



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PAULO VIDAL CAMPREGHER

Identificação e caracterização molecular de duas fusões gênicas recorrentes em
Leucemia Mielóide Aguda: ETV6-ANLN e NPM1-HAUS1

*Identification and Molecular Characterization of two recurrent gene fusions in Acute
Myeloid Leukemia: ETV6-ANLN and NPM1-HAUS1*

CAMPINAS

2016

PAULO VIDAL CAMPREGHER

Identificação e caracterização molecular de duas fusões gênicas recorrentes em
Leucemia Mielóide Aguda: ETV6-ANLN e NPM1-HAUS1

*Identification and Molecular Characterization of two recurrent gene fusions in Acute
Myeloid Leukemia: ETV6-ANLN and NPM1-HAUS1*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas , área de
concentração Patologia Clínica

*Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences of the University of
Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of
Doctor of Philosophy in Medical Sciences, with focus in Clinical
Pathology*

ORIENTADOR: FERNANDO FERREIRA COSTA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO PAULO VIDAL CAMPREGHER, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C158i Campregher, Paulo Vidal, 1974-
Identificação e caracterização molecular de duas fusões gênicas
recorrentes em leucemia mielóide aguda : ETV6-ANLN e NPM1-HAUS1 /
Paulo Vidal Campregher. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Fernando Ferreira Costa.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Leucemia mieloide aguda. 2. Fusão gênica. 3. Translocação genética. I.
Costa, Fernando Ferreira, 1950-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Identification and molecular characterization of two recurrente
gene fusions in acute myeloid leukemia : ETV6-ANLN and NPM1-HAUS1

Palavras-chave em inglês:

Leukemia, Myeloid, Acute

Gene fusion

Translocation, Genetic

Área de concentração: Patologia Clínica

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Fernando Ferreira Costa [Orientador]

Patricia Severino

Fábio Rodrigues Kerbauy

Erich Vinicius de Paula

Kleber Yotsumoto Fertrin

Data de defesa: 20-07-2016

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

PAULO VIDAL CAMPREGHER

ORIENTADOR: FERNANDO FERREIRA COSTA

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA**
- 2. PROF. DR. KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN**
- 3. PROF. DR. FÁBIO RODRIGUES KERBAUY**
- 4. PROF. DR. PATRÍCIA SEVERINO**
- 5. PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, área de concentração em Patologia Clínica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DATA DA DEFESA: 20/07/2016

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu avô Miro, cientista autodidata à sua maneira, que me transmitiu parte de sua curiosidade e a todos os comprometidos com o desafio da invenção do conhecimento, e que, mesmo sabendo que este só pode corresponder de forma imperfeita e inexata à suposta realidade das coisas, seguem trabalhando na criação de estórias que, espera-se, tornem melhores os nossos dias.

Agradecimentos

Agradeço a todos os professores que me ensinaram medicina e hematologia, em especial aos Drs. Fernando Costa, Valder Arruda, Fátima Sonati, Irene Metze, Sara Saad, Katia Pagnano, Afonso Vigorito, Celso Guerra, Luiz Gastão Rosenfeld, Edus Warren III, Mary Flowers, Joachim Deeg, Nelson Hamerschlak, Giuseppe Dioguardi e outros não citados aqui.

Agradeço a meu pai Carlos, minha mãe Lauria, minha irmã Marília, ao Cecílio e à Sueli, que me ajudaram na criação de mim mesmo.

Agradeço à minha mulher Aline pelo amor, apoio, carinho e por estar a meu lado na aventura que é viver esta vida.

RESUMO

Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica associada a alta morbidade e mortalidade. Os mecanismos genômicos causadores da LMA são diversos e incluem mutações em ponto, inserções, deleções, alterações do número de cópias, na metilação e translocações cromossômicas. Enquanto os genes envolvidos nas translocações cromossômicas mais frequentemente encontradas em LMA já tenham sido identificados, ainda existem dezenas de translocações cromossômicas recorrentes cujos genes envolvidos nos pontos de quebra cromossômicos não são conhecidos. Esta identificação é essencial para a melhor compreensão dos mecanismos da leucemogênese e muitas vezes podem ter um impacto clínico, modificando a estratificação prognóstica ou a conduta terapêutica. No presente trabalho, através da técnica de sequenciamento de DNA de nova geração, identificamos os genes envolvidos em duas translocações cromossômicas recorrentes em LMA: t(7;12)(p15;p13) e t(5;18)(q35;q21) que levam aos genes de fusão *ETV6-ANLN* e *NPM1-HAUS1* respectivamente. A fusão *ETV6-ANLN* justapõe o exon 1 do gene *ETV6* aos exons 2 a 25 do gene *ANLN*, gerando uma proteína bastante similar ao *ANLN* selvagem. Esta fusão gênica é expressa em precursores hematopoiéticos CD34+ e nas linhagens granulocítica e linfóide T, tendo provavelmente ocorrido em uma célula tronco hematopoiética ou em um precursor comum linfóide e mielóide. A fusão *NPM1-HAUS1* justapõe os exons 1 a 11 do gene *NPM1* ao exon 9 do gene *HAUS1*, gerando uma proteína similar ao *NPM1*, porém com a presença de um sinal de exportação nuclear na porção C-terminal da proteína. Como consequência, a proteína híbrida *NPM1-HAUS1* localiza-se no núcleo e no citoplasma, ao contrário da *NPM1* selvagem que tem localização exclusivamente nuclear. Como a localização citoplasmática da proteína *NPM1* é leucemogênica em outros contextos, esse é provavelmente o mecanismo leucemogênico inicial associado a esta translocação cromossômica. Em conclusão, nós identificamos e caracterizamos duas novas fusões gênicas recorrentes em LMA.

Palavras-chave:

Leucemia Mielóide Aguda. Translocação genética. Fusão gênica.

ABSTRACT

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a neoplastic myeloid disease characterized by progressive substitution of normal hematopoiesis by leukemic blasts that is associated with high morbidity and mortality. AML is a genomic disease caused by distinct genomic mechanisms such as single nucleotide substitutions, insertions, deletions, copy number variations and chromosomal translocations. While the genes involved in common chromosomal translocations have been well studied, there are several recurrent chromosomal translocations for which the affected genes have not been characterized. The identifications of such genes is essential for better understanding of AML pathophysiology and has the potential to improve diagnostic, prognostic and the therapeutic approach of patients harboring such chromosomal translocations. In the present study we have identified the genes involved in two recurring chromosomal translocations in AML by means of next generation DNA sequencing: t(7;12)(p15:p13) and t(5;18)(q35;q21) that lead to the gene fusions *ETV6-ANLN* and *NPM1-HAUS1* respectively. The gene fusion *ETV6-ANLN* juxtaposes *ETV6* exon 1 to *ANLN* exons 2 to 25, culminating with a putative protein highly similar to wild type *ANLN*. This gene fusion is expressed in hematopoietic precursors, granulocytes and T cell lymphocytes, probably occurring in a hematopoietic stem cell or a common myeloid lymphoid precursor. The gene fusion *NPM1-HAUS1* leads to the fusion of *NPM1* exons 1 to 11 to *HAUS1* exon 9, generating a putative protein similar to wild type *NPM1* with the addition of a novel nuclear export signal (NES) in the C-terminal region of the protein. Regarding subcellular localization, *NPM1-HAUS1* localizes in the nucleus and cytoplasm in opposition to wild type *NPM1* that localizes exclusively in the nucleus. Since *NPM1* cytoplasmic localization has been shown to be associated with leukemogenesis, this is probably the neoplastic mechanism associated with this gene fusion. In conclusion, we have described and characterized two novel gene fusions associated with recurrent chromosomal translocations in AML.

Key words: Acute Myeloid Leukemia. Chromosomal Translocation. Gene Fusion.

Sumário

Introdução.....	10
Objetivos.....	21
Resultados 1.....	22
Resultados 2.....	33
Discussão Geral.....	47
Conclusão.....	52
Referências.....	53
Apêndice 1.....	59
Anexo 1.....	63
Anexo 2.....	64
Anexo 3.....	65

Introdução

O câncer afeta cerca de 14,9 milhões de pessoas em todo o mundo e causa a morte de mais de 8 milhões de pessoas anualmente [1]. Muitas evidências sugerem que o câncer é uma doença genômica. Neste modelo, o que leva uma célula saudável a se transformar em neoplásica é o acúmulo de alterações genômicas oncogênicas (que levam ao desenvolvimento do câncer) [2]. Os principais achados que corroboram esta teoria são: A) Células cancerígenas de diferentes pacientes possuem alterações genômicas recorrentes. B) Estas alterações, quando artificialmente inseridas em modelos celulares ou em modelos animais culminam com células que apresentam fenótipo neoplásico. C) Terapias que tem como alvo o produto proteico de diversas das alterações gênicas recorrentes levam ao controle, definitivo ou temporário, do câncer. Desta forma, o entendimento dos mecanismos genômicos causadores do câncer é essencial para o controle desta doença, seja através da prevenção, diagnóstico e intervenção precoce ou tratamento.

As alterações genômicas oncogênicas podem ser divididas entre as que não alteram a sequência do DNA, ou alterações epigenéticas e as que modificam a sequência do DNA. Estas últimas podem ser divididas em: A) Mutações em ponto, B) Inserções e deleções (Indels), C) Alterações do número de cópias, como amplificações ou deleções gênicas e cromossômicas D) Rearranjos ou fusões gênicas. No câncer, cada gene pode ser acometido por distintas alterações genômicas. Por exemplo, supressores tumorais como *BRCA1* [3] ou *TP53* [4] normalmente são afetados por mutações em ponto, indels e deleções gênicas, ao passo que oncogenes como *EGFR* [5] ou *ERBB2* [6] podem sofrer mutações em ponto, indels, rearranjos ou amplificações gênicas. Enquanto algumas lesões genômicas são específicas de determinados subtipos de câncer, como por exemplo, inserções no exon 12 do gene *NPM1* em leucemia mieloide aguda (LMA) [7] e a fusão gênica *TMPRSS2-ERG* em câncer de próstata [8], outras alterações genômicas ocorrem em diversos tipos de tumores, como *BRAF* V600E que está presente em uma parte dos pacientes portadores de melanoma maligno [9], adenocarcinoma de pulmão [10], tricoleucemia [11], etc.

O advento do sequenciamento de DNA de nova geração (NGS) possibilitou um avanço sem precedentes na abrangência e na velocidade de identificação das alterações genômicas presentes em cada tumor [12]. Atualmente é possível identificar todas as alterações oncogênicas presentes em um tumor em um período curto de tempo (cerca de 1 a 2 semanas) e por um custo em constante declínio [13]. Isso levou a diversos projetos científicos que caracterizaram todas as alterações frequentes presentes na maior parte dos tipos de câncer [14], adenocarcinoma de pulmão [15], câncer de mama [16], síndrome mielodisplásica [17] e etc. Contudo a análise bioinformática dos dados gerados através do NGS ainda exige além de um aparato computacional sofisticado, a curagem técnica feita por profissionais especializados e a integração de uma quantidade significativa de informação [18, 19] .

Atualmente há uma tendência em classificar cada tumor com base nas suas alterações genômicas [20]. Esta abordagem, apesar de ainda não universal, tem se mostrado mais eficaz no diagnóstico, estratificação prognóstica e na definição terapêutica, quando comparada com a análise histológica isolada [21]. Exemplos de sucesso desta abordagem são, a presença da fusão gênica *BRC-ABL1* como marcador diagnóstico em leucemia mielóide crônica (LMC) [22], a utilização da mutação no gene *FLT3* como fator prognóstico relevante em LMA [23] e a presença de mutações em *KRAS* e *BRAF* essenciais para a definição terapêutica em câncer de cólon [24] e melanoma maligno [25] respectivamente.

Além disso, a identificação das alterações genômicas essenciais para o surgimento e manutenção de cada tumor, vem permitindo o desenvolvimento da oncologia e hematologia de precisão, onde cada paciente é tratado de acordo com as alterações genômicas presentes em seu tumor [26]. Diversos tratamentos em uso atualmente, como os inibidores de tirosina quinase utilizados em LMC [27] e inibidores de *BRAF* e *MEK* para tratamento de pacientes portadores de melanoma maligno com a mutação *BRAF V600E* [28], se baseiam neste princípio. Corroborando a importância da classificação molecular na definição terapêutica, a utilização de terapias alvo direcionadas a alterações moleculares específicas se mostram, por vezes, eficazes em distintos tipos tumorais, uma vez que a alteração genômica, para a qual o tratamento é direcionado, esteja presente. Neste contexto, a utilização de inibidores de *BRAF*,

aprovados para o tratamento de melanoma maligno, também se mostra eficaz em tricoleucemia [29], histiocitose [30] e adenocarcinoma de pulmão [31], quando a mutação *BRAF* V600E está presente.

Dentre as neoplasias hematológicas, as leucemias agudas estão associadas a altas morbidade e mortalidade e constituem um desafio médico ainda não solucionado. Leucemias agudas são neoplasias da linhagem hematopoiética que podem ter origem no compartimento mielóide ou linfóide. LMA é uma neoplasia mielóide da célula tronco hematopoiética de alta morbi-mortalidade caracterizada pela substituição da hematopoiese normal por células blásticas, levando ao desenvolvimento de anemia, neutropenia, plaquetopenia, e presença variável de blastos no sangue periférico. Atualmente a LMA é classificada de acordo com a Organização Mundial de Saúde em 7 grandes grupos: 1) LMA com alterações genéticas recorrentes, 2) LMA com alterações relacionadas a mielodisplasia, 3) LMA relacionada a terapia, 4) LMA não especificada, 5) Sarcoma mielóide, 6) Proliferação mielóide relacionada a síndrome de Down e 7) Neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitóides [32]. A estratificação prognóstica LeukemiaNet de pacientes portadores de LMA é feita de acordo com a presença ou ausência de alterações citogenéticas e moleculares recorrentes, sendo fundamental na definição da estratégia terapêutica a ser adotada em cada caso [33]. Neste sistema os pacientes são classificados em quatro grupos de acordo com o risco de recaída e morte por LMA. Ver tabela 1. A proporção de pacientes vivos em três anos é de 66%, 28%, 45% e 12% nos grupos favorável, intermediário-1, Intermediário-2 e de alto risco respectivamente [34].

Tabela 1. Classificação Prognóstica LeukemiaNet de Leucemia Mielóide Aguda com base nas alterações genéticas presentes nos blastos leucêmicos

Grupo Genético	Subtipos
Favorável	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	<i>NPM1</i> mutado sem <i>FLT3</i> -ITD (Cariótipo normal)
	<i>CEBPA</i> mutado (Cariótipo normal)
Intermediário-I	<i>NPM1</i> mutado e <i>FLT3</i> -ITD (Cariótipo normal)
	<i>NPM1</i> selvagem e <i>FLT3</i> -ITD (Cariótipo normal)
	<i>NPM1</i> selvagem sem <i>FLT3</i> -ITD (Cariótipo normal)
Intermediário-II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i>
	Outras anomalias citogenéticas não classificadas como favoráveis ou adversas
Adverso	inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i>
	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> rearranjado
	-5 or del(5q); -7; abnl(17p); cariótipo complexo

Recentemente, a análise genômica de 200 pacientes portadores de LMA de novo (sem história prévia de doença mielóide) mapeou os principais mecanismos genômicos envolvidos na gênese de LMA [14]. Dentre diversos achados, foi possível estabelecer uma classificação das alterações moleculares essenciais no desenvolvimento da LMA de novo. Nove grupos de alterações genômicas foram identificados neste grupo de pacientes. Ver tabela 2.

Além disso este estudo revelou alterações gênicas que co-ocorrem com frequência maior que a esperada ao acaso, como mutações em *FLT3*, *NPM1* e *DNMT3A*, assim como lesões gênicas que co-ocorrem com frequência menor que a esperada ao acaso, como fusões envolvendo *MLL* e mutações em

DNMT3A por exemplo, revelando padrões mutacionais específicos que provavelmente colaboram no processo de leucemogênese.

Este mesmo estudo identificou fusões gênicas em 80 de 179 (44%) amostras analisadas através de análise de transcriptoma. Enquanto muitas fusões eram conhecidas e recorrentes em LMA, 15 novas fusões em fase de leitura (in frame) e 42 fusões com mudança de fase de leitura (frameshift) foram identificadas [14], sugerindo a existência de um grande número de fusões gênicas ainda por serem identificadas.

Tabela 2. Alterações Genéticas Somáticas Recorrentes Presentes em pacientes portadores de LMA

Alterações Genéticas em LMA	Exemplos
Fusões envolvendo fatores de transcrição	PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1
Mutação em NPM1	NPM1
Alterações em supressores tumorais	TP53, PHF6
Alterações em genes envolvidos na metilação do DNA	DNMT3A, TET2
Ativação da sinalização intracelular	FLT3, KIT
Mutações em fatores de transcrição mielóides	CEBPA, RUNX1
Alterações em genes envolvidos em modificações de cromatina	ASXL1, EZH2
Alterações em coesinas	SMC1A, STAG2
Alterações em genes envolvido no splicing de RNA	U2AF1, SF3B1

Fusões gênicas são genes híbridos formados por dois genes previamente separados que ocorrem como resultado de translocações, deleções, inserções ou inversões cromossômicas [35]. Fusões gênicas tem um papel fisiopatológico

fundamental na gênese do câncer e principalmente nas neoplasias hematológicas. A descoberta do cromossomo Filadelfia em pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) [36], a demonstração da primeira translocação cromossômica, a t(8;21), presente em LMA [37] e a posterior caracterização molecular da fusão gênica *BCR-ABL1* resultante da t(9;22) [38, 39], abriram caminho para a posterior identificação e caracterização de eventos moleculares análogos em diversos pacientes. Atualmente, existem centenas de translocações cromossômicas e fusões gênicas descritas em tumores sólidos e neoplasias hematológicas [40], e estas tem um papel central na definição diagnóstica, prognóstica e terapêutica destes pacientes.

O mecanismo pelo qual uma translocação cromossômica leva ao fenótipo neoplásico não é único. Existem três mecanismos moleculares oncogênicos mais comuns resultantes de translocações cromossômicas: O primeiro mecanismo é a desregulação gênica sem a geração de proteína híbrida: Esse é o mecanismo clássico observado em neoplasias linfóides B. Nestes casos, a translocação cromossômica coloca um oncogene sob a influência de um promotor ativo na célula em questão, levando à hiperexpressão do oncogene e consequente neoplasia. Exemplos deste mecanismo são as translocações t(8;14)(q24;q32), t(11;14)(q13;q32) e t(14;18)(q32;q21) que justapõem ao promotor do gene da cadeia pesada da imunoglobulina os oncogenes *MYC*, *CCND1* e *BCL2* respectivamente, e que causam o linfoma de Burkitt [41], da zona do manto [42] e folicular [43] respectivamente. O segundo mecanismo é a criação de um gene quimérico como resultado da união de dois genes e consequente criação de uma proteína híbrida: Esse é o mecanismo mais frequentemente encontrado, sendo bastante comum nas leucemias agudas e diversos tumores sólidos. Normalmente os pontos de quebra ocorrem em regiões intrônicas dos dois genes, e leva à formação de uma proteína híbrida com funções oncogênicas. Apesar de genes com atividades biológicas diversas se encontrarem rearranjados em translocações cromossômicas, as duas classes mais frequentemente recombinações são genes envolvidos com controle da transcrição e tirosina quinases [44]. Os 4 genes mais comumente rearranjados em LMA de novo, estando alterados em cerca de 30% dos casos [45], são todos envolvidos com controle da transcrição, e como consequência do rearranjo

formam proteínas híbridas com diversos possíveis genes parceiros. São eles *RARA*, *RUNX1*, *CBFB* e *KMT2A (MLL)* [45]. Enquanto os genes *KMT2A* e *RUNX1* tem dezenas de genes parceiros de translocação e se encontram rearranjados tanto em LMAs quanto em leucemias linfóides agudas (LLA) [46, 47], rearranjo do gene *CBFB* foi descrito somente com o gene *MYH11* em LMA [48] e fusões envolvendo *RARA* ocorrem com um número limitado de parceiros (até o momento 9 genes parceiros foram descritos) e é fortemente associado à leucemia promielocítica aguda (LPA) [49]. É importante ressaltar que a presença das translocações t(16;16)(p13;q22) e t(8;21)(q22;q22), que envolvem os genes *CBFB* e *RUNX1* respectivamente, estão associadas a prognóstico favorável em LMA e atualmente pacientes com estas translocações não são tratados com transplante de célula tronco hematopoiética em primeira remissão [50]. Além disso, a vasta maioria dos pacientes portadores de LPA, portadores de rearranjo envolvendo *RARA*, apresentam excelente resposta clínica ao tratamento com ácido transretinóico, trióxido de arsênio e quimioterápicos antracíclicos, fazendo deste subtipo, aquele com a maior taxa de cura dentre todos os tipos de LMA [51]. O terceiro mecanismo é a Inativação gênica: Este mecanismo é mais raro e leva, como consequência do rearranjo cromossômico, à deleção ou inativação de um suposto supressor tumoral, sendo apenas mais uma forma de inativação, além dos mecanismos mais frequentes de mutações e alterações do número de cópias [52, 53].

Fusões envolvendo diversos outros genes, além dos 4 mencionados, são descritas com menor frequência em LMA. Enquanto algumas anomalias cromossômicas e sua consequente alteração gênica são recorrentes (ocorrendo em pelo menos 2 casos da mesma doença), outras alterações ocorrem de forma esporádica em apenas 1 paciente documentado na literatura médica. Atualmente, pelo menos 1.785 translocações foram descritas em LMA, das quais 267 são recorrentes, e dentre os genes envolvidos nestas translocações, somente 109 foram identificados [40]. O número reduzido de genes quando comparados ao número de fusões, se deve ao fato de que alguns genes como *ETV6*, *MLL*, e etc, encontram-se rearranjados com diversos parceiros [40]. Esses números ilustram a complexidade associada a rearranjos gênicos em LMA e a vasta quantidade de material de estudo ainda disponível nesta área. Enquanto

os genes envolvidos em grande parte das alterações recorrentes descritas já foram identificados, em outras translocações recorrentes, detectadas através de análise citogenética, os pontos de quebra cromossômico, assim como os genes envolvidos nos rearranjos ainda são desconhecidos. A identificação destes genes e posterior elucidação dos mecanismos leucemogênicos em questão tem grande potencial prático no cuidado dos pacientes portadores destes rearranjos, podendo muitas vezes levar a formas de tratamento personalizados eficazes. Um exemplo disso foi a identificação de rearranjos envolvendo os receptores tirosina-quinases *PDGFRA*, *PDGFRB* e *FGFR1* em neoplasias mielóides associadas com eosinofilia [54] e a posterior demonstração de que uma droga previamente aprovada para tratamento de LMC, o imatinib, mas que também possuía atividade inibitória sobre *PDGFRA* e *PDGFRB* era altamente eficaz no tratamento destes grupos de pacientes [55, 56]. Atualmente a pesquisa de rearranjos envolvendo estes genes é mandatória para pacientes com quadro clínico-laboratorial sugestivo e o prognóstico é ótimo quando fusões em *PDGFRA* ou *PDGFRB* são identificadas. Atualmente ainda não existe uma terapia alvo eficaz para pacientes portadores de rearranjos envolvendo *FGFR1* [54].

A identificação dos genes envolvidos nos pontos de quebra de translocações cromossômicas avançou muito do ponto de vista técnico, em anos recentes, com a utilização da tecnologia de NGS [57]. Se no passado a caracterização molecular de uma translocação cromossômica exigia meses de trabalho laboratorial intenso [58], atualmente é possível identificar os genes envolvidos em uma fusão gênica em um período de semanas [59]. A tecnologia de NGS gera de milhões a bilhões de sequências de ácidos nucleicos em um único experimento e permite uma análise de todo o genoma ou transcriptoma a um custo relativamente baixo [60]. Três abordagens experimentais são as mais utilizadas para a caracterização de novas fusões gênicas. Ver tabela 3.

Tabela 3. Comparação entre os três métodos de análise genômica utilizados para caracterização de fusões gênicas.

	Genoma Completo	Transcriptoma	Painel Direcionado
Preço	alto	baixo	baixo
Identificação do ponto de quebra	sim	raramente	raramente
Tempo de sequenciamento e análise	longo	curto	curto
Necessidade computacional	alta	moderada	pequena

A primeira abordagem é o sequenciamento de genoma completo [61]: Esta estratégia é a mais cara, demorada, que exige a maior capacidade computacional e portanto menos custo-efetiva, pois a quantidade de bases a serem sequenciadas é muito vasta (cerca de 3×10^9). Porém esta é a técnica que permite o mapeamento mais preciso dos pontos de quebra pois gera sequências híbridas que serão mapeadas em regiões distantes do genoma, permitindo a identificação do evento cromossômico ao nível de pares de base. Através desta abordagem é possível identificar fusões cromossômicas previamente desconhecidas pertencentes aos três mecanismos moleculares descritos anteriormente (desregulação gênica, criação de gene quimérico e inativação gênica) e que ocorram em qualquer região do genoma estudado. Este método foi bem sucedido na identificação de dezenas de novas fusões gênicas nos últimos anos [62, 63]. A segunda abordagem possível é o sequenciamento de transcriptoma [64]: Esta modalidade de sequenciamento gera sequências oriundas do RNA mensageiro (RNA_m) presente na amostra. Como o “espaço” a ser sequenciado é muito menor, pois não contém regiões intrônicas ou intergênicas, o tempo para obtenção dos resultados, o custo e a estrutura computacional necessárias são menores do que no sequenciamento de genoma completo. Esta abordagem só é capaz de detectar fusões gênicas que sejam transcritas e gerem um transcrito anômalo, não sendo adequada para o estudo de rearranjos que levem à inativação gênica ou que causem desregulação gênica sem a criação de um RNA e proteína híbridos. Além disso, na maioria dos

casos não permite a identificação precisa dos pontos de quebra envolvidos no rearranjo ao nível genômico, uma vez que a grande maioria dos rearranjos ocorre em regiões intrônicas, que não são sequenciadas nesta abordagem. Como resultado deste tipo de sequenciamento geralmente identifica-se o transcrito híbrido, e com base nesta informação é possível deduzir em quais introns dos dois genes ocorreu o ponto de quebra. Um argumento em favor do sequenciamento de RNAm é que existe um número grande de rearranjos presentes em células cancerígenas, mas o significado funcional da grande maioria deles é desconhecido, porém, uma vez que o rearranjo leve à formação de um transcrito híbrido, a chance de que seja relevante para a oncogênese é muito maior [65]. Outra vantagem desta método é a detecção de transcritos variantes oriundos de uma mesma fusão. Deve-se, no entanto, prestar especial atenção ao tecido estudado nestes casos, pois cada tipo celular tem seu próprio padrão de expressão gênica e é possível que a expressão de uma fusão gênica seja específica de determinado tipo celular, principalmente no tecido hematopoiético, que é composto por linhagens celulares diferentes com padrões de expressão variados. Diversas fusões gênicas foram descobertas através deste método nos últimos anos [64, 66]. A terceira abordagem utilizada para detecção de fusões gênicas é o sequenciamento direcionado de RNAm ou de DNA [67, 68]: Este método é semelhante aos dois descritos acima porém ao invés de sequenciar todo o genoma ou transcriptoma, neste caso, apenas regiões de interesse são sequenciadas. As vantagens são o custo, necessidade de estrutura computacional e tempo de análise reduzidos, porém somente fusões que ocorram nas regiões estudadas serão detectadas. Vale ressaltar que nos casos em que o preparo da biblioteca de DNA é feito através de captura híbrida, assim como nas análises de genoma completo e transcriptoma, é possível identificar novos genes parceiros fundidos aos genes estudados. Muitos rearranjos previamente desconhecidos foram descobertos através desta abordagem recentemente [69, 70].

Uma vez definida a estratégia de sequenciamento ainda há o desafio da análise bioinformática a ser empregada para detecção das fusões gênicas. Diversos softwares foram desenvolvidos nos últimos anos para análise de dados gerados através de sequenciamento de DNA e RNAm com o objetivo de identificar fusões

gênicas e de descobrir os pontos de quebra envolvidos em rearranjos cromossômicos [59]. No entanto diversos desafios ainda persistem na escolha do melhor método a ser utilizado para a busca de fusões gênicas. Dentre os principais problemas ainda persistentes temos uma alta taxa de resultados falso positivos e falso negativos. O pesquisador trabalhando nesta área deve ter essas limitações em mente, e muitas vezes a utilização de mais de uma ferramenta computacional para a detecção e caracterização dos rearranjos cromossômicos é fundamental. Além disso, a posterior validação dos achados através de métodos complementares se faz necessária na maioria dos casos.

Estudos multicêntricos que tem como objetivo a caracterização molecular de neoplasias são raros em nosso país. O presente trabalho foi desenvolvido no contexto de um estudo multicêntrico envolvendo 11 centros parceiros em todo Brasil, denominado LMA Brasil, que tinha como objetivo global a caracterização genômica de pacientes portadores de neoplasias mielóides. Coletamos amostras de cerca de 600 pacientes até o momento. Um dos objetivos específicos deste projeto era o de descobrir novas alterações genéticas e moleculares que possam contribuir para a patogênese da LMA. Next contexto decidimos caracterizar os pontos de quebra de translocações cromossômicas recorrentes cujos pontos genômicos de quebra não houvessem ainda sido identificados. Diversos pacientes portadores de translocações não caracterizadas foram incluídos no estudo. Para a realização do presente trabalho, foram escolhidos dois pacientes, que apresentavam translocações cromossômicas recorrentes em LMA cujos genes envolvidos não haviam sido caracterizados. Para maiores detalhes a respeito do projeto LMA Brasil ver apêndice 1.

Objetivos

1.A - Identificar os genes envolvidos nos pontos de quebra da translocação recorrente t(7;12)(p15;p13) presente em uma paciente portadora de LMA secundária a mielofibrose primária (MFP)

1.B – Avaliar a expressão do transcrito híbrido em células hematopoiéticas de pacientes portadores de neoplasias mielóides e indivíduos hígidos

2.A - Identificar os genes envolvidos nos pontos de quebra da translocação recorrente t(5;18)(q35;q21) presente em uma paciente portadora de LMA de novo ao diagnóstico

2.B – Caracterizar a consequência funcional desta fusão gênica

Resultados 1

Artigo publicado na revista Molecular Cancer

Mol Cancer. 2015 Nov 19;14(1):197. doi: 10.1186/s12943-015-0471-5.

**Identification of *ANLN* as *ETV6* partner gene in recurrent t(7;12)(p15;p13):
a possible role of deregulated *ANLN* expression in leukemogenesis**

Running head: A novel fusion gene in leukemogenesis

Paulo Vidal Campregher¹, Welbert de Oliveira Pereira², Bianca Lisboa², Renato Puga², Ricardo Helman³, Mariana Miyagi², Evelyn Helena Ascendino da Mata², Tarcila Santos Datoguia², Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso³, Nydia Strachman Bacal³, Jeffrey S. Ross⁴, Siraj Ali⁵, Vincent Miller⁵, Fernando Ferreira Costa⁶, Nelson Hamerschlag³, Fabio Pires de Souza Santos³

¹Departments of Hematology and Clinical Pathology, and Research Institute, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil. Foundation Medicine, Cambridge, MT. Department of Hematology, University of Campinas (Hemocentro - Unicamp), Brazil.

²Research Institute, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil.

³Department of Hematology, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil.

⁴Foundation Medicine, Cambridge, MT. Department of Pathology and Laboratory Medicine, Albany Medical College, Albany, NY USA.

⁵Foundation Medicine, Cambridge, MT.

⁶Department of Hematology, University of Campinas/Hemocentro - Unicamp, Brazil.

Corresponding author:

Paulo Vidal Campregher

Centro de Pesquisa Clínica, Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein

Av. Albert Einstein, 627/520, São Paulo (SP), Brazil, CEP 05256-900

Telephone: (55 11) 3773-6590 and 2151-4446

Fax: (55 11) 2151-3522

E-mail: paulo.campregher@einstein.br

Competing interests: Paulo Vidal Campregher, Jeffrey S. Ross, Siraj Ali and Vincent Miller are employees of Foundation Medicine.

ABSTRACT

The *ETV6* gene encodes an ETS family transcription factor that is involved in a myriad of chromosomal rearrangements found in hematological malignancies and other neoplasms. A recurrent *ETV6* translocation, previously described in patients with acute myeloid leukemia (AML),^{1,2} whose partner has not been identified is t(7;12)(p15;p13). We herein report that the t(7;12)(p15;p13) fuses *ETV6* to *ANLN*, a gene not previously implicated in the pathogenesis of hematological malignancies, and we demonstrate that this translocation leads to high expression of the fusion transcript in the myeloid and lymphoid lineages.

Keywords: Leukemia, Myeloid, Acute; Gene Fusion; Translocation, Genetic

FINDINGS

Background: Balanced translocations leading to chimeric fusion genes play a major role in the pathogenesis of cancer. *ETV6* is a frequently rearranged gene involved in least 30 fusion genes in myeloid and lymphoid neoplasms.³ In the present work we describe the identification of *ANLN* as a novel *ETV6* fusion partner.

Results: After IRB approval (IRB-25000.179520/2011-36) and signing of consent form, we studied a 40 year-old patient (P005) with diagnosis of *JAK2* V671F-positive primary myelofibrosis (PMF) and karyotype compatible with 46,XX,del(5)(q12q33) since 2010. She had been treated with supportive care and ruxolitinib. In 2013, the patient presented worsening of blood counts and increase in spleen size, suggesting disease progression. A bone marrow biopsy showed an increase in BM fibrosis (grade 3 out of 3) and 9% blasts in the BM aspirate. Chromosomal analysis of BM cells showed 46,XX,del(5)(q12q33),t(7;12)(p15;p13)[20] (**Figure 1a**). The patient was treated with an allogeneic BM transplantation from her HLA-haploidentical sister. Seven months after transplantation she progressed to refractory acute megakaryoblastic leukemia, that presented with two bone marrow blast populations, a CD34 positive (4.9%) and a CD34 negative (49.6%).

At the time of disease progression before transplantation, a sample of her BM aspirate was analyzed by a hybrid-capture-based comprehensive genomic profiling assay (FoundationOne Heme) employing both DNAseq and RNAseq in a CLIA certified laboratory (Foundation Medicine, Cambridge, MA, USA). This method evaluates the entire coding sequence of 405 cancer-related genes, 31 selected introns frequently involved in rearrangements and RNA sequencing of 265 genes commonly fused in cancer. The result revealed three genomic alterations: *JAK2* V617F, *NRAS* G13D and an *ETV6-ANLN* fusion. The fusion breakpoints occurred in intron 1 of both genes, leading to a putative transcript carrying *ETV6* first exon fused to *ANLN* exons 2 to 25. We confirmed the expression of the fused gene by means of cDNA PCR and Sanger sequencing (**Figure 1b**).

ANLN encodes an actin-binding protein essential to cytokinesis that is expressed at low levels in most normal tissues.⁴ The protein encoded by *ANLN*

consists of 1,125 amino acids and contains an actin-binding region (amino acids 231 to 676), an Anilin domain (amino acids 799 – 953), a C-terminal pleckstrin homology domain (amino acids 983 – 1107) and a nuclear localization region (amino acids 1 - 230).^{4,5} The putative protein encoded by the *ETV6-ANLN* fusion described here substitutes the first 6 ANLN amino acids (MDPFTE) by the first 11 *ETV6* amino acids (MSETPAQSSIK), resulting in a protein almost identical to *ANLN*, without disrupting its main functional domains. It is unknown at this time if this change disrupts *ANLN* function. On the other hand, this protein lacks all *ETV6* functional domains. We therefore hypothesized that the leukemogenic mechanism operating in this case could be related to the overexpression of the fusion protein, which can have very similar functional characteristics to wild type *ANLN*.

We thus designed 2 Taqman qPCR assays (Life Technologies) to study the expression level of the fusion gene and also the expression of wild type *ANLN* in healthy volunteer donors and patients with myeloid malignancies. In order to evaluate only the expression of wild type *ANLN* we designed primers complementary to *ANLN* exon 1 and exon 2. Since the fusion gene lacks *ANLN* exon 1, only wild type *ANLN* was amplified. For the fusion assay, primers were complementary to *ETV6* exon 1 and *ANLN* exon 2. We evaluated the expression of both transcripts in the following magnetic bead selected cell populations: granulocytes (CD66b+) from 20 patients with PMF and 8 healthy volunteers, in CD34+ cells from 10 AML patients and on myeloblasts (CD34+), bone marrow mononuclear cells enriched for megakaryoblasts (CD34-), T cells (CD3+) and granulocytes (CD66b+), from P005. All cell populations had > 95% purity.

Expression of wild type *ANLN* was absent in granulocytes from healthy subjects, PMF patients and P005. On the other hand, *ANLN* expression was present in CD34+ cells from a subset of AML patients and in both CD34+ and CD34- mononuclear populations from P005 (**Figure 2a**). These data suggest that wild type *ANLN* is not expressed in mature granulocytes, but only in CD34+ cells from a subset of AML patients. We did not study the expression of *ANLN* in CD34+ cells from healthy donors, therefore we cannot rule out *ANLN* expression in normal CD34+ cells.

On the other hand, the fusion transcript was present in all P005 cell subpopulations (Granulocytes, T lymphocytes, CD34+ blasts and CD34-mononuclear cells), suggesting that the translocation may have occurred in a pluripotent hematopoietic stem cell or an early precursor (**Figure 2b**). As expected, no fusion transcript was detected in other individuals.

While more common in lymphoid malignancies, such as acute lymphoblastic leukemia, *ETV6* translocations are uncommon in myeloid neoplasms. In a study of 9,550 patients with myeloid neoplasms, *ETV6* translocations were found in 0.5% of patients, occurring in only 0.3% of myeloproliferative neoplasms.¹

Since the fusion gene we identified retains only the first exon of *ETV6*, while maintaining the integrity of the *ANLN* gene, we speculate that the oncogenic mechanism can be related to deregulated *ANLN* expression. Indeed, previous studies have reported that *ANLN* is overexpressed in a variety of human cancers such as lung,⁶ breast⁷ and endometrial cancer.⁸ In addition, increased *ANLN* expression has been linked to tumor progression,⁸ and inhibition of *ANLN* in lung cancer cells decreases cell viability and increases cell size and ploidy, probably secondary to defective cytokinesis.⁶ Thus, *ANLN* seems to play an important role in cell division, and increased expression of *ANLN* has been shown to induce DNA synthesis in lung cancer cells.⁶ Similar results have been shown in breast cancer, where inhibition of *ANLN* expression abrogates cell proliferation and colony forming ability of breast cancer cell lines. We are not aware of published data about *ANLN* expression in hematological malignancies, and the precise role of the *ETV6-ANLN* fusion transcript in the pathogenesis of myeloid malignancies with the t(7;12)(p15;p13) translocation still needs to be defined, but we believe that deregulated *ANLN* expression leading to increased cellular proliferation might play a role.

Conclusions: We have demonstrated that the recurrent AML associated translocation t(7;12)(p15;p13) leads to the formation of the novel fusion gene *ETV6-ANLN* that is expressed in the myeloid and lymphoid lineages. To the best of our knowledge this is the first report implicating the actin-binding protein *ANLN* in the pathogenesis of AML and other myeloid neoplasms.

References

1. Haferlach C, Bacher U, Schnittger S, Alpermann T, Zenger M, Kern W, et al. ETV6 rearrangements are recurrent in myeloid malignancies and are frequently associated with other genetic events. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(4):328-337.
2. Yamamoto K, Yakushijin K, Funakoshi Y, Inui Y, Okamura A, Matsuoka H, et al. Biallelic ETV6 rearrangements by recurrent translocations t(7;12)(p15;p13) and t(3;12)(q26.2;p13) in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2011;35(11):e212-214.
3. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Basinko A, De Braekeleer M. ETV6 fusion genes in hematological malignancies: a review. *Leuk Res*. 2012;36(8):945-961.
4. Oegema K, Savoian MS, Mitchison TJ, Field CM. Functional analysis of a human homologue of the Drosophila actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis. *J Cell Biol*. 2000;150(3):539-552.
5. Zhao WM, Fang G. Anillin is a substrate of anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) that controls spatial contractility of myosin during late cytokinesis. *J Biol Chem*. 2005;280(39):33516-33524.
6. Suzuki C, Daigo Y, Ishikawa N, Kato T, Hayama S, Ito T, et al. ANLN plays a critical role in human lung carcinogenesis through the activation of RHOA and by involvement in the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Cancer Res*. 2005;65(24):11314-11325.
7. Zhou W, Wang Z, Shen N, Pi W, Jiang W, Huang J, et al. Knockdown of ANLN by lentivirus inhibits cell growth and migration in human breast cancer. *Mol Cell Biochem*. 2014. [Epub ahead of print]

8. Hall PA, Todd CB, Hyland PL, McDade SS, Grabsch H, Dattani M, et al. The septin-binding protein anillin is overexpressed in diverse human tumors. *Clin Cancer Res.* 2005;11(19 Pt 1):6780-6786.

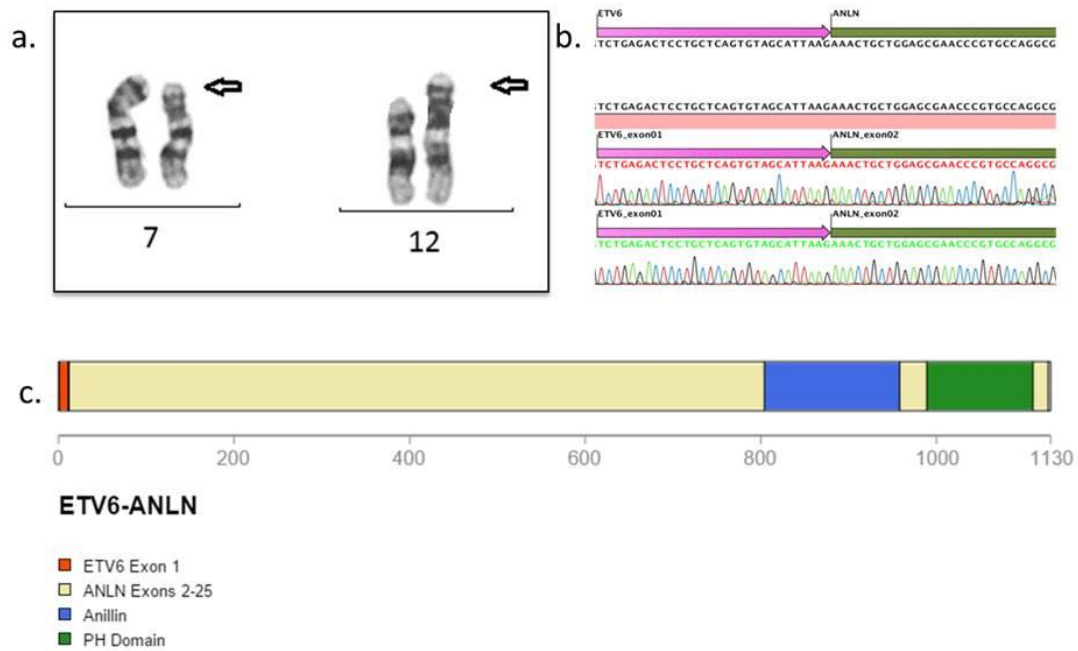
Figures:

Figure 1. t(7;12)(p15;p13) and ETV6-ANLN fusion transcript. (a) Cytogenetic analysis revealing the t(7;12)(p15;p13) (b) Sanger sequencing of the fusion transcript, demonstrating the fusion of ETV6 exon 1 to ANLN exon 2. (c) Putative fusion protein highlighting ETV6 exon 1 and ANLN Anilin and PH domains

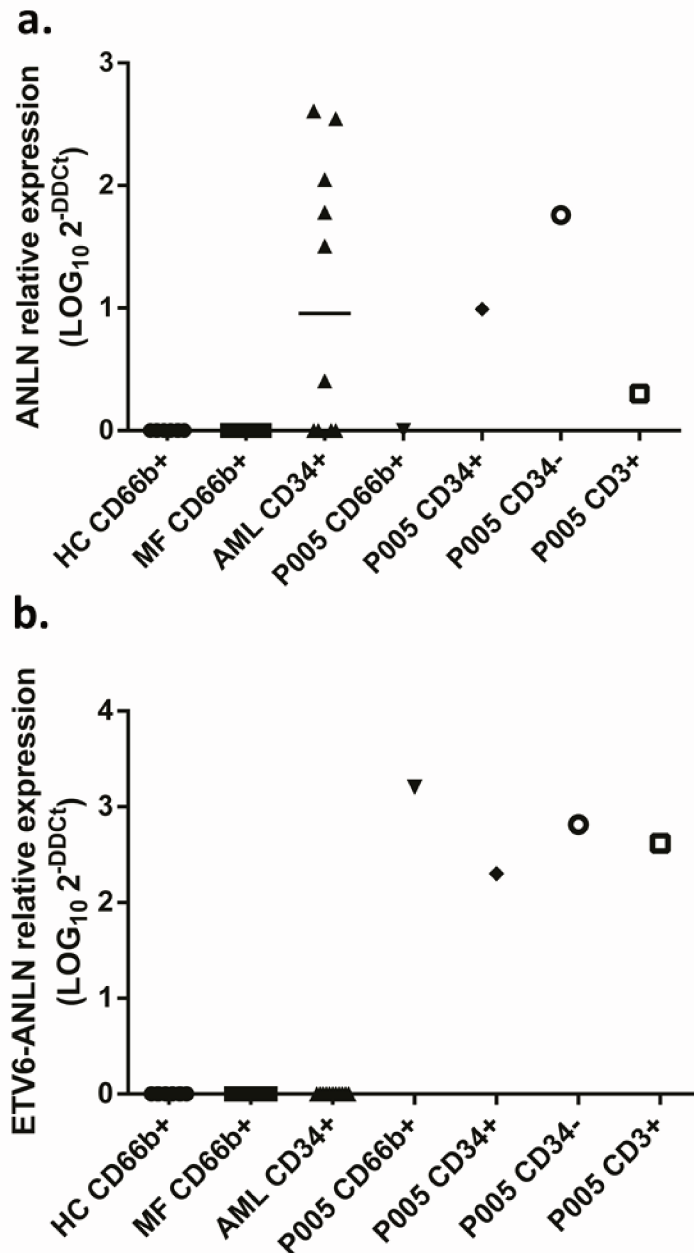


Figure 2. ANLN and ETV6-ANLN expression. (a) qPCR ANLN wild type analysis of cDNA from healthy controls granulocytes (HC CD66b+) n = 8, primary myelofibrosis granulocytes (MF CD66b+) n = 20, Myeloid blasts from AML samples (AML CD34+) n = 10, P005 granulocytes, P005 CD34+ blasts, P005 CD34- blasts and P005 CD3+ T lymphocytes. (b) qPCR ETV6-ANLN analysis of cDNA from healthy controls granulocytes (HC CD66b+) n = 8, primary myelofibrosis granulocytes (MF CD66b+) n = 20, Myeloid blasts from AML samples (AML CD34+) n = 10, P005 granulocytes, P005 CD34+ blasts, P005

CD34- blasts and P005 CD3+ T lymphocytes. Data was plotted as LOG10 2e-DDCt.

Resultados 2

Artigo publicado na revista Haematologica

Haematologica. 2016 Apr 1. pii: haematol.2015.137364. [Epub ahead of print]

A novel mechanism of NPM1 cytoplasmic localization in acute myeloid leukemia: The recurrent gene fusion NPM1–HAUS1

Running heads: NPM1-HAUS1 causing cytoplasmic NPM1 localization in AML

Paulo V. Campregher¹, Welbert O. Pereira², Bianca Lisboa³, Renato Puga³, Elvira D. R. P. Velloso⁴, Ricardo Helman⁵, Luciana C. Marti³, João Carlos C. Guerra⁶, Kalliopi N. Manola⁷, Roberta C. Petroni⁶, Alanna Mara P. S. Bezerra⁶, Fernando F. Costa⁸, Nelson Hamerschlag⁵ and Fábio P. S. Santos⁵

¹Departments of Hematology and Clinical Pathology, and Research Institute, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil. Department of Hematology, University of Campinas (Hemocentro - Unicamp), Campinas (SP), Brazil.

²Clinical Pathology, and Research Institute, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, and Hematology and Hemotherapy Center, School of Medicine, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil.

³Research Institute, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil.

⁴Assistant physician and Chief, Hematology Service, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. Chief of Cytogenetics Laboratories, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil.

⁵Department of Hematology, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil.

⁶Department of Clinical Pathology, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil.

⁷Laboratory of Health Physics, Radiobiology & Cytogenetics, National Centre for Scientific Research “Demokritos”, Athens, Greece.

⁸Hematology and Hemotherapy Center, School of Medicine, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Paulo Vidal Campregher

Centro de Pesquisa Clínica, Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein

Av. Albert Einstein, 627/520
São Paulo (SP), Brazil
CEP 05256-900
Telephone: (55 11) 3773-6590 and 2151-4446
Fax: (55 11) 2151-3522
E-mail: paulo.campregher@einstein.br

Acknowledgements

We thank the research nurses Isabel Clapis Bello, Michelli Diniz and Sandra Saemi Nakashima for their invaluable work recruiting and taking care of patients. We acknowledge the assistance with cytogenetic analysis made by Daniela Borri and Renata Kiyomi Kishimoto. We thank Roberta Petroni for her assistance with the Sanger sequencing. We acknowledge the support of JP Sulzberger Columbia Genome Center Facility, where the whole genome sequencing experiment has been performed. We acknowledge the assistance by Mariana Miyagi and Evelyn H. Ascendino in the molecular and cellular experiments. This project was financed by PROADI SUS, project number – CAAE 08942912.0.1001.0071

NPM1 heterozygous mutations are present in roughly a third of patients with acute myeloid leukemia (AML), making it one of the most frequent genomic alterations in these patients.¹ The mutations are characterized by frameshift insertions in the region encoding the C-terminus of the protein, leading to disruption of tryptophan residues 288 and 290 and generation of an additional nuclear export signal (NES) motif, that ultimately leads to the cytoplasmic localization of the mutated NPM1 (NPM1m) as well as wild type (WT) NPM1 proteins.²

The observation that patients with NPM1m AML share clinical, prognostic and biological features^{1,3} as well as evidence suggesting NPM1 mutation as a primary and specific event in AML^{3,4} has led to the creation of the provisional entity: “AML with mutated NPM1”, in the 2008 World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid tissues.⁵

It has been reported that a subset of patients with NPM1 cytoplasmic localization do not have detectable NPM1 mutations.⁶ While a fraction of these patients harbor the t(3;5)(q25;q35) (NPM1-MLF1),^{6,7} the remaining patients have, so far, unknown operating genomic mechanisms. The identification of such patients and mechanisms is important since this group could clinically and biologically overlap with the entity “AML with mutated NPM1”. Herein we describe a novel recurrent fusion gene NPM1-HAUS1 identified in two AML patients. This gene fusion leads to cytoplasmic localization of the NPM1 chimeric protein in *in vitro* assays.

Bone marrow and skin biopsy samples were obtained after signing the informed consent of the institutional Review Board (IRB) approved protocol 08942912.0.1001.0071. Bone marrow mononuclear cells (BMMC) were obtained with the use of Ficoll-Paque (Sigma Aldrich) and whole DNA extraction was achieved with QIAamp DNA mini kit (Qiagen). Sequencing libraries were prepared using the Nextera preparation kit (Illumina) and sequencing with 100 bp paired-end reads was performed on an Illumina HiSeq2000. Somatic variants calls were generated by combining the output of Somatic Sniper (Washington University), Mutect (Broad Institute) and Pindel (Washington University) plus additional in-house criteria to reduce false-positive calls. Median coverage of leukemia and skin sample was 70x and 30x respectively. The search for fusion

sequences was performed with the software Facter v1.4.3b.⁸ Lentiviral vector-based clones fused to fluorophores for 293T cells transduction were manufactured by Genecopoeia. Sanger sequencing was used to confirm the fusion sequence in both patients.

Initially we studied a 63 year old woman (P1) with a diagnosis of *de novo* AML. Bone marrow examination showed marked hypercellularity with 95% of blasts characterized by medium size, intermediate nuclear:cytoplasmic ratio, presence of nucleolus and basophilic cytoplasm. See table 1 for clinical and laboratorial characteristics

Karyotype analysis was consistent with 46,XX,t(5;18)(q35;q21)[20]. Polymerase chain reaction (PCR) fragment analysis revealed absence of exon 12 NPM1 insertions and presence of FLT3 internal tandem duplication (FLT3 ITD). Since t(5;18)(q35;q21) is recurrent in AML^{9,10} and the genes involved in the translocation have not been identified, with the aim of molecularly characterizing this fusion we performed paired whole genome sequencing of a skin sample and BMMC from the patient. Three oncogenic driver abnormalities were identified by our pipeline: internal tandem duplication (ITD) of the FLT3 gene, a missense DNMT3A mutation (p.S714C) and fusion sequences between chromosomes 5 and 18. The consensus chimeric sequence fused NPM1 intron 11 (NM_002520.6) to HAUS1 intron 8 (NM_NM_138443.3) (**Figure 1A**). We first demonstrated the expression of the in frame fusion transcript by means of RT PCR and Sanger sequencing (**Figure 1B**). The putative chimeric protein (**Figure 1C**) generated by this fusion was very similar to mutated NPM1, in its identical size (298 amino acids), in the disruption of Tryptophan 288 and 290 and the generation of a slightly different NES motif: L-xxx-V-xx-M-x-L instead of L-xxx-V-xx-V-x-L (**Figure 1D**). We used LocNES¹¹, a computational tool that locates classical NES in proteins and the motif **LTRRVDMMEEL**, corresponding to the C' terminal region of NPM1_HAUS1 was predicted to be a classical NES with a high probability (score of 0.44. A score above 0.1 is considered significant). In order to evaluate if the novel NES was functional, we transduced 293T cells with lentiviral vectors containing: NPM1_WT-mCherry (wild type NPM1); NPM1m-GFP (NPM1 type A mutation), NPM1_HAUS1-GFP (NPM1-HAUS1) and empty vector-GFP.

While NPM1 WT localized exclusively in the nucleus, both NPM1m and NPM1-HAUS1 displayed the same pattern of nuclear and cytoplasmic localization (**Figure 2A**). Given that the cytoplasmic localization of NPM1m is mediated by exportin-1,¹² we used leptomycin-B, an exportin-1 inhibitor to evaluate the impact of exportin-1 mediated transport in the subcellular localization of both proteins, as previously described.¹² Treatment with leptomycin-B abrogated the migration of both proteins to cytoplasm (**Figure 2B**), suggesting that NPM1-HAUS1 cytoplasmic localization occurs by the same mechanism of NPM1m localization, the disruption of tryptophan 288 and 290 and the generation of a novel NES signal.

To evaluate if NPM1-HAUS1 gene fusion is recurrent in patients with AML and t(5;18)(q35;q21), we analyzed genomic DNA from a second patient (P2) harboring such translocation, that has been subject of a previous publication⁹ (See table 1 for further clinical and laboratorial features). PCR amplification using primers complementary to NPM1 exon 11 and HAUS1 exon 9 followed by Sanger sequencing revealed a similar fusion sequence, with breakpoints that although not identical, occurred in the same introns of both genes (NPM1 intron 11 and HAUS1 intron 8), therefore generating an identical putative protein, confirming the recurrence of the lesion.

AML with mutated NPM1 is the most common form of AML. It is characterized by preponderance of CD34 negative blasts, commonly with monocytic differentiation, and a high correlation with normal cytogenetics, FLT3 and DNMT3A mutations. In addition, several patients with NPM1m AML have a more chemosensitive disease, with long term outcomes similar to patients with other favorable risk AML.¹³ This fact led to the inclusion of this AML subtype in the favorable risk LeukemiaNet prognostic category (in the absence of poor prognostic FLT3-ITD mutations).¹⁴

It is known that a subset of patients with cytoplasmic NPM1 do not harbor NPM1 mutations,⁷ and it has been shown that patients carrying the t(3;5) (q25;q35) and the fusion NPM1-MLF1 are in this group. Nevertheless, the mechanism by which the fusion NPM1-MLF1 causes cytoplasmic localization of NPM1 is not understood.⁷

Here we elucidate for the first time another molecular mechanism leading to NPM1 cytoplasmic localization in AML. We described that the gene fusion

NPM1-HAUS1 generates a putative chimeric protein with features that are very similar to NPM1m, such as identical size, disruption of tryptophan 288 and 290 and the generation of a novel NES. Moreover, we demonstrated that the chimeric protein NPM1-HAUS1 behaves exactly like mutated NPM1, in that both proteins localize to the cytoplasm and this localization is inhibited by the exportin-1 inhibitor leptomycin-B, suggesting that the novel NES generated by the fusion NPM1-HAUS1 is functional and responsible for its cytoplasmic localization.

The gene HAUS1 encodes a subunit of the human augmin complex that is involved in microtubule generation and mitotic spindle formation.¹⁵ This gene has not been studied in the context of cancer.

Corroborating the hypothesis that AML with gene fusion NPM1-HAUS1 is biologically similar to AML with mutated NPM1 is the fact that both patients studied here had CD34 negative blasts and tested positive for FLT3 ITD,⁹ with one patient also carrying DNMT3A S714C mutation, all features highly associated with NPM1 mutations in AML.¹⁶ Another report of AML with t(5;18) (q35;q21) also occurred in a patient with CD34 negative blasts,¹⁰ that presented gingival and lymph node involvement,¹⁰ both also associated with NPM1 mutated AML.⁵ Additionally, another AML patient harboring a novel cytogenetic alteration ins(18;5)(q21.1;q31.2q35.1) also presented evidence of a juxtaposition of the genes NPM1 and HAUS1.¹⁷ Suggesting that this fusion can occur by diverse genomic mechanisms (translocations and insertions). While the molecular characterization was not possible in that case, it is worth noticing that the patient also presented with CD34 negative blasts, FLT3 ITD and absence of NPM1 exon 12 mutations.

Although AML associated with t(5;18) (q35;q21) and NPM1-HAUS1 fusion is a rare entity and our findings suggest it is biologically similar to NPM1m AML, its impact on prognosis remains to be determined.

In conclusion, we have identified a novel mechanism of NPM1 cytoplasmic localization in AML, the gene fusion NPM1-HAUS1.

Referências Bibliográficas

1. Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 2005;106(12):3747-3754.
2. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood*. 2007;109(3):874-885.
3. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood*. 2009;114(14):3024-3032.
4. Liso A, Bogliolo A, Freschi V, et al. In human genome, generation of a nuclear export signal through duplication appears unique to nucleophosmin (NPM1) mutations and is restricted to AML. *Leukemia*. 2008;22(6):1285-1289.
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: World Health Organization; 2008.
6. Woolthuis CM, Mulder AB, Verkaik-Schakel RN, et al. A single center analysis of nucleophosmin in acute myeloid leukemia: value of combining immunohistochemistry with molecular mutation analysis. *Haematologica*. 2013;98(10):1532-1538.
7. Falini B, Bigerna B, Pucciarini A, et al., Aberrant subcellular expression of nucleophosmin and NPM-MLF1 fusion protein in acute myeloid leukaemia carrying t(3;5): a comparison with NPMc+ AML. *Leukemia*. 2006;20(2):368-371.

8. Newman AM, Bratman SV, Stehr H, et al. FACTERA: a practical method for the discovery of genomic rearrangements at breakpoint resolution. *Bioinformatics*. 2014;30(23):3390-3393.
9. Daraki A, Bourantas LK, Manola KN. Translocation t(5;18)(q35;q21) as a rare nonrandom abnormality in acute myeloid leukemia. *Cytogenet Genome Res*. 2013;139(4):289-294.
10. Wang ES, Maslak P, Cathcart K, Juncic JG. Acute myeloid leukemia with t(5;18)(q35;q21). *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;127(1):71-73.
11. Xu, D. et al., LocNES: a computational tool for locating classical NESs in CRM1 cargo proteins. *Bioinformatics*, 2015. 31(9): p. 1357-65.
12. Falini B, Bolli N, Shan J, et al. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood*. 2006;107(11):4514-4523.
13. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008;358(18):1909-1918.
14. Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453-474.
15. Lawo S, Bashkurov M, Mullin M, et al. HAUS, the 8-subunit human Augmin complex, regulates centrosome and spindle integrity. *Curr Biol*. 2009; 19(10):816-26
16. Thol F, Damm F, Lüdeking A, et al. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29(21):2889-2896.

17. Kjeldsen E. A novel insertion ins(18;5)(q21.1;q31.2q35.1) in acute myeloid leukemia associated with microdeletions at 5q31.2, 5q35.1q35.2 and 18q12.3q21.1 detected by oligobased array comparative genomic hybridization. *Mol Cytogenet.* 2014;7(63).

Tables

Table 1. Clinical and laboratorial features of the two patients with AML harboring the NPM1-HAUS1 fusion.

	Patient 1	Patient2
Gender	female	male
Age	63	78
Blast Immunophenotype	CD11b CD11c CD13 CD33 CD36 CD38 CD64 CD71 CD117 HLA- DR MPO	CD13 CD33 CD117 HLA-DR
Blasts CD34 expression	negative	negative
NPM1 exon 12 mutation	negative	negative
FLT3 mutation	positive	positive
DNMT3A mutation	positive	not available
Response to induction CT	not available	CR
Survival after diagnosis	1 month	18 months
Cause of death	Infection	Refractory AML

Abbreviations: CT – chemotherapy. CR – complete remission

Figures

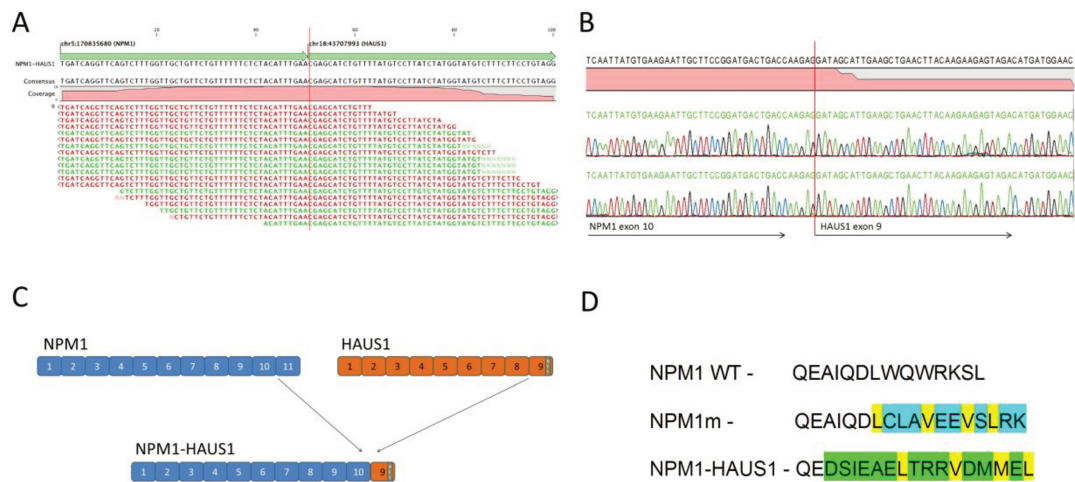


Figure 1. Identification of the gene fusion NPM1-HAUS1 in Acute Myeloid Leukemia. **A:** Whole genome sequencing reads spanning the breakpoint between NPM1 intron 11 (chromosome 5) and HAUS1 intron 8 (chromosome 18). **B:** cDNA Sanger sequencing of the chimeric gene demonstrating the expression of an in frame fusion between NPM1 exon 11 to HAUS1 exon 9. **C:** Exon diagram demonstrating the putative chimeric transcript containing NPM1 exons 1 – 11 fused to HAUS1 exon 9 that contains the sequence encoding a nuclear export signal (NES). **D:** C-terminus of the proteins NPM1 WT, NPM1m and NPM1-HAUS1 illustrating the similarity between NPM1m and NPM1-HAUS1 in its identical size, the disruption of tryptophan 288 and 290, and the generation of a nuclear export signal motif (highlighted in yellow). Amino acids in cyan (NPM1m) and green (NPM1-HAUS1) represent residues not present in NPM1 WT

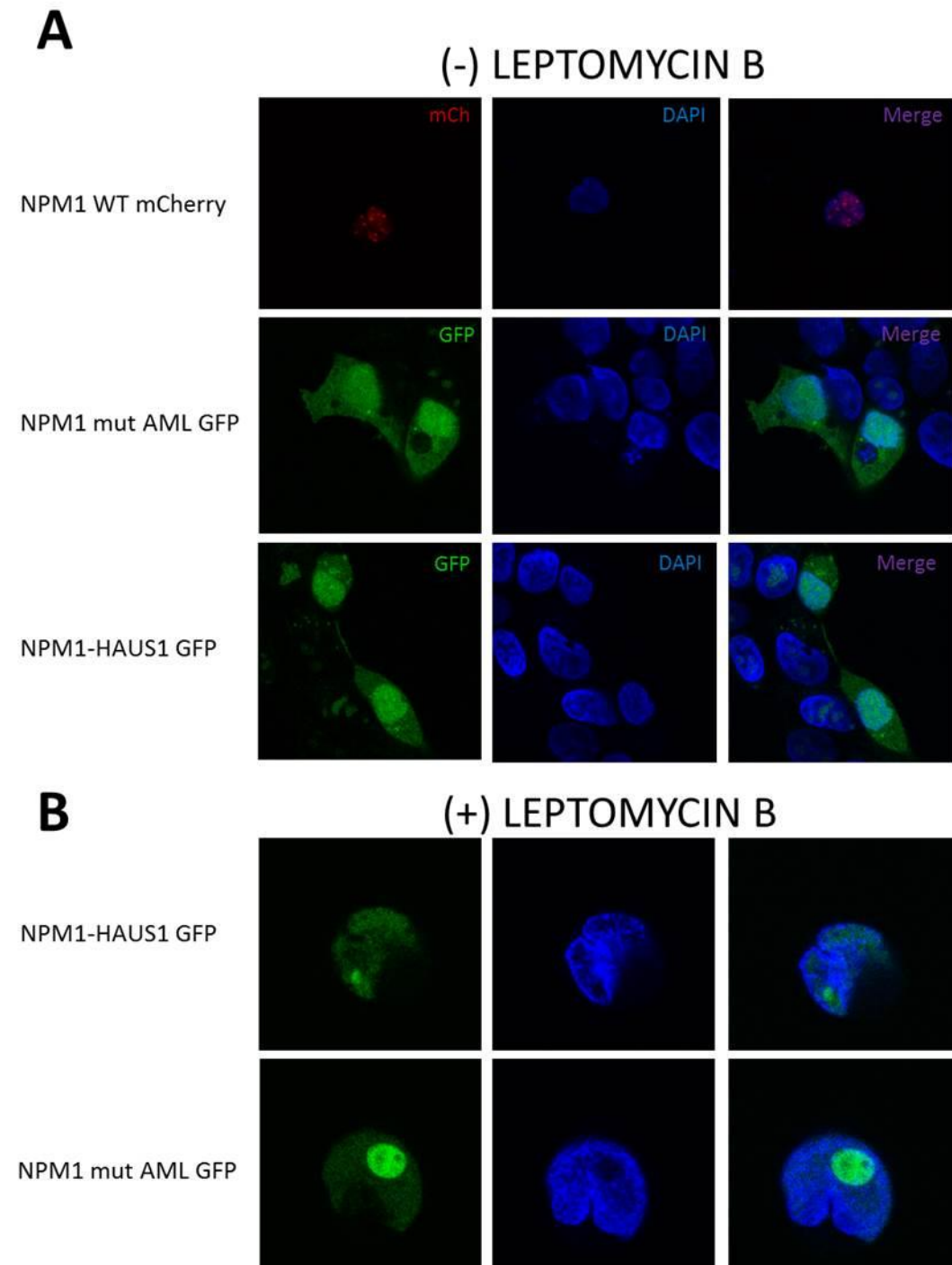


Figure 2. NPM1-HAUS1 localizes both in the nucleus and cytoplasm through a Crm1-dependent transport. A: 293T cell line was transduced with lentiviral vectors containing NPM1 wild type fused to mCherry (upper panels), NPM1 with the AML type A (NPM1m) mutation fused to GFP (middle panels), or NPM1-HAUS1 fused to GFP (lower panels). Cells were plated on coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde, and staining with DAPI for nucleus visualization. The

localization of each construct is traced by the detection of mCherry and GFP. (63 X magnification). While NPM1 WT localizes exclusively in the nucleus, both NPM1m and NPM1-HAUS1 localize both in the nucleus and in the cytoplasm B: 293T cell line transduced with NPM1-HAUS1 (upper panels) and NPM1m (lower panels) were cultured in the presence of 4 µg/mL Leptomycin B for 4 hours, fixed and staining with DAPI. (100 X objective). The analysis was performed using Zeiss LSM 710 Observer.Z1 microscope. On the presence of leptomycin, both NPM1m and NPM1-HAUS1 localize exclus

Discussão Geral

A identificação dos mecanismos genômicos causadores do câncer é essencial para o melhor entendimento destas doenças e para um aprimoramento diagnóstico e terapêutico. Nas últimas décadas, a elucidação destes mecanismos levou a modificações significativas no diagnóstico de diversas doenças como por exemplo LPA [71] e sarcoma de Ewing [72], além de permitir o desenvolvimento de tratamentos direcionados, com altas taxas de sucesso terapêutico, que atuam em lesões moleculares específicas, como o que ocorreu em LMC [73] e neoplasias mielóides e linfóides com rearranjos de *PDGFRA*, *PDGFRB* e *FGFR1* [54].

No presente trabalho apresentamos a identificação e caracterização de duas alterações moleculares recorrentes em LMA, as fusões gênicas *ETV6-ANLN* e *NPM1-HAUS1* que ocorrem como consequência das translocações t(7;12)(p15;p13) e t(5;18)(q35;q21) respectivamente.

A translocação t(7;12)(p15;p13) já foi identificada em pelo menos 10 casos de LMA, incluindo o caso aqui apresentado [74, 75]. Ver tabela 4. Cabe notar que com exceção de 2 casos de LMA na infância, em todos os outros pacientes, incluindo o caso aqui descrito, a t(7;12)(p15;p13) estava acompanhada de outras alterações citogenéticas. É possível portanto que a fusão gênica *ETV6-ANLN* não seja um evento fundador em LMA e sim uma lesão genética associada à progressão da doença, já que em 4 dos 10 casos, essa alteração foi detectada em casos de leucemia secundária a doenças hematológicas prévias ou em leucemia associada a terapia.

Tabela 4. Casos relatados de pacientes portadores de LMA que apresentaram cariótipo contendo (7;12)(p15;p13).

Paciente	Idade	Gênero	Diagnóstico	Cariótipo	Referência
1	59	F	t-LMA	45,XX,-4,t(7;12)(p15;p13),-18,+r[6]/44,sl,del(5)(q13q33),-r[5]/43,sl,del(5)(q13q33),+9,-14,-20,-r[8]/46,XX[1]	75
2	27	M	LMC-CB	45,XY,t(7;12)(p15;p13),der(9)t(9;22)(q34;q11),der(22)t(12;22)(p11;p1?1)t(9;22)/46,XY	75
3	74	M	LMA M3	46,XY,t(7;12)(p15;p13),t(11;17)(q13;q12)[28]/46,XY[7]	75
4	4	M	LMA M0	46,XY,t(7;12)(p15;p13),t(12;13)(p12;p13)[9]/46,XY[20]	75
5	4	M	LMA M0	46,XY,t(7;12)(p15;p13)[17]/46,XY[3]	75
6	40	M	LMA	45,XY,inv(3)(q21q26),-7,t(7;12)(p15;p13)[20]	75
7	10	F	LMA M4	45,XX,-7,t(7;12)(p15;p13),del(11)(q14q24)[8]/46,XX[10]	75
8	45	M	LMA-MRC	46,XY,t(3;12)(q26;p13),t(7;12)(p15;p13)[18]/46,XY,t(3;12;5)(q26.2;p13;q31),t(7;12)(p15;p13)[2]	75
9	50	M	LMA	46,XY,der(3)t(1;3)(q41;q28),der(3)t(3;11)(q21;p12),der(11)t(3;11)(q21;p12)inv(3)(q21q26)[16]/46,XY,der(3)t(1;3)(q41;q28),der(3)t(3;11)(q21;p12),t(7;12)(p15;p13),der(11)t(3;11)(q21;p12)inv(3)(q21q26)[7]	74
10	40	F	LMA PÓS MFP	46,XX,del(5)(q12q33),t(7;12)(p15;p13)[20]	caso presente

Abreviações: F, feminino; M, masculino; t-LMA, LMA relacionada a terapia; LMC-CB, LMC em crise blástica; LMA-MRC, LMA com alterações relacionadas a mielodisplasia; LMA pós MFP, LMA secundária a mielofibrose primária.

Apesar de raramente rearranjado em neoplasias mielóides (0,5%) [74], o gene *ETV6* participa de fusões gênicas com mais de 30 genes parceiros distintos [76]. Além disso, é importante notar que os pontos de quebra no gene *ETV6* observados nestas fusões, ocorrem em todos os introns do gene [76], de modo que o mecanismo pelo qual fusões gênicas envolvendo o *ETV6* levam ao fenótipo leucêmico são variáveis [76]. As classes de genes mais comumente envolvidas em rearranjos com o *ETV6* são tirosina quinases, fatores de transcrição e genes Homeobox, porém rearranjos também foram descritos com diversos genes de função pouco estudadas [76]. A fusão gênica *ETV6-ANLN*, descrita no presente estudo, gera um transcrito in frame e supostamente leva à tradução de uma proteína que contém apenas o primeiro éxon de gene *ETV6* seguido pelos éxons 2 a 25 do gene *ANLN*. Até hoje, 4 genes foram descritos em rearranjos envolvendo o intron 1 do gene *ETV6*, são eles: *PER1*, *CHIC2*, *TTL* e *ACSL6* [76]. No entanto nenhum tem as características observadas no *ANLN*. Enquanto fusões com *PER1*, *TTL* e *ACSL6* aparentemente não geram transcritos viáveis, fusões com *CHIC2* levariam a transcritos contendo a porção 5' do gene *CHIC2* fundido à porção 3' do gene *ETV6*, conservando assim todos os domínios funcionais do *ETV6* [76]. No caso aqui descrito, todos os domínios funcionais e *ETV6* foram excluídos da suposta proteína, porém o *ANLN* está presente em sua

quase totalidade. Os mecanismos pelos quais essa fusão pode ser oncogênica seriam portanto devido à expressão reduzida de *ETV6* [77], já que haploinsuficiência de *ETV6* está descrita em alguns pacientes portadores de LMA, ou devido à expressão da proteína híbrida *ETV6-ANLN*. O gene *ANLN*, que segundo nosso conhecimento ainda não foi implicado em fusões gênicas, codifica uma proteína que se liga à actina e que é fundamental para a citocinese [78]. Este gene está hiperexpresso em diversos tipos de tumores sólidos [79] e demonstrou-se que em modelos de câncer de mama, o silenciamento deste gene leva à inibição do crescimento e migração celulares [80], sugerindo que esta proteína tenha um papel na oncogênese.

No caso aqui descrito, o transcrito de fusão encontra-se expresso nas células leucêmicas (CD34+ e CD34-) em granulócitos (CD66b+) e nos linfócitos T (CD3+) do paciente estudado, sugerindo que a fusão ocorreu em uma célula tronco ou um precursor anterior à separação da linhagem mielóide e linfóide T. Além disso, o surgimento da t(7;12)(p15;p13) no momento de evolução para LMA sugere fortemente um papel na oncogênese para esta fusão gênica.

Estudos adicionais serão necessários para esclarecer a relação entre a fusão *ETV6-ANLN* ou a hiperexpressão de *ANLN* e o fenótipo neoplásico em doenças mielóides.

A outra translocação balanceada caracterizada no presente trabalho, a t(5;18)(q35;q21) já foi descrita em pelo menos 4 pacientes portadores de LMA de novo, incluindo os 2 avaliados no presente estudo, [81, 82]. Essa translocação leva à formação do gene híbrido *NPM1-HAUS1*. Mutação em *NPM1*, mais especificamente, inserções no exon 12 deste gene, é um dos eventos moleculares mais frequentes em LMA. A presença destas inserções define, de acordo com a classificação da organização mundial de saúde, um subtipo específico de LMA chamado “Leucemia mielóide aguda com mutação em *NPM1*” que tem características biológicas e prognósticas peculiares [32]. Mais especificamente, a mutação em *NPM1* leva à localização citoplasmática da proteína mutada, ocorre mais frequentemente em LMAs de novo com cariótipo normal, gera um padrão de expressão gênica uniforme, ocorre frequentemente em leucemias com diferenciação monocítica e os blastos frequentemente são negativos para a expressão do antígeno CD34 [83]. Além disso, esses pacientes

apresentam prognóstico favorável na ausência de mutações concomitantes no gene *FLT3* [32].

O mecanismo pelo qual a mutação em *NPM1* leva à sua localização citoplasmática foi elucidado e consiste na criação de um novo sinal de exportação nuclear (SEN) na porção C-terminal da proteína, além da remoção dos resíduos de triptofano 288 e 290 [84]. *NPM1* é uma proteína multi-funcional, e ainda que o mecanismo leucemogênico da mutação em *NPM1* não tenha sido totalmente identificado, a localização citoplasmática da proteína mutada parece ser fundamental neste processo [85].

Os pontos de quebra da fusão *NPM1-HAUS1* aqui descritos, ocorrem nos introns 11 e 8 dos genes *NPM1* e *HAUS1* respectivamente, levando a um transcrito híbrido que contém os exons 1 a 11 do *NPM1*, seguido pelo exon 9 do gene *HAUS1*. Curiosamente, a suposta proteína híbrida gerada é muito similar à proteína resultante de mutações em *NPM1* pois tem o mesmo número de aminoácidos e também leva à remoção dos resíduos de triptofano 288 e 290 e à geração de um SEN na porção C-terminal. Além disso, nossos experimentos demonstraram que essas alterações também levam à localização citoplasmática da proteína híbrida. Esses achados sugerem fortemente que as características biológicas da LMA com t(5;18)(q35;q21) são muito semelhantes às características da LMA com mutação em *NPM1*. Além disso, nos 4 pacientes descritos na literatura, incluindo o caso aqui apresentado, foram identificados outros achados comuns em LMA com mutação em *NPM1*, como blastos negativos para a expressão de CD34, a co-ocorrência de mutações nos genes *FLT3* e *DNMT3A*, e a presença de doença extra-medular, fortalecendo a hipótese de uma biologia comum por trás das duas entidades.

Esse achados tem relevância clínica, uma vez que pacientes portadores de LMA com mutação em *NPM1*, sem mutação no gene *FLT3*, normalmente não são tratados com transplante de célula tronco hematopoiética em primeira remissão [86]. Adicionalmente, um estudo recente demonstrou que pacientes portadores de LMA com mutação em *NPM1* respondem a tratamento com dactinomicina [87], fazendo desta droga uma alternativa que merece ser estudada em pacientes portadores da fusão gênica *NPM1-HAUS1*. No entanto, estudos adicionais são necessários para definir se o impacto prognóstico assim como a

possível resposta a tratamento com dactinomicina serão semelhantes em LMA com mutação em NPM1 e LMA com a fusão gênica *NPM1-HAUS1*.

Conclusão

Apresentamos aqui a caracterização molecular de duas translocações balanceadas recorrentes em LMA. A t(5;18)(q35;q21) que leva ao gene de fusão *NPM1-HAUS1* e a t(7;12)(p15;p13) que gera o gene híbrido *ETV6-ANLN*. Enquanto o potencial oncogênico da fusão *ETV6-ANLN* ainda precisa ser melhor esclarecido, demonstramos que a fusão *NPM1-HAUS1* leva à criação de um sinal de exportação nuclear na porção C-terminal da suposta proteína híbrida, levando à sua localização nuclear e citoplasmática, causando assim ao fenótipo leucêmico de forma análoga às inserções no exon 12 do gene *NPM1* que é uma das mutações mais frequentes em LMA.

Referências

1. Global Burden of Disease Cancer, C., et al., *The Global Burden of Cancer 2013*. JAMA Oncol, 2015. **1**(4): p. 505-27.
2. Bozic, I., et al., *Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(43): p. 18545-50.
3. Walsh, T., et al., *Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer*. JAMA, 2006. **295**(12): p. 1379-88.
4. Biegging, K.T., S.S. Mello, and L.D. Attardi, *Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(5): p. 359-70.
5. da Cunha Santos, G., F.A. Shepherd, and M.S. Tsao, *EGFR mutations and lung cancer*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 49-69.
6. Ross, J.S., et al., *A high frequency of activating extracellular domain ERBB2 (HER2) mutation in micropapillary urothelial carcinoma*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(1): p. 68-75.
7. Falini, B., et al., *Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity?* Blood, 2011. **117**(4): p. 1109-20.
8. Kumar-Sinha, C., S.A. Tomlins, and A.M. Chinnaiyan, *Recurrent gene fusions in prostate cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(7): p. 497-511.
9. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
10. Sanchez-Torres, J.M., et al., *BRAF mutant non-small cell lung cancer and treatment with BRAF inhibitors*. Transl Lung Cancer Res, 2013. **2**(3): p. 244-50.
11. Ahmadzadeh, A., et al., *BRAF Mutation in Hairy Cell Leukemia*. Oncol Rev, 2014. **8**(2): p. 253.
12. Mardis, E.R. and R.K. Wilson, *Cancer genome sequencing: a review*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(R2): p. R163-8.
13. Shen, T., et al., *Clinical applications of next generation sequencing in cancer: from panels, to exomes, to genomes*. Front Genet, 2015. **6**: p. 215.
14. Cancer Genome Atlas Research, N., *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2013. **368**(22): p. 2059-74.
15. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma*. Nature, 2014. **511**(7511): p. 543-50.
16. Cancer Genome Atlas, N., *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2012. **490**(7418): p. 61-70.
17. Cazzola, M., M.G. Della Porta, and L. Malcovati, *The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance*. Blood, 2013. **122**(25): p. 4021-34.

18. Overby, C.L. and P. Tarczy-Hornoch, *Personalized medicine: challenges and opportunities for translational bioinformatics*. Per Med, 2013. **10**(5): p. 453-462.
19. Fernald, G.H., et al., *Bioinformatics challenges for personalized medicine*. Bioinformatics, 2011. **27**(13): p. 1741-8.
20. Wall, D.P. and P.J. Tonellato, *The future of genomics in pathology*. F1000 Med Rep, 2012. **4**: p. 14.
21. Harris, T.J. and F. McCormick, *The molecular pathology of cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(5): p. 251-65.
22. Quintas-Cardama, A. and J. Cortes, *Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia*. Blood, 2009. **113**(8): p. 1619-30.
23. Levis, M., *FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013?* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2013. **2013**: p. 220-6.
24. Tan, C. and X. Du, *KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(37): p. 5171-80.
25. Holderfield, M., et al., *Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(7): p. 455-67.
26. Cheng, L., et al., *Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine*. Mod Pathol, 2012. **25**(3): p. 347-69.
27. Ferdinand, R., et al., *Treatments for chronic myeloid leukemia: a qualitative systematic review*. J Blood Med, 2012. **3**: p. 51-76.
28. Johnson, D.B. and J.A. Sosman, *Therapeutic Advances and Treatment Options in Metastatic Melanoma*. JAMA Oncol, 2015. **1**(3): p. 380-6.
29. Tiacci, E., et al., *Targeting Mutant BRAF in Relapsed or Refractory Hairy-Cell Leukemia*. N Engl J Med, 2015. **373**(18): p. 1733-47.
30. Haroche, J., et al., *Reproducible and sustained efficacy of targeted therapy with vemurafenib in patients with BRAF(V600E)-mutated Erdheim-Chester disease*. J Clin Oncol, 2015. **33**(5): p. 411-8.
31. Peters, S., O. Michielin, and S. Zimmermann, *Dramatic response induced by vemurafenib in a BRAF V600E-mutated lung adenocarcinoma*. J Clin Oncol, 2013. **31**(20): p. e341-4.
32. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. Blood, 2009. **114**(5): p. 937-51.

33. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. Blood, 2010. **115**(3): p. 453-74.
34. Mrozek, K., et al., *Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2012. **30**(36): p. 4515-23.
35. Edwards, P.A., *Fusion genes and chromosome translocations in the common epithelial cancers*. J Pathol, 2010. **220**(2): p. 244-54.
36. Rowley, J.D., *Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining*. Nature, 1973. **243**(5405): p. 290-3.
37. Rowley, J.D., *Identificaton of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia*. Ann Genet, 1973. **16**(2): p. 109-12.
38. Groffen, J., et al., *Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22*. Cell, 1984. **36**(1): p. 93-9.
39. Heisterkamp, N., et al., *Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia*. Nature, 1983. **306**(5940): p. 239-42.
40. Mitelman, F., B. Johansson, and F. Mertens, *The impact of translocations and gene fusions on cancer causation*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(4): p. 233-45.
41. Boxer, L.M. and C.V. Dang, *Translocations involving c-myc and c-myc function*. Oncogene, 2001. **20**(40): p. 5595-610.
42. Jares, P., D. Colomer, and E. Campo, *Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma*. J Clin Invest, 2012. **122**(10): p. 3416-23.
43. Ott, G. and A. Rosenwald, *Molecular pathogenesis of follicular lymphoma*. Haematologica, 2008. **93**(12): p. 1773-6.
44. Mitelman, F., B. Johansson, and F. Mertens, *Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer*. Nat Genet, 2004. **36**(4): p. 331-4.
45. Martens, J.H. and H.G. Stunnenberg, *The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia*. FEBS Lett, 2010. **584**(12): p. 2662-9.
46. Muntean, A.G. and J.L. Hess, *The pathogenesis of mixed-lineage leukemia*. Annu Rev Pathol, 2012. **7**: p. 283-301.
47. De Braekeleer, E., et al., *RUNX1 translocations and fusion genes in malignant hemopathies*. Future Oncol, 2011. **7**(1): p. 77-91.

48. Sangle, N.A. and S.L. Perkins, *Core-binding factor acute myeloid leukemia*. Arch Pathol Lab Med, 2011. **135**(11): p. 1504-9.
49. De Braekeleer, E., N. Douet-Guilbert, and M. De Braekeleer, *RARA fusion genes in acute promyelocytic leukemia: a review*. Expert Rev Hematol, 2014. **7**(3): p. 347-57.
50. Paschka, P. and K. Dohner, *Core-binding factor acute myeloid leukemia: can we improve on HiDAC consolidation?* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2013. **2013**: p. 209-19.
51. Park, J., et al., *Emerging new approaches for the treatment of acute promyelocytic leukemia*. Ther Adv Hematol, 2011. **2**(5): p. 335-52.
52. Belloni, E., et al., *A new complex rearrangement involving the ETV6, LOC115548, and MN1 genes in a case of acute myeloid leukemia*. Genes Chromosomes Cancer, 2004. **41**(3): p. 272-7.
53. Karenko, L., et al., *Primary cutaneous T-cell lymphomas show a deletion or translocation affecting NAV3, the human UNC-53 homologue*. Cancer Res, 2005. **65**(18): p. 8101-10.
54. Savage, N., T.I. George, and J. Gotlib, *Myeloid neoplasms associated with eosinophilia and rearrangement of PDGFRA, PDGFRB, and FGFR1: a review*. Int J Lab Hematol, 2013. **35**(5): p. 491-500.
55. Cheah, C.Y., et al., *Patients with myeloid malignancies bearing PDGFRB fusion genes achieve durable long-term remissions with imatinib*. Blood, 2014. **123**(23): p. 3574-7.
56. Cools, J., et al., *A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome*. N Engl J Med, 2003. **348**(13): p. 1201-14.
57. Campbell, P.J., et al., *Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing*. Nat Genet, 2008. **40**(6): p. 722-9.
58. de The, H., et al., *The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus*. Nature, 1990. **347**(6293): p. 558-61.
59. Wang, Q., et al., *Application of next generation sequencing to human gene fusion detection: computational tools, features and perspectives*. Brief Bioinform, 2013. **14**(4): p. 506-19.
60. Robison, K., *Application of second-generation sequencing to cancer genomics*. Brief Bioinform, 2010. **11**(5): p. 524-34.
61. Welch, J.S., et al., *Use of whole-genome sequencing to diagnose a cryptic fusion oncogene*. JAMA, 2011. **305**(15): p. 1577-84.
62. Link, D.C., et al., *Identification of a novel TP53 cancer susceptibility mutation through whole-genome sequencing of a patient with therapy-related AML*. JAMA, 2011. **305**(15): p. 1568-76.
63. Totoki, Y., et al., *High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome*. Nat Genet, 2011. **43**(5): p. 464-9.

64. Edgren, H., et al., *Identification of fusion genes in breast cancer by paired-end RNA-sequencing*. Genome Biol, 2011. **12**(1): p. R6.
65. Stephens, P.J., et al., *Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes*. Nature, 2009. **462**(7276): p. 1005-10.
66. Zhao, Q., et al., *Transcriptome-guided characterization of genomic rearrangements in a breast cancer cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(6): p. 1886-91.
67. Frampton, G.M., et al., *Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(11): p. 1023-31.
68. He, J., et al., *Integrated genomic DNA/RNA profiling of hematologic malignancies in the clinical setting*. Blood, 2016.
69. Chalmers, Z.R., et al., *Comprehensive genomic profiling identifies a novel TNKS2-PDGFRA fusion that defines a myeloid neoplasm with eosinophilia that responded dramatically to imatinib therapy*. Blood Cancer J, 2015. **5**: p. e278.
70. Ou, S.H., et al., *Identification of a novel HIP1-ALK fusion variant in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) and discovery of ALK I1171 (I1171N/S) mutations in two ALK-rearranged NSCLC patients with resistance to Alectinib*. J Thorac Oncol, 2014. **9**(12): p. 1821-5.
71. Wang, Z.Y. and Z. Chen, *Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2505-15.
72. Lewis, T.B., C.M. Coffin, and P.S. Bernard, *Differentiating Ewing's sarcoma from other round blue cell tumors using a RT-PCR translocation panel on formalin-fixed paraffin-embedded tissues*. Mod Pathol, 2007. **20**(3): p. 397-404.
73. Goldman, J.M., *Chronic myeloid leukemia: a historical perspective*. Semin Hematol, 2010. **47**(4): p. 302-11.
74. Haferlach, C., et al., *ETV6 rearrangements are recurrent in myeloid malignancies and are frequently associated with other genetic events*. Genes Chromosomes Cancer, 2012. **51**(4): p. 328-37.
75. Yamamoto, K., et al., *Biallelic ETV6 rearrangements by recurrent translocations t(7;12)(p15;p13) and t(3;12)(q26.2;p13) in acute myeloid leukemia*. Leuk Res, 2011. **35**(11): p. e212-4.
76. De Braekeleer, E., et al., *ETV6 fusion genes in hematological malignancies: a review*. Leuk Res, 2012. **36**(8): p. 945-61.
77. Feurstein, S., et al., *Haploinsufficiency of ETV6 and CDKN1B in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype*. BMC Genomics, 2014. **15**: p. 784.

78. Zhao, W.M. and G. Fang, *Anillin is a substrate of anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) that controls spatial contractility of myosin during late cytokinesis*. J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33516-24.
79. Hall, P.A., et al., *The septin-binding protein anillin is overexpressed in diverse human tumors*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(19 Pt 1): p. 6780-6.
80. Zhou, W., et al., *Knockdown of ANLN by lentivirus inhibits cell growth and migration in human breast cancer*. Mol Cell Biochem, 2015. **398**(1-2): p. 11-9.
81. Daraki, A., L.K. Bourantas, and K.N. Manola, *Translocation t(5;18)(q35;q21) as a rare nonrandom abnormality in acute myeloid leukemia*. Cytogenet Genome Res, 2013. **139**(4): p. 289-94.
82. Wang, E.S., et al., *Acute myeloid leukemia with t(5;18)(q35;q21)*. Cancer Genet Cytogenet, 2001. **127**(1): p. 71-3.
83. Falini, B., et al., *Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features*. Blood, 2007. **109**(3): p. 874-85.
84. Falini, B., et al., *Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML*. Blood, 2006. **107**(11): p. 4514-23.
85. Sportoletti, P., *How does the NPM1 mutant induce leukemia?* Pediatr Rep, 2011. **3 Suppl 2**: p. e6.
86. Liu, Y., et al., *Prognostic significance of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia: A meta-analysis*. Mol Clin Oncol, 2014. **2**(2): p. 275-281.
87. Falini, B., L. Brunetti, and M.P. Martelli, *Dactinomycin in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia*. N Engl J Med, 2015. **373**(12): p. 1180-2.

Apêndice 1

Título do Projeto:

“Avaliação da incidência, relevância clínica e prognóstica de mutações moleculares em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda, Síndromes Mielodisplásicas e Neoplasias Mieloproliferativas e avaliação da viabilidade de duas estratégias de consolidação em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda”

Planejamento do Estudo: Prospectivo

Diagnóstico: Pacientes com Leucemia Mielóide Aguda, Síndromes Mielodisplásica e Neoplasias Mieloproliferativas

Coordenadores Diretivos e Investigadores: Dr. Nelson Hamerschlak

Dr. Ricardo Helman

Dr. Fabio Pires de Souza Santos

Dr. Paulo Vidal Campregher

Laboratório de Técnicas Especiais: Dra Elvira Deolinda R. P. Velloso

Coordenadoras de Pesquisa Clínica: Isabel Clapis Bello

Sandra Saemi Nakashima Yoshida

Michelli da Silva Diniz

Bioinformata: Renato David Puga

Centro de Pesquisa Experimental: Dr. Welbert de Oliveira Pereira

SEÇÃO A: RESUMO DO ESTUDO

OBJETIVOS

O estudo proposto aplica-se a dois grupos de pacientes:

1) Pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (LMA) (exceto Leucemia Promielocítica

Aguda com rearranjos do gene RARA), recém diagnosticada ou recidivada ou Primariamente refratária conforme definido pela Classificação de Neoplasia de Tecido Hematológico e Linfóide da Organização Mundial de Saúde (2008)

2) Pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD), Neoplasias Mieloproliferativas

Filadelfia-negativo (NMP Ph-neg) e Neoplasias Mieloproliferativas/Mielodisplásicas (NMP/MD), conforme definido pela Classificação de Neoplasia de Tecido Hematológico e Linfóide da Organização Mundial de Saúde (2008) (Apendice I).

Os objetivos do estudo para os dois grupos de pacientes estão resumidos abaixo:

1.1 Objetivos para pacientes com LMA

Para pacientes com LMA, existem três objetivos principais no estudo:

- 1) Determinar prevalência e realizar estratificação de risco molecular através de análise integrada das principais alterações genéticas e moleculares encontradas nesses pacientes;
- 2) Determinar evolução clínica e sobrevida em pacientes com LMA recém-diagnosticada de acordo com o risco genético-molecular e com a estratégia terapêutica de consolidação:
 - a. Quimioterapia com citarabina em altas doses;
 - b. Transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) autólogo;
 - c. Transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênico;
- 3) Descobrir novas alterações genéticas e moleculares que possam contribuir para a patogênese da LMA através da tecnologia de NGS, determinar a prevalência destas mutações, impacto prognóstico e realizar estudos funcionais que confirmem a relevância destas mutações na patogênese da LMA.

1.2 Objetivos primários para pacientes com SMD, NMP Ph-neg e NMP/MD.

Para pacientes com SMD, NMP Ph-neg e NMP/MD, existem quatro objetivos principais no estudo:

- 1) Determinar prevalência das principais alterações cromossômicas e genéticas em

pacientes com SMD, NMP e NMP/MD através de cariótipo convencional em banda G e teste da mutação do gene JAK2 e do gene KIT;

2) Descobrir novas alterações genéticas e moleculares que possam contribuir para a patogênese destas doenças através da tecnologia de NGS, determinar a prevalência destas mutações, impacto prognóstico e realizar estudos funcionais que confirmem a relevância destas mutações na patogênese das SMD, NMP Ph-neg e NMP/MD;

3) Coletar longitudinalmente dados que permitam avaliar características clínicas e

padrões globais e regionais de métodos de diagnóstico e tratamento e desfechos clínicos de sobrevida em pacientes com SMD, NMP Ph-neg e NMP/MD.

Critérios de Inclusão para pacientes portadores de LMA:

- ☐ Pacientes com diagnóstico de LMA segundo critérios da OMS
- ☐ Idade acima de 18 anos;
- ☐ Performance status (escala de ECOG- Apêndice 2) entre 0-2
- ☐ Função hepática (bilirrubinas totais < 2,0 mg/dL) adequadas;
- ☐ Paciente assinou termo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Estudo Clínico (Apêndice 3) antes do início de qualquer procedimento específico do estudo;
- ☐ Paciente não recebeu nenhum tipo de tratamento quimioterápico prévio para LMA, excluindo uso de hidroxiuréia para controle de leucometria elevada;
- ☐ Todos os homens com potencial de reprodução e mulheres em idade fértil devem praticar contracepção efetiva.
- ☐ Paciente é elegível para quimioterapia intensiva

Critérios de Exclusão para pacientes portadores de LMA::

- ☐ Leucemia promielocítica aguda (com translocações envolvendo o gene RARA no cromossomo 17q21);
- ☐ Mulheres gestantes;
- ☐ Pacientes positivos para HIV;

☐ Insuficiência Cardíaca Classe III ou IV (New York Heart Association) e/ou Fração de Ejeção < 50% avaliada por ecocardiograma;

☐ Paciente se recusa a realizar contracepção efetiva;

Anexo 1 – E-mail com autorização da revista Haematologica para inclusão do artigo no documento da tese

Permission to use Journal material in PhD thesis



Paulo Vidal Campregher

qui 25/08/2016 12:46

Thanks Lorella Paulo V. Campregher, MD Biologia Molecular - LATE / IIEP Hospital Israelita Albert Einstein Fone:(11) 2151.2042 / 2151.3203 email: paulo.campregher@einstein.br

← RESPONDER ← RESPONDER A TODOS → ENCAMINHAR ***



Lorella Ripari <l.ripari@haematologica.org>

qui 25/08/2016 04:57

Marcar como não lida

Para: Paulo Vidal Campregher;

• Você respondeu em 25/08/2016 12:46.

Dear Dr. Campregher,
please use this mail as a permission granted to your needs.

To whom it may concern:

we herewith grant permission to re-use the article cited in your message below free of charge; this publication is intended for no-profit use. Any other use is discouraged and it will remain under copyright laws of the Ferrata Storti Foundation, Pavia, Italy. You are also obliged to correctly quote the original article reference.

Best regards

Lorella Ripari
Haematologica Journal Office
Via Belli 4
27100 Pavia, Italy
Phone: +39.0382.27129
Fax: +39.0382.394705

www.haematologica.org

Anexo 2 – E-mail com autorização da revista Molecular Cancer para inclusão do artigo no documento da tese



Molecular Cancer <molecularcancer@biomedcentral.com>
sex 26/08/2016 18:25

Marcar como não lida

Para: Paulo Vidal Campregher;

Dear Dr. Campregher,

Thank you for your email.

All authors of papers published by Biomed Central retain copyright of their manuscripts and can therefore use any part of it again as long as the original article is properly cited.

Biomed Central's full copyright policy can be found here: <http://www.biomedcentral.com/submissions/copyright-and-license>

Please let us know if you have any further questions.

Best wishes,

Mary Tony

Mary Tony Rabanal on behalf Faye Estrera Cauman
Journal Editorial Office
BioMed Central

www.biomedcentral.com



Paulo Vidal Campregher
qua 24/08/2016 14:26

Dear Limuel Garin I am writing to you in order to obtain a permission to re-use material included in the following article published in Molecular Cancer for inclusion in my Ph.D. thesis: Campregher PVPereira WO, Lisboa B, Puga R, Helman R, Miyagi M...

Anexo 3 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ¿Avaliação da incidência, relevância clínica e prognóstica de mutações moleculares em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda, Síndromes Mielodisplásicas e Neoplasias Mieloproliferativas e avaliação da viabilidade de duas estratégias de consolidação em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda¿

Pesquisador:

Nelson Hamerschlak

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 1

CAAE: 08942912.0.1001.0071

Instituição Proponente: Hospital Israelita Albert Einstein-SP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 121.821

Data da Relatoria: 12/10/2012

Apresentação do Projeto:

Emenda ao projeto já aprovada antes da Plataforma Brasil.

Objetivo da Pesquisa:

Emenda ao projeto já aprovada antes da Plataforma Brasil.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Emenda ao projeto já aprovada antes da Plataforma Brasil.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda ao projeto já aprovada antes da Plataforma Brasil.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Emenda ao projeto já aprovada antes da Plataforma Brasil.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovar.