



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA**

**LARYSSA THAMYRES SANTOS BARROS**

**O USO DO CRISPR/CAS9 NO TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFOCÍTICA**  
**AGUDA: UMA PEQUENA REVISÃO**

**VITÓRIA DE SANTO ANTÃO – PE**

**2021**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA**

**NÚCLEO DE ENFERMAGEM**

**LARYSSA THAMYRES SANTOS BARROS**

**O USO DO CRISPR/CAS9 NO TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFOCÍTICA  
AGUDA: UMA PEQUENA REVISÃO**

TCC apresentado ao Curso de Enfermagem da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico da Vitória, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Enfermagem.

**VITÓRIA DE SANTO ANTÃO – PE**

**2021**

Catálogo na Fonte  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.  
Bibliotecário Jaciane Freire Santana, CRB-4/2018

B277u Barros, laryssa thamyres Santos.

O uso do CRISPR/CAS9 no tratamento da leucemia linfocítica aguda: uma pequena revisão / Laryssa Thamyres Santos Barros. - Vitória de Santo Antão, 2021.  
24 f.

Orientador: José Eduardo Garcia.

TCC (Bacharelado em Enfermagem) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Bacharelado em Enfermagem, 2021.

Inclui referências e anexo.

1. Leucemia aguda bifenotípica. 2. Proteína 9 associada à CRISPR. 3. Neoplasias. I. Garcia, José Eduardo (Orientador). II. Título.

616.99419 CDD (23. ed.)

BIBCAV/UFPE - 191/2021

LARYSSA THAMYRES SANTOS BARROS

**O USO DO CRISPR/CAS9 NO TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFOCÍTICA  
AGUDA: UMA PEQUENA REVISÃO**

TCC apresentado ao Curso de Enfermagem da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico da Vitória, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Enfermagem.

Aprovado em: 09/12/2021.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profº Drº José Eduardo Garcia (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profª Drª Carolina Peixoto Magalhães (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profª Drª Magaly Bushatsky (Examinador Externo)  
Universidade de Pernambuco

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço primeiramente a Deus, segundo, a minha família que acreditaram e acreditam muito no meu potencial. Agradeço também aos meus orientadores que me ajudaram nessa caminhada tão difícil. Quero agradecer também a todos os meus mestres que com sua paciência e ensinamentos me transferiu tanto conhecimento ao longo desses 05 anos de formação acadêmica. Aos meus amigos e turma, obrigada por cada momento vivido...eles jamais serão esquecidos. E por fim, agradecer a todos que contribuíram de alguma forma, vocês foram essenciais.

## RESUMO

A leucemia, neoplasia maligna hematopoiética, constitui uma causa significativa de leucocitose persistente, sendo classificada, com base nas células envolvidas, em mieloide e linfóide. Na Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), as células leucêmicas ainda imaturas se acumulam na medula óssea e destroem e substituem células que produzem células sanguíneas normais. Está associada com a proliferação neoplásica de um tipo de célula específica, e a causa dessa desordem ainda não é totalmente conhecida. A LLA é a neoplasia mais frequente na infância, correspondendo a aproximadamente 75% dos casos de leucemias na infância. Além das etapas fundamentais do plano de tratamento da LLA: radioterapia, quimioterapia, e o transplante de medula óssea, o CRISPR/Cas9 (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) é uma técnica de edição genética fortemente associada à LLA; utilizada para modificar as sequências de DNA precisamente e em locais específicos. A técnica baseia-se na utilização da endonuclease Cas9, que tem a capacidade de clivar o DNA precisamente a partir de uma sequência guia de RNA que informa ao Cas9 a porção do DNA que ela vai cortar. O presente trabalho é um estudo do tipo revisão de literatura que tem por objetivo avaliar o estado da arte da utilização do CRISPR/Cas9 no tratamento da LLA. A metodologia da revisão consiste em uma revisão da literatura nas plataformas digitais “PUBMED”, “SciELO”, “Web of Science”, “Science Direct” e “Scopus” no período compreendido entre 2014 e 2021, utilizando os seguintes descritores: “Acute Lymphocytic Leukemia”, “Childhood” e “CRISPR/Cas9”. Foram incluídos os artigos originais, completos que descrevem protocolos terapêuticos ou a perspectiva do uso do CRISPR/Cas9 no tratamento da Leucemia Linfocítica Aguda nos idiomas português e inglês. Foram excluídos editoriais, teses, dissertações, monografias, resumos de eventos científicos, estudos de cunho reflexivo ou teórico. Resultados: 29 foram utilizados para essa revisão. Os estudos mais frequentes foram publicados na China, Estados Unidos e Brasil, no ano de 2020 (28,5%), e grande parte no idioma inglês: 28 artigos (98%). Os estudos e experimentos estão sendo realizados a grande maioria *in vitro*, mas apresentam resultados satisfatórios quando aplicados em edições de genes em células humanas. Conclusão: A tecnologia de CRISPR/Cas9 apresenta um vastíssimo potencial para todas as áreas da biologia, desde a agricultura até a terapia de diversas doenças, indo do desenvolvimento de vacinas e fármacos até a edição gênica do próprio paciente. Os principais entraves à ampla utilização dessa tecnologia em larga escala residem no desenvolvimento de vetores eficazes, na diminuição dos riscos associados à clivagem de regiões fora do alvo, aspectos éticos relacionados à manipulação genética humana e a identificação precisa dos genes alvo. O uso do CRISPR/Cas9 como ferramenta auxiliar na terapia da LLA ainda se encontra em fase experimental, porém, os experimentos indicam que num breve espaço de tempo estará disponível para uso em larga escala, como uma alternativa de baixo custo relativo, alta eficiência e efeitos colaterais reduzidos.

Palavras-chaves: leucemia linfocítica aguda; crispr/cas9; câncer.

## ABSTRACT

Leukemia, a malignant hematopoietic neoplasm, is a significant cause of persistent leukocytosis, being classified, based on the cells involved, into myeloid and lymphoid. In Acute Lymphocytic Leukemia (ALL), the leukemic cells that are still immature accumulate in the bone marrow and destroy and replace cells that produce normal blood cells. It is associated with neoplastic proliferation of a specific cell type, and the cause of this disorder is not fully understood. ALL is the most frequent neoplasm in childhood, accounting for approximately 75% of childhood leukemia cases. In addition to the fundamental steps of the ALL-treatment plan: radiotherapy, chemotherapy, and bone marrow transplantation, CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) is a genetic editing technique strongly associated with ALL; used to modify DNA sequences precisely and at specific locations. The technique is based on the use of endonuclease Cas9, which has the ability to precisely cleave DNA from an RNA guide sequence that tells Cas9 which portion of the DNA it will cut. The present work is an literature review type study that aims to assess the state of the art in the use of CRISPR/Cas9 in the treatment of ALL. The review methodology consists of a literature review on the digital platforms "PUBMED", "SciELO", "Web of Science", "Science Direct" and "Scopus" in the period between 2014 and 2021, using the following descriptors: "Acute Lymphocytic Leukemia", "Childhood" and "CRISPR/Cas9". Original, complete articles describing therapeutic protocols or the perspective of using CRISPR/Cas9 in the treatment of Acute Lymphocytic Leukemia in Portuguese and English were included. Editorials, theses, dissertations, monographs, abstracts of scientific events, studies of a reflexive or theoretical nature were excluded. Results: 29 were used for this review. The most frequent studies were published in China, the United States and Brazil, in 2020 (28.5%), and most of them in the English language: 28 articles (98%). The studies and experiments are being carried out for the most part in vitro, but they present satisfactory results when applied in gene editing in human cells. Conclusion: The CRISPR/Cas9 technology has enormous potential for all areas of biology, from agriculture to the therapy of various diseases, ranging from the development of vaccines and drugs to the patient's own gene editing. The main obstacles to the wide use of this technology on a large scale lie in the development of effective vectors, in the reduction of risks associated with the cleavage of non-target regions, ethical aspects related to human genetic manipulation and the precise identification of target genes. The use of CRISPR/Cas9 as an auxiliary tool in ALL therapy is still in the experimental phase, however, the experiments indicate that in a short period of time it will be available for large-scale use, as an alternative of low relative cost, high efficiency and reduced side effects.

Keywords: acute lymphocytic leukemia; crispr/cas9; cancer

## SUMÁRIO

|                                                       |           |
|-------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                              | <b>8</b>  |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                  | <b>10</b> |
| <b>3 OBJETIVOS .....</b>                              | <b>12</b> |
| <b>4 ARTIGO.....</b>                                  | <b>13</b> |
| <b>5 CONCLUSÃO.....</b>                               | <b>20</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                               | <b>21</b> |
| <b>ANEXO A – NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA .....</b> | <b>23</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A leucemia é caracterizada pela proliferação desordenada de células precursoras (células sanguíneas) e específicas (blastos). É classificada em 2 tipos, de acordo com o tipo celular envolvido: mieloide e linfóide e ainda é subclassificada de acordo com seu grau de gravidade: aguda e crônica. A Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), é o tipo que afeta as células linfóides que são responsáveis pela defesa do organismo (por exemplo, os linfonodos), já a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é o tipo que acomete as células mielóides que dão origem as células do sangue (leucócitos, plaquetas e hemácias)<sup>1</sup>.

A translocação BCR/ABL, envolvendo os cromossomos 22 e 9, respectivamente é encontrada em 25% das células blásticas de LLA, o que denota um forte componente genético envolvido na fisiopatologia da doença<sup>1</sup>.

Em países desenvolvidos, a sobrevida de pessoas acometidas pela LLA está em torno de 80%, ao passo que no Brasil, a sobrevida está em torno de 64%. A detecção precoce na atenção básica e o diagnóstico precoce na atenção hospitalar é imprescindível para o sucesso do tratamento e o aumento da sobrevida dos pacientes<sup>2</sup>.

A população infantil é a mais atingida e diagnosticada com LLA, e o risco da doença é 60% maior em crianças até 5 anos comparado com faixas etárias maiores. A maioria dos casos ocorre em crianças, porém a maioria das mortes pela doença se dá em adultos. Isso ocorre devido às diferenças fisiológicas nas faixas etárias; em crianças por exemplo, o corpo reage melhor a tratamentos agressivos<sup>3</sup>.

As etapas fundamentais de um plano de tratamento da LLA são a irradiação craniana e a quimioterapia intratecal. O transplante de medula óssea que é uma possibilidade para grupos específicos, podendo evoluir para a remissão ou até mesmo a cura. Anticorpos mononucleares com afinidade efetiva para o antígeno CD52 também são utilizados em protocolos terapêuticos, uma vez que esse antígeno é expresso em 70% das células de LLA<sup>1</sup>.

O CRISPR/Cas9 (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) é uma técnica de edição genética, utilizada para modificar as sequências de DNA em locais específicos. A técnica baseia-se na utilização da endonuclease Cas9, que tem a capacidade de clivar o DNA precisamente, a partir de uma sequência- guia de RNA que informa ao Cas9 qual porção do DNA no genoma ela vai cortar<sup>4</sup>.

Uma vez que existe um componente genético fortemente associado à LLA, como a translocação BCR/ABL t (9;22), a proposta do presente projeto é de avaliar o estado da arte da utilização do CRISPR/Cas9 como alternativa nos tratamentos dessa doença<sup>5</sup>.

Ainda que as terapias convencionais para a LLA, baseadas em protocolos que combinam drogas citotóxicas, associadas ou não ao transplante de medula, apresentem grande taxa de sucesso no aumento da sobrevida dos pacientes, a busca de novos protocolos terapêuticos mais modernos e com menos efeitos colaterais devem ser sempre preconizados. Diante do exposto, o presente trabalho de revisão se justifica por realizar um levantamento do potencial de utilização da tecnologia de CRISPR/Cas9 no tratamento da LLA.

O objetivo dessa revisão de literatura é avaliar o estado da arte da utilização da tecnologia de CRISPR/Cas9 no tratamento da LLA, utilizando as seguintes perguntas condutoras: Qual é a atual situação do uso da tecnologia de CRISPR/Cas9 no tratamento de LLA? Quais são as perspectivas dessa tecnologia ser incorporada ao conjunto de práticas terapêuticas dessa doença?

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O sistema CRISPR CAS9 faz parte dos mecanismos de defesa bacterianos e é formado por repetições palindrômicas curtas, Inter espaçadas e regularmente agrupadas (do inglês, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR), e sua proteína associada-9 (do inglês, CRISPR associated protein-9, Cas9). O funcionamento do sistema se baseia na clivagem do DNA viral, pela enzima Cas9 (que é uma endonuclease), direcionada por uma sequência de RNA complementar ao DNA alvo. A grande diferença desse mecanismo de defesa bacteriano para o que se vale de enzimas de restrição, é que as enzimas de restrição clivam o DNA exclusivamente em sítios pré determinados, já o sistema CRISPR/Cas9 oferece a possibilidade de reconhecimento de qualquer sequência, desde que ela esteja inserida no *cluster* de sequencias repetitivas. A compreensão do mecanismo de funcionamento do sistema CRISPR/Cas9 em bactérias foi publicado por J.A. Doudna e E. Charpentier (2012) e o rápido entendimento de que essa região do genoma bacteriano poderia revolucionar praticamente todas as áreas da biologia, a partir da edição controlada do genoma as levou a serem laureadas com o Prêmio Nobel de Química em 2020 (<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>). Em uma extensa revisão, Song *et al.*, (2019), elencam os principais vetores físicos, virais e não virais utilizados para transformar células eucarióticas com o sistema CRISPR/Cas, além de discutirem a utilização desse método para a terapia gênica de cânceres e outras imunoterapias. Os autores apresentam outras proteínas do sistema Cas (Cas12a e Cas13a) como alternativas ao Cas9 por apresentarem mecanismos de ação ligeiramente distintos (forma de clivagem do DNA alvo, por exemplo) e que podem ser utilizados em situações específicas na terapia de diferentes tipos de cânceres. Um ponto crítico destacado pelos autores é a seleção dos genes-alvo; nesse sentido, ele destaca os oncogenes, genes envolvidos na morte celular programada, genes epigenéticos, genes relacionados à resposta imune, oncogenes virais, genes associados ao microambiente tumoral, entre outros<sup>6</sup>.

Em um experimento *in vitro* e com modelos animais para a Leucemia Mielóide Crônica; Liu *et al.*, (2018) utilizaram nanopartículas para carrear o sistema CRISPR/Cas9 capaz de identificar o gene fundido BCR/ABL, intimamente envolvido com a patogenia da doença. Nos modelos utilizados, os estudiosos desenvolveram três gRNAs (RNAs guia) visando uma região de fusão do gene BCR/ABL, o mesmo foi reconhecido e interrompido havendo assim

uma eficiência de nocaute do gene satisfatória (54,5%), sugerindo que essa estratégia de terapia é bastante promissora para o futuro do tratamento dessa doença<sup>7</sup>.

Um relato de caso de 2019 apresenta a utilização de células progenitoras hematopoiéticas (HSPCs) com uma alteração no gene CCR5 por meio de CRISPR/Cas9 numa transfusão para um paciente de LLA portador do HIV. O gene CCR5 é um dos co-receptores necessários para a entrada do HIV na célula. Os resultados indicaram a esperada remissão da LLA após a transfusão e, apesar dos resultados não terem sido suficientes para indicar a cura do paciente em relação à infecção viral, o transplante com células modificadas nesse caso, abre uma perspectiva para o tratamento da infecção por HIV associada à LLA.<sup>8</sup>.

Uma mutação que troca um ácido glutâmico (E) por uma lisina (K) na posição 1099 (E1099K) do gene NSD2 (uma histona metiltransferase específica para a metilação da lisina 36 da histona 3 (H3K36)), tem sido observada em pacientes com LLA infantil e está fortemente associada à recidiva da doença<sup>9</sup>.

Swaroop *et al.*, (2019) realizaram estudos in vitro com linhagens celulares mutantes alteradas por meio de CRISPR/Cas9 e observaram que essa mutação específica provoca diminuição do apoptose e aumento da proliferação além de outros fatores de desequilíbrio do ciclo celular. Os autores elencam o gene NSD2 como forte candidato para estudos futuros visando novas terapias para LLA baseadas em edição gênica<sup>9</sup>. Montañós *et al.*, (2018) elencaram os principais trabalhos que foram realizados associando CRISPR/Cas9 com mutações dirigidas em genes de fatores de transcrição<sup>10,11,12</sup>, genes alvo para terapia<sup>13,14,15,16</sup> receptores de antígenos quiméricos<sup>17,18,19,20,21</sup>, expressão de genes fundidos<sup>22,23,24,25</sup> e genes envolvidos na patogenia da doença<sup>26,27,28</sup>.

O CRISPR/Cas9 enfrenta um desafio muito forte que é a clivagem de DNA fora do alvo desejado, estudiosos das universidades de Stanford e Iowa retrataram que diante de um teste conseguiram corrigir um gene responsável pela cegueira em ratos, porém, vieram mutações acidentais em nucleotídeos únicos e exclusões ou inserções de maior porte, envolvendo trechos com mais de uma letra<sup>29</sup>.

### **3 OBJETIVOS**

Objetivo Geral: Avaliar o estado da arte da utilização da tecnologia de CRISPR/Cas9 no tratamento da LLA.

Objetivos Específicos:

- Avaliar as vantagens/desvantagens da utilização do CRISPR/Cas9 no tratamento da LLA.
- Avaliar, a partir da literatura levantada, as perspectivas da utilização da técnica como forma rotineira de tratamento da LLA.

#### 4 ARTIGO

O PRESENTE TRABALHO ESTÁ APRESENTADO NO FORMATO DE ARTIGO REQUERIDO PELO **JORNAL MEMORIAL DA MEDICINA**, CUJAS NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS SE ENCONTRAM EM ANEXO A.

## **CRISPR/CAS9 na terapia da Leucemia Linfocítica Aguda: uma pequena revisão**

### ***CRISPR/CAS9 in Acute Lymphocytic Leukemia Therapy: an integrative review***

Laryssa Thamyres Santos Barros<sup>1</sup>, Mariana Boulitreau Siqueira Campos Barros<sup>2</sup>, José Eduardo Garcia<sup>2</sup>

Centro Acadêmico da Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil

#### **Resumo**

A leucemia, neoplasia maligna hematopoiética, constitui uma causa significativa de leucocitose persistente, sendo classificada, com base nas células envolvidas, em mieloide e linfoide. Está associada com a proliferação neoplásica de um tipo de célula específica, e a causa dessa desordem ainda não é totalmente conhecida. A Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) é a neoplasia mais frequente na infância, correspondendo a aproximadamente 75% dos casos de câncer na infância. Além das etapas fundamentais do plano de tratamento da LLA: radioterapia, quimioterapia, e o transplante de medula óssea, o CRISPR/Cas9 (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) é uma técnica de edição genética fortemente associada à LLA; utilizada para modificar as sequências de DNA precisamente e em locais específicos. A técnica baseia-se na utilização da endonuclease Cas9, que tem a capacidade de clivar o DNA precisamente a partir de uma sequência guia de RNA que informa ao Cas9 a porção do DNA que ela vai cortar. O presente trabalho é um estudo do tipo revisão integrativa que tem por objetivo avaliar o estado da arte da utilização do CRISPR/Cas9 no tratamento da LLA.

Palavras-chaves: Leucemia Linfocítica Aguda, CRISPR/Cas9, Câncer

## Abstract

Leukemia, a malignant hematopoietic neoplasm, is a significant cause of persistent leukocytosis, being classified, based on the cells involved, into myeloid and lymphoid. It is associated with neoplastic proliferation of a specific cell type, and the cause of this disorder is not fully understood. Acute Lymphocytic Leukemia (ALL) is the most frequent neoplasm in childhood, accounting for approximately 75% of childhood cancer cases. In addition to the fundamental steps of the ALL treatment plan: radiotherapy, chemotherapy, and bone marrow transplantation, CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) is a genetic editing technique strongly associated with ALL; used to modify DNA sequences precisely and at specific locations. The technique is based on the use of endonuclease Cas9, which has the ability to precisely cleave DNA from an RNA guide sequence that tells Cas9 which portion of the DNA it will cut. The present work is an integrative review type study that aims to assess the state of the art in the use of CRISPR/Cas9 in the treatment of ALL.

Keywords: Acute Lymphocytic Leukemia, CRISPR/Cas9, Cancer

## Introdução

A leucemia é caracterizada pela proliferação desordenada de células precursoras (células sanguíneas) e específicas (blastos). É classificada em 2 tipos, de acordo com o tipo celular envolvido: mieloide e linfóide e ainda é subclassificada de acordo com seu grau de gravidade: aguda e crônica. A Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), é o tipo que afeta as células linfóides que são responsáveis pela defesa do organismo (por exemplo, os linfonodos), já a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é o tipo que acomete as células mielóides que dão origem as células do sangue (leucócitos, plaquetas e hemácias)<sup>1</sup>.

A translocação BCR/ABL, envolvendo os cromossomos 22 e 9, respectivamente é encontrada em 25% das células blásticas de LLA, o que denota um forte componente genético envolvido na fisiopatologia da doença<sup>1</sup>.

Em países desenvolvidos, a sobrevida de pessoas acometidas pela LLA está em torno de 80%, ao passo que no Brasil, a sobrevida

está em torno de 64%. A detecção precoce na atenção básica e o diagnóstico precoce na atenção hospitalar são imprescindíveis para o sucesso do tratamento e o aumento da sobrevida dos pacientes<sup>2</sup>.

A população infantil é a mais atingida e diagnosticada com LLA, e o risco da doença é 60% maior em crianças até 5 anos comparado com faixas etárias maiores. A maioria dos casos ocorre em crianças, porém a maioria das mortes pela doença se dá em adultos. Isso ocorre devido às diferenças fisiológicas nas faixas etárias; em crianças, por exemplo, o corpo reage melhor a tratamentos agressivos<sup>3</sup>.

As etapas fundamentais de um plano de tratamento da LLA são a irradiação craniana e a quimioterapia intratecal. O transplante de medula óssea que é uma possibilidade para grupos específicos, podendo evoluir para a remissão ou até mesmo a cura. Anticorpos mononucleares com afinidade efetiva para o antígeno CD52 também são utilizados em protocolos terapêuticos, uma

vez que esse antígeno é expresso em 70% das células de LLA<sup>1</sup>.

O CRISPR/Cas9 (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) é uma técnica de edição genética, utilizada para modificar as sequências de DNA em locais específicos. A técnica baseia-se na utilização da endonuclease Cas9, que tem a capacidade de clivar o DNA precisamente, a partir de uma sequência- guia de RNA que informa ao Cas9 qual porção do DNA no genoma ela vai cortar<sup>4</sup>.

Uma vez que existe um componente genético fortemente associado à LLA, como a translocação BCR/ABL t (9;22), a proposta do presente projeto é de avaliar o estado da arte da utilização do CRISPR/Cas9 como alternativa nos tratamentos dessa doença<sup>5</sup>.

Ainda que as terapias convencionais para a LLA, baseadas em protocolos que combinam drogas citotóxicas, associadas ou não ao transplante de medula, apresentem grande taxa de sucesso no aumento da sobrevida dos pacientes, a busca de novos protocolos terapêuticos mais modernos e com menos efeitos colaterais devem ser sempre preconizada. Diante do exposto, o presente trabalho de revisão se justifica por realizar um levantamento do potencial de utilização da tecnologia de CRISPR/Cas9 no tratamento da LLA.

O objetivo dessa revisão de literatura é avaliar o estado da arte da utilização da tecnologia de CRISPR/Cas9 no tratamento da LLA, utilizando as seguintes perguntas condutoras: Qual é a atual situação do uso da tecnologia de CRISPR/Cas9 no tratamento de LLA? Quais são as perspectivas dessa tecnologia ser incorporada ao conjunto de práticas terapêuticas dessa doença?

## Métodos

Foi realizada uma revisão da literatura nas plataformas digitais “PUBMED”, “SciELO”, “Web of Science”, “Science Direct” e “Scopus” no período compreendido entre 2014 e 2021, utilizando os seguintes descritores: “Acute Lymphocytic Leukemia”, “Childhood” e “CRISPR/Cas9”

Foram incluídos os artigos originais, completos que descrevem protocolos terapêuticos ou a perspectiva do uso do CRISPR/Cas9 no tratamento da Leucemia Linfocítica Aguda nos idiomas português e inglês.

Foram excluídos editoriais, teses, dissertações, monografias, resumos de eventos científicos, estudos de cunho reflexivo ou teórico.

## Resultados

Do total de 48 artigos encontrados, 29 foram utilizados para essa revisão. Os 20 restantes abordavam o CRISPR mas não abordavam a LLA. Os estudos mais frequentes foram publicados na China, Estados Unidos e Brasil no ano de 2020 (28,5%), e grande parte no idioma inglês: 28 artigos (98%).

## Discussão

O sistema CRISPR CAS9 faz parte dos mecanismos de defesa bacterianos e é formado por repetições palindrômicas curtas, Inter espaçadas e regularmente agrupadas (do inglês, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR), e sua proteína associada-9 (do inglês, CRISPR associated protein-9, Cas9). O funcionamento do sistema se baseia na clivagem do DNA viral, pela enzima Cas9 (que é uma endonuclease), direcionada por uma sequência de RNA complementar ao DNA alvo. A grande diferença desse mecanismo de defesa bacteriano para o que se vale de enzimas de restrição, é que as

enzimas de restrição clivam o DNA exclusivamente em sítios pré determinados, já o sistema CRISPR/Cas9 oferece a possibilidade de reconhecimento de qualquer sequência, desde que ela esteja inserida no *cluster* de sequências repetitivas. A compreensão do mecanismo de funcionamento do sistema CRISPR/Cas9 em bactérias foi publicado por J.A. Doudna e E. Charpentier (2012) e o rápido entendimento de que essa região do genoma bacteriano poderia revolucionar praticamente todas as áreas da biologia, a partir da edição controlada do genoma as levou a serem laureadas com o Prêmio Nobel de Química em 2020 (<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>). Em uma extensa revisão, Song *et al.*, (2019), elencam os principais vetores físicos, virais e não virais utilizados para transformar células eucarióticas com o sistema CRISPR/Cas, além de discutirem a utilização desse método para a terapia gênica de cânceres e outras imunoterapias. Os autores apresentam outras proteínas do sistema Cas (Cas12a e Cas13a) como alternativas ao Cas9 por apresentarem mecanismos de ação ligeiramente distintos (forma de clivagem do DNA alvo, por exemplo) e que podem ser utilizados em situações específicas na terapia de diferentes tipos de cânceres. Um ponto crítico destacado pelos autores é a seleção dos genes-alvo; nesse sentido, ele destaca os oncogenes, genes envolvidos na morte celular programada, genes epigenéticos, genes relacionados à resposta imune, oncogenes virais, genes associados ao microambiente tumoral, entre outros<sup>6</sup>.

Em um experimento *in vitro* e com modelos animais para a Leucemia Mielóide Crônica; Liu *et al.*, (2018) utilizaram nanopartículas para carrear o sistema CRISPR/Cas9 capaz de identificar o gene fundido BCR/ABL, intimamente envolvido com a patogenia da doença. Nos modelos utilizados, os estudiosos desenvolveram três gRNAs (RNAs

guia) visando uma região de fusão do gene BCR/ABL, o mesmo foi reconhecido e interrompido havendo assim uma eficiência de nocaute do gene satisfatória (54,5%), sugerindo que essa estratégia de terapia é bastante promissora para o futuro do tratamento dessa doença<sup>7</sup>.

Um relato de caso de 2019 apresenta a utilização de células progenitoras hematopoiéticas (HSPCs) com uma alteração no gene CCR5 por meio de CRISPR/Cas9 numa transfusão para um paciente de LLA portador do HIV. O gene CCR5 é um dos co-receptores necessários para a entrada do HIV na célula. Os resultados indicaram a esperada remissão da LLA após a transfusão e, apesar dos resultados não terem sido suficientes para indicar a cura do paciente em relação à infecção viral, o transplante com células modificadas nesse caso, abre uma perspectiva para o tratamento da infecção por HIV associada à LLA.<sup>8</sup>

Uma mutação que troca um ácido glutâmico (E) por uma lisina (K) na posição 1099 (E1099K) do gene NSD2 (uma histona metiltransferase específica para a metilação da lisina 36 da histona 3 (H3K36)), tem sido observada em pacientes com LLA infantil e está fortemente associada à recidiva da doença<sup>9</sup>.

Swaroop *et al.*, (2019) realizaram estudos *in vitro* com linhagens celulares mutantes alteradas por meio de CRISPR/Cas9 e observaram que essa mutação específica provoca diminuição do apoptose e aumento da proliferação além de outros fatores de desequilíbrio do ciclo celular. Os autores elencam o gene NSD2 como forte candidato para estudos futuros visando novas terapias para LLA baseadas em edição gênica<sup>9</sup>. Montañós *et al.*, (2018) elencaram os principais trabalhos que foram realizados associando CRISPR/Cas9 com mutações dirigidas em genes de fatores de transcrição<sup>10,11,12</sup>, genes alvo para terapia<sup>13,14,15,16</sup> receptores de antígenos

quiméricos,<sup>17,18,19,20,21</sup>, expressão de genes fundidos,<sup>22,23,24,25</sup> e genes envolvidos na patogenia da doença.<sup>26,27,28</sup>

O CRISPR/Cas9 enfrenta um desafio muito forte que é a clivagem de DNA fora do alvo desejado, estudiosos das universidades de Stanford e Iowa retrataram que diante de um teste conseguiram corrigir um gene responsável pela cegueira em ratos, porém, vieram mutações acidentais em nucleotídeos únicos e exclusões ou inserções de maior porte, envolvendo trechos com mais de uma letra<sup>29</sup>.

## Conclusão

A tecnologia de CRISPR/Cas9 apresenta um vastíssimo potencial para todas as áreas da biologia, desde a agricultura até a terapia de diversas doenças, indo do desenvolvimento de vacinas e fármacos até a edição gênica do próprio paciente. Os principais entraves à ampla utilização dessa tecnologia em larga escala residem no desenvolvimento de vetores eficazes, na diminuição dos riscos associados à clivagem de regiões fora do alvo, aspectos éticos relacionados à manipulação genética humana e a identificação precisa dos genes alvo. Entretanto, o método se encontra em discussão na comunidade científica.

Estudos e experimentos realizados na China, adotam o CRISPR/Cas9 como ferramenta de edição gênica tanto *in vitro* como *in vivo*, para diminuir com eficiência os efeitos oncogênicos das células leucêmicas. Mesmo os resultados não sendo 100%, levantou a possibilidade de que interrompendo a expressão de BCR/ABL a sua tumorigenicidade será revertida.

O uso do CRISPR/Cas9 como ferramenta auxiliar na terapia da LLA ainda se encontra em fase experimental, porém, os resultados

*in vitro* que aparecem até então indica que num breve espaço de tempo estará disponível para uso em larga escala, como uma alternativa de baixo custo relativo, alta eficiência e reduzidos efeitos colaterais.

## Referências

1. CHEEVER, et al. BrunnereSuddarth: **Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda, 2014.
2. BONILHA, Thais; OBADIA, Danielle; VALVESON, Andressa; LAND, Marcelo. Outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia treatment in a single center in Brazil: A survival analysis study. **Cancer Reports**, Brasil, p. 1-6, 12 maio 2021. DOI 10.1002/cnr2.1452.
3. BRASIL, Ministério da Saúde. **Instituto Nacional de Câncer**. Leucemia. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>> . Acesso em: 05 abr. 2021.
4. AREND, Marcela Corso. O sistema CRISPR/Cas9 e a possibilidade de edição genômica para a cardiologia. **ABC Cardio**1, (108)1, janeiro, 2017.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/17689531/a-tecnologia-crispr-e-suas-aplicacoes-no-brasil-e-no-mundo>> . Acesso em: 14 dez. 2021.
6. SONG, Xiangrong *et al.* Delivery of CRISPR/Cas systems for cancer gene therapy and immunotherapy. **Elsevier**, China, p. 158-180, 1 maio 2020.
7. LIU, Yang; ZHAO, Gui; XU, Conf-Fei; LUO, Ying-Li; LU, Zi-Dong; WANG, Jun. Systemic delivery of CRISPR/Cas9 with PEG-PLGA

nanoparticles for chronic myeloid leukemia targeted therapy. **Biomaterials Science**, [S. l.], p. 1592-1603, 23 abr. 2018.

8. XU, Lei *et al.* CRISPR-Edited Stem Cells in a Patient with HIV and Acute Lymphocytic Leukemia. **The new england journal of medicine**, [S. l.], p. 1240-1247, 11 set. 2019.

9. SWAROOP, Alok *et al.* An Activating Mutation of the NDS2 Histone Methyltransferase Drives Oncogenic Reprogramming in Acute Lymphocytic Leukemia. **Research Gate**, [S. l.], p. 01-26, 28 fev. 2019.

10. Chan LN, Chen Z, Braas D, Lee JW, Xiao G, Geng H, Cosgun KN, Hurtz C, Shojaee S, Cazzaniga V, *et al.* Metabolic gatekeeper function of B-lymphoid transcription factors. **Nature**. 2017;542(7642):479–83.

11. Navarro JM, Touzart A, Pradel LC, Loosveld M, Koubi M, Fenouil R, Le Noir S, Maqbool MA, Morgado E, Gregoire C, *et al.* Site- and allele-specific polycomb dysregulation in T-cell leukaemia. **Nat Commun**. 2015;6:6094.

12. Rahman S, Magnussen M, Leon TE, Farah N, Li Z, Abraham BJ, Alapi KZ, Mitchell RJ, Naughton T, Fielding AK, *et al.* Activation of the LMO2 oncogene through a somatically acquired neomorphic promoter in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**. 2017;129(24):3221–6.

13. Kampa-Schittenhelm KM, Salitzky O, Akmut F, Illing B, Kanz L, Salih HR, Schittenhelm MM. Dronabinol has preferential antileukemic activity in acute lymphoblastic and myeloid leukemia with lymphoid differentiation patterns. **BMC Cancer**. 2016;16:25.

14. Kim E, Hurtz C, Koehrer S, Wang Z, Balasubramanian S, Chang BY, Muschen M, Davis RE, Burger JA. Ibrutinib inhibits pre-BCR+ B-cell acute lymphoblastic leukemia progression by targeting BTK and BLK.

**Blood**. 2017; 129(9):1155–65.

15. Vercruysse T, De Bie J, Neggers JE, Jacquemyn M, Vanstreels E, Schmid-Burgk JL, Hornung V, Baloglu E, Landesman Y, Senapedis W, *et al.* The second-generation Exportin-1 inhibitor KPT-8602 demonstrates potent activity against acute lymphoblastic leukemia. **Clin Cancer Res**. 2017;23(10):2528–41.

16. Takahashi K, Inukai T, Imamura T, Yano M, Tomoyasu C, Lucas DM, Nemoto A, Sato H, Huang M, Abe M, *et al.* Anti-leukemic activity of bortezomib and carfilzomib on B-cell precursor ALL cell lines. **PLoS One**. 2017;12(12):e0188680.

17. Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amrolia P, Stafford S, Butler K, Rivat C, Wright G, Somana K, *et al.* Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. **Sci Transl Med**. 2017;9(374).

18. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen SJ, Hamieh M, Cunanan KM, Odak A, Gonen M, Sadelain M. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. **Nature**. 2017;543(7643):113–7.

19. Sotillo E, Barrett DM, Black KL, Bagashev A, Oldridge D, Wu G, Sussman R, Lanauze C, Ruella M, Gazzara MR, *et al.* Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy. **Cancer Discov**. 2015;5(12):1282–95.

20. Legut M, Dolton G, Mian AA, Ottmann OG, Sewell AK. CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T cells. **Blood**. 2018; 131(3):311–22.

21. Cooper ML, Choi J, Staser K, Ritchey JK, Devenport JM, Eckardt K, Rettig MP, Wang B, Eissenberg LG, Ghobadi A, *et al.* An “off-the-shelf” fratricideresistant CAR-T

- for the treatment of T cell hematologic malignancies. *Leukemia*. 2018; <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0065-5>.
22. Boiers C, Richardson SE, Laycock E, Zriwil A, Turati VA, Brown J, Wray JP, Wang D, James C, Herrero J, et al. A human IPS model implicates embryonic B-myeloid fate restriction as developmental susceptibility to B acute lymphoblastic leukemia-associated ETV6-RUNX1. *Dev Cell*. 2018;44(3): 362–77. e367.
  23. Breese EH, Buechele C, Dawson C, Cleary ML, Porteus MH. Use of genome engineering to create patient specific MLL translocations in primary human hematopoietic stem and progenitor cells. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136644.
  24. Castano J, Herrero AB, Bursen A, Gonzalez F, Marschalek R, Gutierrez NC, Menendez P. Expression of MLL-AF4 or AF4-MLL fusions does not impact the efficiency of DNA damage repair. *Oncotarget*. 2016;7(21):30440–52.
  25. Reimer J, Knoss S, Labuhn M, Charpentier EM, Gohring G, Schlegelberger B, Klusmann JH, Heckl D. CRISPR-Cas9-induced t(11;19)/MLL-ENL translocations initiate leukemia in human hematopoietic progenitor cells in vivo. *Haematologica*. 2017;102(9):1558–66.
  26. Randhawa S, Cho BS, Ghosh D, Sivina M, Koehrer S, Muschen M, Peled A, Davis RE, Konopleva M, Burger JA. Effects of pharmacological and genetic disruption of CXCR4 chemokine receptor function in B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2016;174(3):425–36.
  27. Baumann AM, Bakkers MJ, Buettner FF, Hartmann M, Grove M, Langereis MA, de Groot RJ, Muhlenhoff M. 9-O-acetylation of sialic acids is catalysed by CASD1 via a covalent acetyl-enzyme intermediate. *Nat Commun*. 2015;6:7673.
  28. McComb S, Aguade-Gorgorio J, Harder L, Marovca B, Cario G, Eckert C, Schrappe M, Stanulla M, von Stackelberg A, Bourquin JP, et al. Activation of concurrent apoptosis and necroptosis by SMAC mimetics for the treatment of refractory and relapsed ALL. *Sci Transl Med*. 2016;8(339):339ra370.
  29. Schafer Kellie A, WenHsuan Wu, Colgan Diana; CRISPR gene editing can cause hundreds of unintended mutations; CRISPR-Cas9 editing in vivo, *Nature Methods*.

## 5 CONCLUSÃO

A tecnologia de CRISPR/Cas9 apresenta um vastíssimo potencial para todas as áreas da biologia, desde a agricultura até a terapia de diversas doenças, indo do desenvolvimento de vacinas e fármacos até a edição gênica do próprio paciente. Os principais entraves à ampla utilização dessa tecnologia em larga escala residem no desenvolvimento de vetores eficazes, na diminuição dos riscos associados à clivagem de regiões fora do alvo, aspectos éticos relacionados à manipulação genética humana e a identificação precisa dos genes alvo. Entretanto, o método se encontra em discussão na comunidade científica.

Estudos e experimentos realizados na China, adotam o CRISPR/Cas9 como ferramenta de edição gênica tanto *in vitro* como *in vivo*, para diminuir com eficiência os efeitos oncogênicos das células leucêmicas. Mesmo os resultados não sendo 100%, levantou a possibilidade de que interrompendo a expressão de BCR/ABL a sua tumorigenicidade será revertida.

O uso do CRISPR/Cas9 como ferramenta auxiliar na terapia da LLA ainda se encontra em fase experimental, porém, os resultados *in vitro* que aparecem até então indica que num breve espaço de tempo estará disponível para uso em larga escala, como uma alternativa de baixo custo relativo, alta eficiência e reduzidos efeitos colaterais.

## REFERÊNCIAS

- BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Leucemia**. Rio de Janeiro: INCA, 2021. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia> > . Acesso em: 05 abr. 2021.
- AREND, Marcela Corso. O sistema CRISPR/Cas9 e a possibilidade de edição genômica para a cardiologia. **ABC Cardio**1, Rio de Janeiro, v. 108, n. 1, 2017.
- BAUMANN, A. M. et al. 9-O-acetylation of sialic acids is catalysed by CASD1 via a covalent acetyl-enzyme intermediate. **Nat Commun**. Londres, v. 6, n. 7673, 2015.
- BOIERS, C. et al. A human IPS model implicates embryonic B-myeloid fate restriction as developmental susceptibility to B acute lymphoblastic leukemia-associated ETV6-RUNX1. **Dev Cell**. Cambridge, v. 44, n.3, p. 362-377, 2018.
- BONILHA, Thais; OBADIA, Danielle; VALVESON, Andressa; LAND, Marcelo. Outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia treatment in a single center in Brazil: A survival analysis study. **Cancer Reports**, Hoboken, e1452, p. 1-6, 2021. DOI 10.1002/cnr2.1452.
- BREESE, E. H. et al. Use of genome engineering to create patient specific MLL translocations in primary human hematopoietic stem and progenitor cells. **PLoS One**. San Francisco, v. 10, n. 9, 2015.
- CASTANO, J. et al. Expression of MLL-AF4 or AF4-MLL fusions does not impact the efficiency of DNA damage repair. **Oncotarget**. New York, v.7, n. 21, p. 30440-30452, 2016.
- CHAN, L. N. et al. Metabolic gatekeeper function of B-lymphoid transcription factors. **Nature**. Londres, v. 542, n. 7642, p. 479-483, 2017.
- CHEEVER, et al. **Brunner e Suddarth: Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- COOPER, M. L. et al. An “off-the-shelf” fratricideresistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. **Leukemia**. Baltimore, v. 32, n. 9, p. 1970-1983, 2018.
- EYQUEM, J. et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. **Nature**. Londres, v. 543, n. 7643, p. 113-117, 2017.
- EMBRAPA. A tecnologia CRISPR e suas aplicações no Brasil e no mundo. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Brasília, 1 nov. 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/17689531/a-tecnologia-crispr-e-suas-aplicacoes-no-brasil-e-no-mundo>. Acesso em: 14 dez. 2021.
- KAMPA-SCHITTENHELM, K. M. et AL. Dronabinol has preferential antileukemic activity in acute lymphoblastic and myeloid leukemia with lymphoid differentiation patterns. **BMC Cancer**. Califórnia v.16, n.1, p. 16-25, 2016.
- KIM, E. et al. Ibrutinib inhibits pre-BCR+ B-cell acute lymphoblastic leukemia progression by targeting BTK and BLK. **Blood**. New York, v. 129, n. 9, p. 1155-1165, 2017.
- LEGUT, M. et al. CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T cells. **Blood**. New York, v. 131, n.3, p. 311-322, 2018.
- LIU, Yang. et AL. Systemic delivery of CRISPR/Cas9 with PEG-PLGA nanoparticles for chronic myeloid leukemia targeted therapy. **Biomaterials Science**, Cambridge, p. 1592-

1603, 2018.

MCCOMB, S. et al. Activation of concurrent apoptosis and necroptosis by SMAC mimetics for the treatment of refractory and relapsed ALL. **Sci Transl Med**. Washington, v.8, n. 339, p. 339-370, 2016.

NAVARRO, J. M. et al. Site- and allele-specific polycomb dysregulation in T-cell leukaemia. **Nat Commun**. Londres, v.6, 2015.

QASIM, W. et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. **Sci Transl Med**. Washington, v. 9, n. 374, 2017.

RAHMAN, S. et al. Activation of the LMO2 oncogene through a somatically acquired neomorphic promoter in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**. New York, v. 129, n. 24, p. 3221-3226, 2017.

RANDHAWA, S. et al. Effects of pharmacological and genetic disruption of CXCR4 chemokine receptor function in B-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**. Oxford, v. 174, n.3, p. 425-436, 2016.

REIMER, J. et al. CRISPR-Cas9-induced t(11;19)/MLL-ENL translocations initiate leukemia in human hematopoietic progenitor cells in vivo. **Haematologica**. Pavia, v. 102, n. 9, p. 1558-1566, 2017.

SCHAFER KELLIE, A.; WENHSUAN, Wu; COLGAN, Diana; CRISPR gene editing can cause hundreds of unintended mutations; CRISPR-Cas9 editing in vivo, **Nature Methods**. New York, 2017.

SONG, Xiangrong *et al.* Delivery of CRISPR/Cas systems for cancer gene therapy and immunotherapy. **Advanced drug delivery reviews**, Amsterdam p. 158-180, 2021.

SOTILLO, E. et al. Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy. **Cancer Discov**. Philadelphia, v. 5, n. 12, p. 1282-1295, 2015.

SWAROOP, Alok *et al.* An Activating Mutation of the NDS2 Histone Methyltransferase Drives Oncogenic Reprogramming in Acute Lymphocytic Leukemia. **Oncogene**, Basingstoke, v. 38, n. 5, p. 671-686, 2019.

TAKAHASHI, K. et al. Anti-leukemic activity of bortezomib and carfilzomib on B-cell precursor ALL cell lines. **PLoS One**. San Francisco, v. 12, n.12, 2017.

VERCRUYSSSE, T. et al. The second-generation Exportin-1 inhibitor KPT-8602 demonstrates potent activity against acute lymphoblastic leukemia. **Clin Cancer Res**. Nova Jersey, v.23, n. 10, p. 2528-2541, 2017.

XU, Lei *et al.* CRISPR-Edited Stem Cells in a Patient with HIV and Acute Lymphocytic Leukemia. **The new england journal of medicine**. Boston, v. 381, n. 13, p. 1240-1247, 2019.

## ANEXO A – NORMAS DE SUBMISSÃO DO JORNAL MEMORIAL DA MEDICINA

### AREA/SESSÃO

ISSN 2674-7103 (online)

Tipo

de trabalho

**Título em português, centralizado, negrito, fonte 20,  
até 100 caracteres**

***Título em inglês, centralizado, negrito, itálico, fonte 16***

Autor<sup>1</sup>, Coautores<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Vínculo, cidade, estado, país

### Resumo

Até 200 palavras sem divisão de tópicos, texto direto sem parágrafos.

Palavras-chaves: de três a cinco palavras

### Abstract

Keywords

### Introdução

Scientific progress is mainly linked to scientific publications; this is no different in neurosurgery. Articles accepted in journals with high impact factor suggest a greater international prestige, influencing members of the various Societies of Neurosurgery. Thus, disseminating new knowledge, stimulating new ideas, and incorporating innovative approaches in the daily practice of the neurosurgeon. We are living in an era with high production of scientific knowledge, demanding from the scientific community better forms of communication for registration and

dissemination of the new.<sup>1, 2 ou 1-5(caso queira citar 1,2,3,4 e 5)</sup>

**Métodos** (tópico utilizado apenas em alguns tipos de trabalhos)

**Resultados** (tópico utilizado apenas em alguns tipos de trabalhos)

Se houver subtítulos, escrever em itálico.

**Discussão** (tópico utilizado apenas em alguns tipos de trabalhos)

Se houver subtítulos, escrever em itálico.

## Conclusão

## Referências

1. Bohl MA, Ponce FA (2017) Assessing the relevancy of highly cited works in neurosurgery. World Neurosurg 104:927-938.

Autor para correspondência  
Nome completo  
e-mail