveis com a terapia gênica para a obtenção de cura da infecção, se mostra necessário avaliar qual das três técnicas citadas se revela mais eficiente em relação as outras, avaliando diversos fatores como custo financeiro, tempo de montagem, risco de mutação fora do gene alvo, versatilidade da maquinaria molecular, entre outros.

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de uma revisão sistemática da literatura, seguindo os critérios do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews (PRISMA)*^{16,17}.

4.2 Fontes de informação e estratégia de busca

Foram analisados tratamentos utilizando as técnicas ZFN, TALEN e CRISPR-Cas9 para a diminuição da carga viral em pacientes infectados pelo HIV. A coleta de dados foi realizada nas bases eletrônicas MEDLINE/PubMed, e EMBASE através dos descritores (“CRISPR-Cas9” OR “CRISPR Associated Protein 9”) AND (“Human Immunodeficiency Virus” OR “Immunodeficiency Virus, Human” OR “Immunodeficiency Viruses, Human” OR “HIV”) AND (“ZFN” OR “Zinc-finger Nucleases”) AND (“TALEN” OR “Transcription activator-like effector nucleases”) pertencentes ao Medical Subject Headings – MeSH e na base de dados EMBASE utilizando os termos 'CRISPR-Cas9' OR 'CRISPR Associated Protein 9' AND 'Human Immunodeficiency Virus' OR 'Immunodeficiency Virus, Human' OR 'Immunodeficiency Viruses, Human' OR 'HIV' AND 'ZFN' OR 'Zinc-finger Nucleases' AND 'TALEN' OR 'Transcription activator-like effector nucleases'

4.3 Seleção e extração dos dados

Um pesquisador realizou as buscas nos bancos de dados propostos e importou os artigos encontrados para a plataforma Rayyan – Intelligent Systematic Review¹⁸, em que dois pesquisadores realizaram a seleção dos artigos elegíveis de forma independente. Em caso de divergência, um terceiro pesquisador poderia ser solicitado.

4.4 Critérios de inclusão

1. Estudos publicados em inglês, português e/ou espanhol
2. Uso das técnicas ZFN, TALEN e/ou CRISPR-Cas9 no tratamento da infecção pelo HIV
3. Publicações feitas entre os anos de 2011 e 2021

4.5 Critérios de exclusão

1. Utilização de outras técnicas para o tratamento
2. O uso das técnicas para o tratamento de outra enfermidade
3. Artigos de revisão sistemática e metanálise

4.6 Avaliação da qualidade metodológica e risco de viés

A escala *Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively* (MICRO)¹⁹ foi utilizada de forma independente por dois pesquisadores para avaliar o risco de viés dos estudos incluídos. Em caso de divergência, um terceiro pesquisador foi solicitado.

4.7 Variáveis

1. Variáveis preditoras: Edição fora da sequência alvo, eficácia das técnicas de edição gênica na célula alvo e edição dos correceptores CCR5 e CXCR4
2. Variáveis de desfecho: Eliminação dos reservatórios latentes de HIV e a supressão da expressão do HIV

4.8 Análise de dados

As variáveis analisadas foram: edição fora da sequência alvo para avaliar a toxicidade da técnica observada, eficácia da CRISPR-Cas9 na célula alvo, edição com sucesso dos correceptores CCR5 e CXCR4, a eliminação dos reservatórios latentes de HIV e por fim a supressão da expressão do HIV. Esses tópicos foram avaliados a partir das medidas apresentadas nos ensaios clínicos randomizados e apresentados de forma descritiva.

4.9 Considerações éticas

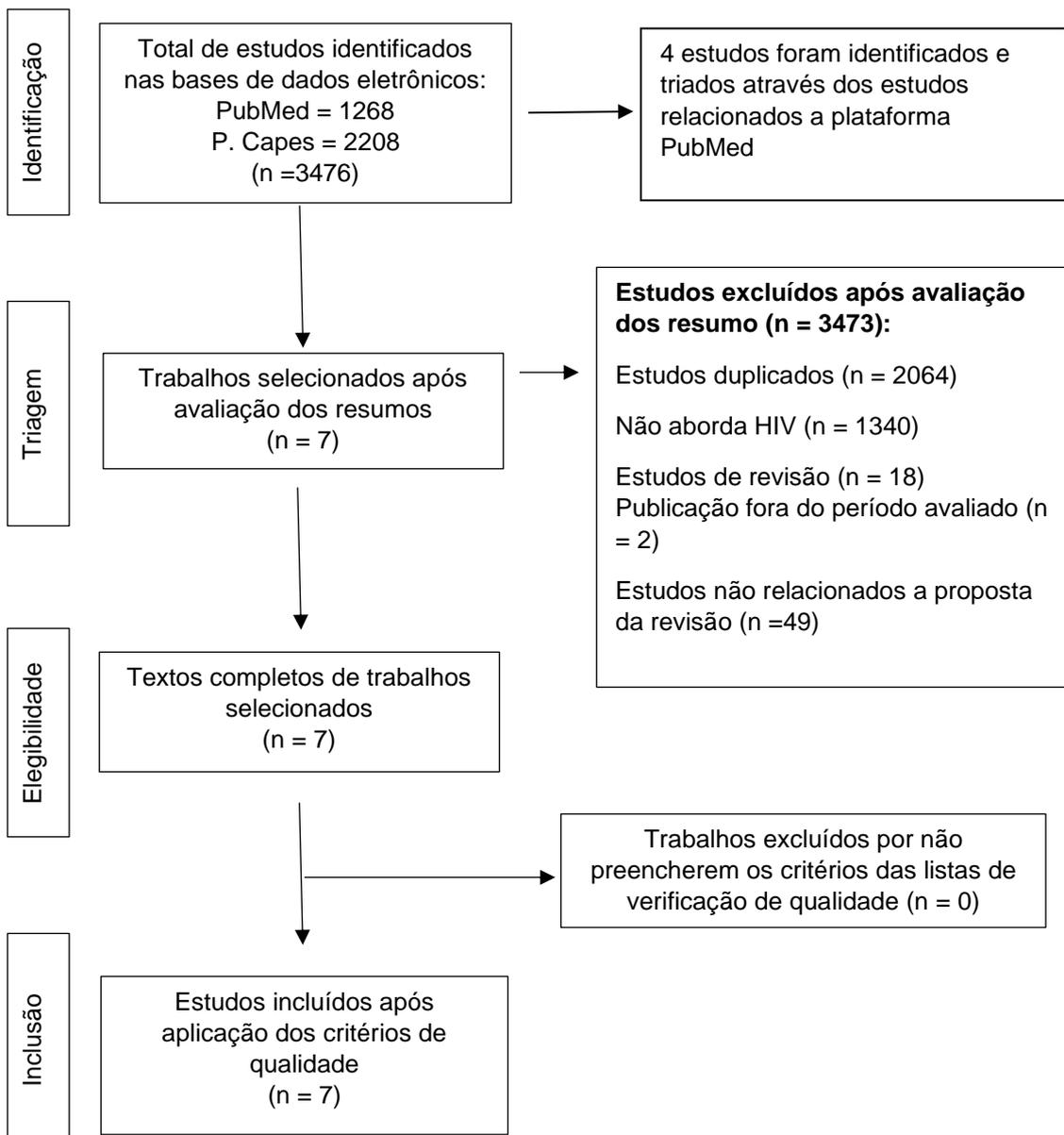
Não há conflito de interesses.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação e seleção dos estudos

Foi utilizado o aplicativo Rayyan¹⁸ como ferramenta para identificação e triagem dos estudos desejados. Foram encontrados através da estratégia de busca 3473 estudos compatíveis, sendo 2064 duplicações, restando 1411, que desses 1340 não aborda HIV como temática, restando 71 artigos, excluindo 18 por serem estudos de revisão e mais dois por conta das publicações terem sido fora do período avaliado, restaram 52. Realizando a leitura do abstract foram eliminados 49 estudos por não estarem relacionados com a proposta dessa revisão.

Figura 1 - Fluxograma do processo de seleção dos estudos elegíveis



5.2 Avaliação do risco de viés

A análise do risco foi realizada na escala *Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively* (MICRO)¹⁹, com o objetivo de verificar o risco de Viés dos estudos analisados tendo em vista que todos se tratam de uma investigação microbiológica, sendo possível observar o risco dos estudos no quadro 1 (Apêndice 1). Sendo o limiar de corte estabelecido pelos pesquisadores como sendo 7 de 9 características aplicáveis do estudo.

5.3 Eficácia da técnica de terapia gênica utilizada

5.3.1 CRISPR-Cas9

O primeiro estudo analisado foi um estudo chinês de Wang *et al*, realizado em 2014, no qual houve a tentativa de diminuir a expressão gênica em células TCD4 primárias do correceptor CCR5 utilizado pelo vírus HIV, com o uso da CRISPR-Cas9, resultando em uma linhagem celular onde 42.5% tiveram a interrupção da expressão genica, levando a uma ausência de CCR5 na superfície celular. Após esse resultado, avaliaram a vantagem em relação a sobrevivência dessa linhagem celular quando comparado a um grupo controle, notaram que embora no início existia uma razão de 1 para 9 do grupo tratado para o grupo controle, após 18 dias essa razão se invertia, se tornando de 9 para 1²⁰.

O segundo estudo sobre a CRISPR-Cas9 foi também um estudo chinês de autoria Wang *et al*, onde foi realizado o experimento em vários tipos celulares diferentes, sendo realizado em células GHOST, Jurkat, HeLa e TCD4 primárias. Em células GHOST-X4 (células GHOST programadas para haver a expressão do correceptor CXCR4 na superfície celular), ocorreu uma interrupção da expressão do gene da CXCR4 em 64,7 % e 87% das células alvo pelos dois dos modelos mais eficazes entre os demais construídos pelos pesquisadores, sendo eles o SaCas9/sgRNA #8 e o #9 respectivamente, resultando nenhuma detecção pela marcação fluorescente do CXCR4 nas células tratadas enquanto não houve mudança no grupo controle. Após interrupção da expressão genica do CXCR4, investigaram se a ausência desse correceptor gerava resistência ao HIV para a célula, para tal, utilizaram para analisar a concentração do p24 viral nas células em cultura, sendo possível observar que as proteínas virais apresentaram concentrações significativamente menores quando comparadas com as células controle. As células HeLa apresentaram resultados

semelhantes. Em relação as células Jurkat, houve uma diminuição de CXCR4 em 62.2% e 73.6% das células, dependendo novamente do modelo utilizado no caso, sendo eles os mesmos SaCas9/sgRNA #8 e o #9 respectivamente, e revelando também uma diferença na concentração de p24 viral, sendo ela significativamente menor nas células tratadas quando comparada ao grupo controle. Por fim realizaram testes com células TCD4 primárias, sendo relatado que não obtiveram êxito quando associavam a CRISPR-Cas9 com vetores lentivirais, substituindo-os para vetores AAV, revelando uma diminuição da expressão de CXCR4 na superfície celular de 21.1% e 14.1% das células alvo dependendo da ferramenta específica utilizada (no caso a SaCas9/sgRNA #8 e #9 respectivamente), enquanto que o grupo controle apresentou uma diminuição de 8,07%, resultando também em uma concentração menor de p24 viral nas células tratadas, principalmente quando tratadas com o modelo SaCas9/sgRNA #8, além disso detectaram também que a ausência de CXCR4 não afetou o crescimento celular²¹.

Por fim, o último estudo que abordou sobre a CRISPR-Cas9, foi também chinês, realizado por Xiao *et al*, utilizando diversos tipos celulares diferentes, sendo eles células TZM-bl, Jurkat, TCD4 primários e por fim camundongos NSG. Os pesquisadores detectaram a interrupção da expressão gênica do CCR5 em células TZM-bl, resultando em uma diminuição da expressão genica de 10.6% e 21.5% das células alvo, pelos modelos com maior eficácia projetados pelos pesquisadores sendo eles respectivamente sgRNA-6# e sgRNA-8#. Após esse passo colocaram as células em um ambiente propício para a infecção pelo HIV e notaram com um relatório de uma técnica de luciferase, que os níveis de infecção pelo vírus em células tratadas foram significativamente menores quando comparadas a células controle. Porém decidiram utilizar um vetor lentiviral ao invés do vetor AAV que já estava sendo utilizado, demonstrando uma eficácia de redução do CCR5 na superfície celular em 45,5% e 58,8% das células tratadas com sgRNA-6# e sgRNA-8# respectivamente, revelando também que tentaram o uso do vetor AAV para o experimento com células Jurkat, não conseguindo êxito e realizando a troca para um vetor lentiviral, notando assim uma interrupção da expressão genica significativa nas células e através da observação do p24 viral, identificaram que células tratadas se tornaram mais resistentes quando comparadas com o grupo controle. Em relação ao experimento quando realizado nas células TCD4 primárias, notaram que a expressão do gene do

CCR5 era menor quando comparada as células controle, e observaram também uma diminuição do p24 viral nas células tratadas. Por fim, os pesquisadores utilizaram camundongos NSG, os injetando o modelo mais eficiente do estudo, sendo o sgRNA-8#, e analisaram que durante o dia 1 após o começo do experimento, o grupo controle apresentava uma maior quantidade de células, no 14^o dia, as células tratadas apresentavam uma quantidade 10 vezes maior que o grupo controle, no dia 28, no entanto não houve diferença na contabilização, ao dia 45 a contagem das células tratadas foi 8 vezes maior que o grupo controle. Como esperado pelos pesquisadores, os camundongos apresentaram a GVHD, com dermatite e perda de pelo. Ademais, foram detectados cerca de 4% de células CD4 no baço dos ratos tratados e nenhuma célula no grupo controle após a eutanásia²².

5.3.2 ZFN

O primeiro estudo analisado foi um estudo americano, realizado por Wilen *et al*, nele a ferramenta de edição gênica utilizada foram as zinc-finger nucleases (ZFN), e o alvo do experimento foi o correceptor CXCR4 em células TCD4 *in vitro*, transplantadas em camundongos NSG e em macacos rhesus. Eles detectaram que em uma taxa máxima de eficácia com limitado impacto no crescimento celular, ocorreu interrupção da expressão do gene da CXCR4 em 38% das células tratadas, sendo que a lesão mais comum que aconteceu ao gene do CXCR4 foi a deleção 18bp (CXCR4D18), que resultava na expressão do receptor porém o incapacitava de trafegar até a superfície celular, diferentemente do grupo controle que possuía os correceptores preservados em sua superfície, ainda detectaram que as células tratadas com R5-ZFN, ou seja com o alvo sendo o correceptor CCR5, e as células controle apresentaram uma taxa de mortalidade maior quando comparadas as células tratadas com X4-ZFN. Quando realizado testes em ratos NSG, revelou-se que células com a interrupção do alelo continuaram a crescer normalmente, porém os ratos tratados com R5 e X4-ZFN tiveram GVHD resultando em dermatite e queda de pelo. A contagem de CD4 foi diminuindo em todos os grupos sendo eles os tratados com X4-ZFN, R5-ZFN e grupo controle, porém com a taxa mais devagar no grupo tratado com X4-ZFN, mas no dia 33 após a infecção o número era o mesmo em todos os grupos, revelando que o tratamento conferiu uma proteção somente transitória. Por fim citaram brevemente

sobre a interrupção de 19.6% dos genes que expressam CCR5 e 14% dos genes que expressam CXCR4, sem se aprofundar muito²³.

Um segundo estudo é também americano, de autoria DiGiusto *et al*, e utiliza células tronco hematopoiéticas como células alvo. As células tronco hematopoiéticas após 7 dias em cultura, foi possível observar de 40 a 60% de interrupção da expressão gênica do CCR5, porém com uma pequena, todavia significativa redução na viabilidade das células tratadas. Os pesquisadores tentaram utilizar para aumentar a eficácia a eletroporação que apresentou melhores resultados, observando interrupção de 72.9% da expressão genica de CCR5 em colônias que receberam a dosagem de 150 microgramas/mililitros. No entanto, quando os autores fizeram o experimento *in vivo* através dos camundongos NSG, não houve diferença entre o grupo tratado e o grupo controle²⁴.

5.3.3 TALEN

O primeiro estudo analisado é chinês, sendo os responsáveis Shi *et al*. Os pesquisadores utilizaram ZFN e TALEN tendo como alvo células GHOST e células TCD4 primarias. Quando avaliaram a máxima eficiência de interrupção do gene em células GHOST que expressa o correceptor CCR5 em relação a ZFN, observaram que a maior taxa de eficiência foi de 21.8% podendo variar tanto para menos quanto para mais 1.4%, enquanto em relação ao uso da TALEN, notaram que a maior taxa de eficiência foi de 38.1% podendo variar 0.1%, enquanto a taxa de eficiência da ferramenta gênica controle (C5-NC) foi cerca de 13.4% podendo variar 0.1%. Os pesquisadores notaram que a interrupção do gene que expressa a CCR5 tornou as 7 linhagens celulares observadas em resistentes aos dois pseudo vírus (SF162 e JRFL), utilizados no experimento uma vez que apresentam proteínas do envelope do HIV em seu envelope. Em relação as células TCD4 primarias, detectaram que a atividade das CCR5-ZFN em uma dose de 3 microgramas foi cerca de 17.6% enquanto a mesma dose das CCR5-TALEN-515 (foi a escolhida pois apresentavam menos citotoxicidade que as outras CCR5-TALEN), foi cerca de 16.5%²⁵.

Por fim, o segundo estudo é também chinês, com a autoria de Ru *et al*, no qual os pesquisadores utilizaram células HeLa e células tronco pluripotentes induzidas (iPSC). Nas células HeLa, a TAT-TALEN demonstrou uma eficácia de 3% de

modificação do gene alvo, tendo essa eficácia subindo para 16% quando o ambiente estava a 30°C. Para explorar mais a eficácia, ao invés das células HeLa, os autores utilizaram iPSCs em condições de hipotermia demonstrando uma interrupção de cerca de 5%²⁶.

5.4 Especificidade da técnica de terapia gênica utilizada

5.4.1 CRISPR-Cas9

No estudo conduzido por Wang *et al*, as mutações identificadas foram em duas dos três modelos de CRISPR-Cas9 utilizado, sendo que um modelo sofreu 3 mutações e o outro sofreu 9 (CR2 e CR3 respectivamente), porém quando avaliaram o potencial dessas mudanças gerarem mutações fora do sítio alvo, não detectaram nenhuma mutação na região²⁰.

De acordo com o estudo conduzido por Wang *et al*, não houve mutações fora do sítio alvo²¹.

Por fim, segundo o estudo de Xiao *et al*, revelou que as células Jurkat tratadas com a ferramenta gênica também não apresentaram nenhuma mutação fora do sítio alvo²².

5.4.2 ZFN

De acordo com Wilen *et al*, em seu estudo afirma que dentre as 15 regiões fora do sítio alvo com maior probabilidade de surgir mutação indesejada pelo uso da ferramenta gênica, surgiram duas mutações fora do sítio alvo²³.

No estudo realizado por DiGiusto *et al*, notou-se que houve mutações fora do sítio alvo, mais especificamente nas regiões KRR1 em cerca de 15 a 20% das células alvo, CCR2 em cerca de 20% dos alvos, FBXL11 e ZCCH14 com cerca de 5%²⁴.

5.4.3 TALEN

Segundo o estudo de Shi *et al*, CCR5-ZFN teve atividade fora do sítio alvo de 8.4% no genoma do CCR2, sendo que, a atividade fora do sítio ativo foi mais detectada a

medida que a dose do tratamento foi aumentando de 5, 10, e 20 microgramas por 10^6 células sendo estimado em 13.1%, 11.4%, e 41.8% respectivamente²⁵.

Por fim, o trabalho de Ru *et al*, refere que possuiu mutações fora do sítio alvo e que a citotoxicidade foi dose dependente, então quando maior a quantidade de TAT TALEN para o tratamento, maior a quantidade de efeitos colaterais e mutações fora do sítio alvo²⁶.

6. DISCUSSÃO

Quando há referência às vantagens de uma terapia gênica perante a outra podemos avaliar alguns fatores sendo a eficácia, especificidade e efeitos colaterais entre elas.

Sobre a eficácia, através dos estudos propostos, se observa uma maior eficiência da ferramenta CRISPR-Cas9, tendo em vista que ao ser feita a relação entre os tipos celulares utilizados em cada estudo, é possível observar uma maior taxa de interrupção do gene, seja ele o que expressa os receptores CXCR4 ou CCR5, nos estudos envolvendo essa ferramenta de edição gênica. Revela-se que ao realizar os experimentos em células TCD4 primárias, há uma taxa de interrupção dos genes do receptor CXCR4 através do uso da ferramenta ZFN de cerca de 38%²³ e uma taxa de 17,6% no gene do receptor CCR5, enquanto ao analisar o uso da ferramenta TALEN, se observar uma taxa de interrupção do gene de CCR5 de 16,5%²⁵, juntamente a um estudo que demonstrou uma interrupção de 50% do gene do receptor CCR5 através do uso da TALEN em células T humanas primárias, e concomitantemente a isso, sendo importante observar que essas células tratadas se tornaram resistentes a infecção pelo R5-HIV *in vitro*²⁷.

Por fim ao observarmos os estudos envolvendo o uso da CRISPR-Cas9, revela-se uma eficácia de 42,5% no receptor CCR5, além de uma sobrevivência das células tratadas quando comparadas as células controle com uma razão de 9 para 1 após 18 dias do começo do estudo²⁰. Além disso outros estudos demonstraram que a CRISPR-Cas9 tem potencial para inibir a replicação do HIV, porém revelaram que o vírus frequentemente escapava dessa inibição devido a suas mutações adquiridas²⁸.

Ainda sobre tipos celulares semelhantes é possível inferir a diferença existente quando as técnicas foram utilizadas em células GHOST e HeLa, tendo em vista que no primeiro tipo celular citado, a maior taxa de eficiência da ZFN foi cerca de 22% e da TALEN foi cerca de 38% em relação ao gene expressor do CCR5²⁵ e as células tratadas com CRISPR-Cas9 obtiveram uma taxa de interrupção do gene CXCR4 de 64,7% e 87% pelos dois modelos mais eficazes do estudo²¹, e nas células HeLa, foi possível observar que ao utilizar a terapia a base de TALEN,

uma eficácia somente de 3%, aumentando para 16% somente em temperatura de 30°C²⁶, enquanto que quando observado o tratamento desse tipo celular utilizando a CRISPR-Cas9, revelou-se uma taxa de interrupção semelhante quando utilizada em células GHOST²¹.

No que se refere ainda a comparação entre os estudos observou-se que os experimentos que utilizaram camundongos NSG demonstraram a eficácia do uso da CRISPR-Cas9 tendo em vista que os animais apresentaram uma taxa oito vezes maior de célula tratadas quando comparadas as células controle ao fim do estudo²², enquanto ao usar ZFN, apresentou somente uma proteção temporária²³.

Os estudos, no entanto, possuíram algumas divergências em relação a quais tipos celulares a serem utilizados nos experimentos, como foi o caso das células tronco hematopoiéticas tratadas com terapia utilizando ZFN, demonstrando uma ineficácia do tratamento²⁴, ou como foram os casos das células TZM-bl e células Jurkat que somente demonstraram grande eficácia no tratamento utilizando a CRISPR-Cas9 quando associada a vetores lentivirais²². Em estudo realizado com pacientes, foi demonstrado que a coorte tratada com ZFN apresentou uma queda 10 vezes mais rápida do DNA viral em relação ao grupo controle, porém gerou reações cruzadas, preocupando os pesquisadores em relação a possibilidade de mutações fora do sítio alvo²⁹.

Concomitante a isso, é possível observar que *in vivo*, utilizando camundongos NSG, tanto o tratamento utilizando ZFN quanto CRISPR-Cas9 relataram efeitos colaterais como GVDH²³.

Além disso, existem outras estratégias para combater a infecção causada pelo HIV, como por exemplo a eliminação direta do próvirus existente no material genético da célula infectada ou a tática denominada de *Shock and Kill* que consiste em reativar propositalmente os reservatórios latentes do genoma viral para que assim a TARV possa eliminar o vírus em sua totalidade, como se foi observada em estudos envolvendo a CRISPR-Cas9⁵.

Desde o começo dos estudos com ferramentas de terapia gênica, uma das maiores preocupações sem dúvida é o risco de mutações fora do sítio alvo, tendo em vista que mutações por serem imprevisíveis podem gerar desde uma simples mutação silenciosa até mesmo uma que irá resultar em uma célula cancerosa.

Dentre os estudos analisados, observa-se que em somente um que fez uso da CRISPR-Cas9 houve a divulgação de mutação fora do sítio alvo, sendo que ela não apresenta nenhum potencial patológico para a célula²⁰, demonstrando uma maior segurança para um futuro paciente do uso dessa técnica, enquanto nos estudos envolvendo o uso das técnica ZFN, de 15 locais onde poderiam ocorrer mutações indesejadas, houveram 2 fora do sitio alvo²³ e cerca de 20% das células utilizadas em outro estudo obtiveram mutação fora do sitio alvo²⁴. Por fim, em relação ao uso da TALEN, os estudos demonstraram que quanto maior a quantidade utilizada da ferramenta para o tratamento, maior a taxa de mutações fora do sítio alvo, conseguindo chegar a cerca de 42% a medida que a dose foi aumentando até chegar em 20 microgramas²⁵, porém existem outros estudos afirmando que a ferramenta possui menor citotoxicidade quando comparada a ZFN³⁰.

Concomitantemente a isso, existem outras variáveis a serem também avaliadas, como por exemplo o tamanho de cada ferramenta gênica, sendo o da TALEN um fator limitante para alguns estudos tendo em vista que o seu grande tamanho restringe o uso de vetores de adenovírus, circunstância não encontrada quando analisa-se a CRISPR-Cas9 e ZFN¹³.

Por fim, quando se trata de um pilar importante para a sociedade atual, que é o custo-benefício do uso de cada ferramenta, pode-se observar que a CRISPR-Cas9 por ser uma ferramenta oriunda de um mecanismo mais simples, possui menor custo para sua produção^{14,31} e menor tempo de preparo para a construção da maquinaria celular³².

Esse estudo apresenta algumas limitações como por exemplo a baixa quantidade de ensaios clínicos realizados em seres humanos identificados nas bases de dados, assim não permitindo uma boa comparação entre as diferentes ferramentas, além disso os estudos no geral não relatam a variável relacionada ao custo demandado para a construção de cada ferramenta, limitando a discussão do fator econômico para o desenvolvimento da ciência.

7. CONCLUSÃO

Ante o exposto, foi possível verificar os tipos celulares em que houve maior eficácia do uso das técnicas de terapia gênica no tratamento contra a infecção por HIV sendo eles as células TCD4 primárias e as células GHOST. Junto a isso os estudos analisados revelaram que a CRISPR-Cas9 apresenta uma especificidade maior em comparação a TALEN e ZFN, gerando assim menos efeitos colaterais como a presença de mutações indesejadas.

Por fim, foi demonstrado também através dos estudos a maior eficácia da CRISPR-Cas9 em relação as demais ferramentas, juntamente com suas limitações como a ineficiência de impedir a mutação adquirida do vírus, demonstrando mais um obstáculo para a obtenção da cura pela infecção do HIV.

Espera-se que esse estudo possa aumentar o arcabouço teórico em relação ao uso das três ferramentas, permitindo futuros pesquisadores a se decidirem sobre qual utilizar em suas pesquisas e assim aumentar o desenvolvimento dessa área.

REFERÊNCIAS

1. de Cock KM, Jaffe HW, Curran JW. Reflections on 40 years of AIDS. Vol. 27, *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2021. p. 1553–60.
2. Margolis DM, Archin NM, Cohen MS, Eron JJ, Ferrari G, Garcia JV, et al. Curing HIV: Seeking to Target and Clear Persistent Infection. Vol. 181, *Cell*. Cell Press; 2020. p. 189–206.
3. Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, Krzowski L, Saluk-Bijak J, Bijak M. Various aspects of a gene editing system—crispr–cas9. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–20.
4. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Vol. 31, *Trends in Biotechnology*. 2013. p. 397–405.
5. Xiao Q, Guo D, Chen S. Application of CRISPR/Cas9-based gene editing in HIV-1/AIDS therapy. Vol. 9, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
6. Saayman S, Ali SA, Morris K V., Weinberg MS. The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. Vol. 15, *Expert Opinion on Biological Therapy*. Informa Healthcare; 2015. p. 819–30.
7. Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet*. 2014;23(R1).
8. Pawlina W, Ross M. *ROSS Histologia Texto e Atlas: Correlações com biologia celular e molecular*. 8th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA; 2021.
9. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011 Sep;1(1).
10. Yoshimura K. Current status of HIV/AIDS in the ART era. Vol. 23, *Journal of Infection and Chemotherapy*. Elsevier B.V.; 2017. p. 12–6.
11. Bandera A, Gori A, Clerici M, Sironi M. Phylogenies in ART: HIV reservoirs, HIV latency and drug resistance. Vol. 48, *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd; 2019. p. 24–32.
12. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2011 Aug;188(4):773–82.
13. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Vol. 31, *Trends in Biotechnology*. 2013. p. 397–405.
14. Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, Sen MK, Dey D, Dasgupta A, et al. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. Vol. 232, *Life Sciences*. Elsevier Inc.; 2019.
15. Archin NM, Liberty AL, Kashuba AD, Choudhary SK, Kuruc JD, Crooks AM, et al. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature*. 2012 Jul 26;487(7408):482–5.

16. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JP, et al. The PRISMA Statement for Reporting Systematic Reviews and Meta-Analyses of Studies That Evaluate Health Care Interventions: Explanation and Elaboration [Internet]. Available from: www.annals.org
17. Saenger ALF, Caldas CP, Motta LB. Cross-cultural adaptation of the PRISMA-7 instrument for use in Brazil: Evaluation of conceptual, item, and semantic equivalences. *Cad Saude Publica*. 2016;32(9).
18. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev*. 2016 Dec 5;5(1).
19. Turner P, Fox-Lewis A, Shrestha P, Dance DAB, Wangrangsimakul T, Cusack TP, et al. Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively (MICRO): A framework for the reporting and interpretation of clinical microbiology data. *BMC Med*. 2019 Mar 29;17(1).
20. Wang W, Ye C, Liu J, Zhang D, Kimata JT, Zhou P. CCR5 gene disruption via lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection. *PLoS One*. 2014 Dec 26;9(12).
21. Wang Q, Chen S, Xiao Q, Liu Z, Liu S, Hou P, et al. Genome modification of CXCR4 by *Staphylococcus aureus* Cas9 renders cells resistance to HIV-1 infection. *Retrovirology*. 2017 Nov 15;14(1).
22. Xiao Q, Chen S, Wang Q, Liu Z, Liu S, Deng H, et al. CCR5 editing by *Staphylococcus aureus* Cas9 in human primary CD4+ T cells and hematopoietic stem/progenitor cells promotes HIV-1 resistance and CD4+ T cell enrichment in humanized mice. *Retrovirology*. 2019 Jun 11;16(1).
23. Wilen CB, Wang J, Tilton JC, Miller JC, Kim KA, Rebar EJ, et al. Engineering HIV-resistant human CD4+ T cells with CXCR4-specific zinc-finger nucleases. *PLoS Pathog*. 2011 Apr;7(4).
24. DiGiusto DL, Cannon PM, Holmes MC, Li L, Rao A, Wang J, et al. Preclinical development and qualification of ZFN-mediated CCR5 disruption in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016 Mar 16;3:16067.
25. Shi B, Li J, Shi X, Jia W, Wen Y, Hu X, et al. TALEN-Mediated Knockout of CCR5 Confers Protection Against Infection of Human Immunodeficiency Virus [Internet]. 2016. Available from: <http://links.lww.com/QAI/A931>
26. Ru R, Yao Y, Yu S, Yin B, Xu W, Zhao S, et al. Targeted genome engineering in human induced pluripotent stem cells by penetrating TALENs [Internet]. 2013. Available from: <http://www.cellregenerationjournal.com/content/2/1/5>
27. Pernet O, Yadav SS, An DS. Stem cell-based therapies for HIV/AIDS. Vol. 103, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V.; 2016. p. 187–201.
28. Das AT, Binda CS, Berkhout B. Elimination of infectious HIV DNA by CRISPR–Cas9. Vol. 38, *Current Opinion in Virology*. Elsevier B.V.; 2019. p. 81–8.
29. Patel S, Jones RB, Nixon DF, Bollard CM. T-cell therapies for HIV: Preclinical successes and current clinical strategies. Vol. 18, *Cytotherapy*. Elsevier B.V.; 2016. p. 931–42.

30. Hütter G, Bodor J, Ledger S, Boyd M, Millington M, Tsie M, et al. CCR5 targeted cell therapy for hiv and prevention of viral escape. *Viruses*. 2015 Jul 27;7(8):4186–203.
31. Kwarteng A, Ahuno ST, Kwakye-Nuako G. The therapeutic landscape of HIV-1 via genome editing. Vol. 14, *AIDS Research and Therapy*. BioMed Central Ltd.; 2017.
32. Khalili K, Kaminski R, Gordon J, Cosentino L, Hu W. Genome editing strategies: potential tools for eradicating HIV-1/AIDS. *J Neurovirool*. 2015 Jun 16;21(3):310–21.

Apêndice 1

Quadro 1 - MICRO framework.

Autores \ Itens Avaliados	Wilen C, <i>et al</i> ²³				Wang W, <i>et al</i> ²⁰				Ru R, <i>et al</i> ²⁶				Xiao Q, <i>et al</i> ²²				Wang Q, <i>et al</i> ²¹				DiGiusto D, <i>et al</i> ²⁴				Shi B, <i>et al</i> ²⁵			
	S	N	I	NP	S	N	I	NP	S	N	I	NP	S	N	I	NP	S	N	I	NP	S	N	I	NP	S	N	I	NP
1. Specimen types	S				S				S				S				S				S							
2. Sampling period	NA				NA				NA				NA				NA				NA							
3. Sampling strategy	NA				NA				NA				NA				NA				NA							
4. Target organisms	S				S				S				S				S				S							
5. Geographical setting	NA				NA				NA				NA				NA				NA							
6. Clinical setting	S				S				S				S				N				S							
7. Specimen processing	S				S				S				S				S				S							
8. Target organism identification	S				S				S				S				S				S							
9. Antimicrobial susceptibility testing	S				S				S				S				S				S							
10. Additional tests performed to identify resistance mechanisms	N				S				N				S				N				N				S			
11. Antimicrobial resistance definitions	S				S				N				S				S				N				S			
12. External quality assurance	NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA			
13. Accreditation	NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA			
14. Duplicate and sequential isolates	S				S				S				S				N				S				S			