

## Gen de fusión AML-1/ETO y mutación NPM-1A en leucemia mieloide crónica en crisis blástica mieloide

### AML-1/ETO fusion gene and mutation NPM-1A in myeloid chronic leukemia in myeloid blast crisis

DraC. Ana María Amor Vigil, Lic. Carmen A Díaz Alonso, Dra. Ania Hernández Cabezas, Dra. Vianed Marsán Suárez, Dra. Heidys Garrote Santana, Dr. Edgardo Espinosa Martínez

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

La leucemia mieloide crónica es una neoplasia mieloproliferativa de naturaleza clonal que generalmente y de manera progresiva transita por tres fases: crónica, acelerada y crisis blástica. Alrededor del 80 % de los enfermos con leucemia mieloide crónica son diagnosticados durante la fase crónica, 10 % en fase acelerada y otro 10 % durante la crisis blástica. A la presencia del cromosoma Filadelfia y la formación del gen de fusión BCR/ABL, que se traduce en la proteína quimérica p<sup>BCR/ABL</sup>, le sigue una gran inestabilidad genómica y la adquisición de alteraciones cromosómicas y moleculares adicionales. Algunas alteraciones moleculares, que suelen estar presentes en otras hemopatías malignas, pueden ser adquiridas durante la progresión de la leucemia mieloide crónica a crisis blástica. Se presenta el caso de un paciente que debutó con una leucemia mieloide crónica en crisis blástica, con positividad del gen de fusión BCR/ABL, el gen de fusión AML-1/ETO y la mutación NPM-1A.

**Palabras clave:** gen de fusión AML-1/ETO, mutación NPM-1A, leucemia mieloide crónica, crisis blástica.

---

#### ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia is a clonal myeloproliferative neoplasm which generally and progressively goes through three phases: chronic, accelerated and blast crisis.

About 80 % of patients with chronic myeloid leukemia are diagnosed in chronic phase, 10 % in accelerated phase and 10 % in blast crisis. The presence of Philadelphia chromosome and the formation of BCR/ABL fusion gene, resulting in the chimeric protein p<sup>BCR/ABL</sup>, generates a large genomic instability and the acquisition of additional chromosomal and molecular alterations. Some molecular alterations, which are usually present in other hematological malignancies, could be acquired during the progression of chronic myeloid leukemia to blast crisis. This report presents the case of a patient with *de novo* chronic myeloid leukemia in blast crisis, with positivity of BCR/ABL fusion gene, AML-1/ETO fusion gene and mutation NPM-1A.

**Keywords:** AML-1/ETO fusion gene, mutation NPM-1A, chronic myeloid leukemia, blast crisis.

---

## INTRODUCCIÓN

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa de naturaleza clonal, con origen en una célula madre pluripotencial común a las tres series hematopoyéticas. Generalmente y de manera progresiva, transita por tres fases: crónica (FC), acelerada (FA) y crisis blástica (CB). Esta última es la fase terminal de la LMC que se caracteriza por una rápida expansión de blastos de naturaleza mieloide o linfóide y una corta supervivencia.<sup>1</sup> Sin embargo, la enfermedad no siempre es identificada en su fase inicial. Alrededor del 80 % de los pacientes con LMC son diagnosticados durante la FC, 10 % lo es durante la FA y otro 10 % cuando ya está establecida la CB.<sup>2</sup>

La clasificación más actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que, con solo 20 % de blastos es suficiente para estratificar al paciente en CB, en lugar del 30 % que estaba establecido históricamente.<sup>3</sup> Aproximadamente en el 70 % de los enfermos los blastos presentes en la LMC en CB son de naturaleza mieloide, del 20 al 30 % de linaje linfóide y un pequeño porcentaje de pacientes puede desarrollar una población mixta.<sup>4</sup>

Durante el surgimiento y la progresión de la LMC ocurre una sucesión de fenómenos. Primero, aparece el cromosoma Filadelfia (conocido por su abreviatura en inglés como Ph) formado por una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22. En el punto de unión entre ambos cromosomas se forma el gen de fusión BCR/ABL. En dependencia de la región del gen BCR que se une al ABL, los transcritos que se forman se conocen como "Major" BCR/ABL o "minor" BCR/ABL. Estos transcritos dan lugar a proteínas quiméricas de diferentes pesos moleculares, 210 kDa y 190 kDa, respectivamente, cuya función tirosina quinasa (TK por su sigla en inglés) se encuentra constitutivamente activada. La proteína pBCR/ABL de 210 kDa aparece generalmente en la LMC, mientras que la de 190 kDa es más frecuente en la leucemia linfóide aguda. La función TK no regulada activa diferentes vías de transmisión de señales que dan lugar al inicio del proceso oncogénico.<sup>5</sup> El mecanismo responsable de la progresión de la enfermedad permanece desconocido, pero se piensa que la activación de oncogenes y la inactivación de supresores tumorales están involucrados en el fenómeno de la progresión hacia la CB, acompañado de un severo bloqueo de la diferenciación y la inhibición de la apoptosis.<sup>1,6</sup>

Entre las aberraciones cromosómicas más frecuentes que aparecen durante la progresión de la LMC hacia la CB se encuentran: un segundo cromosoma Ph, la trisomía 8, el isocromosoma i (17q) y la trisomía 19, entre otras. Estas pueden aparecer solas o combinadas entre sí y también pueden ocurrir aberraciones complejas. Hasta el 80 % de los pacientes en CB muestran alguna forma de cambio cromosómico, lo que suele ser la forma más consistente de predecir la transformación blástica.<sup>7</sup> También se ha descrito la aparición de mutaciones en una serie de genes involucrados de manera crucial en la hematopoyesis, tales como: RUNX1, ASXL1, WT1, NRAS, KRAS, TET2, CBL, TP53, IDH y IKZF.<sup>8</sup> Además, se plantea que la expresión de una serie de genes aumenta en la CB respecto a la FC.<sup>9-11</sup>

Se ha observado que algunas alteraciones moleculares específicas que regulan la transcripción génica y que aparecen en otras hemopatías malignas, pueden ser adquiridas durante la progresión de la LMC a CB. Ejemplo de ello son: la inv(16), la inv(3), la t(15;17) y la t(8;21), que caracterizan a diferentes subtipos de leucemia mieloide aguda (LMA).<sup>12-15</sup>

La aberración cromosómica conocida como t(8;21) (q22;q22), que da lugar a la formación del gen de fusión AML-1/ETO, caracteriza a un tipo específico de LMA, la definida como subtipo M2 por la clasificación FAB (franco-americana-británica). También ha sido descrita, pero con menor frecuencia, en la LMA subtipo M1.<sup>8</sup> En la LMC se ha descrito su presencia en escasas ocasiones y siempre asociada a la etapa de CB. Un estudio de 2011 encontró solo ocho casos reportados con anterioridad, de pacientes portadores de ambas aberraciones, la t(9;22) y la t(8;21).<sup>15</sup>

Las mutaciones en el gen de la nucleofosmina-1 (NPM-1), que se describen como la anomalía genética más frecuente en las LMA, fueron descritas por primera vez en esta entidad, por Falini y col en 2005. Ellos las identificaron en aproximadamente el 35 % de las LMA de reciente diagnóstico, particularmente en el 50 % de las LMA con cariotipo normal. La proteína p<sup>NPM-1</sup> viaja entre el núcleo y el citoplasma y tiene una importante función en varios procesos celulares como: el mantenimiento de la estabilidad genómica, la promoción de la biogénesis ribosomal, la regulación de la transcripción y la regulación de factores de transcripción supresores de tumor.<sup>16</sup> Las mutaciones afectan el extremo C-terminal de la proteína y producen el incremento de su exportación con la consiguiente acumulación en el citoplasma. Aunque se han descrito más de treinta mutaciones de este gen, la más frecuente es la conocida como tipo A (NPM-1A).<sup>17</sup> En cuanto a su asociación con la LMC, en 2012 Georgiou y col reportaron el desarrollo de una LMA secundaria al tratamiento con imatinib, en un paciente con LMC en el cual se encontró el gen NPM-1 mutado.<sup>18</sup> Los mismos autores habían encontrado solo un reporte previo de LMC con mutación del gen NPM-1 durante la CB.<sup>19</sup> Recientemente, Watkins y col estudiaron la presencia de mutaciones en el gen NPM-1 en pacientes con LMC en FC y en CB y en ninguno de ellos encontraron el gen mutado. Otros reportes coinciden con este resultado,<sup>20, 21</sup> por lo que es extremadamente rara la presencia de estas mutaciones, tanto en el inicio como en la progresión de la LMC.

El presente reporte es el caso de un paciente que debutó en LMC-CB mieloide, que fue positivo al gen de fusión BCR/ABL y a dos aberraciones características de LMA, el gen de fusión AML-1/ETO y la mutación NPM-1A.

## PRESENTACIÓN DEL CASO

Paciente masculino de 73 años con antecedentes de hipertensión arterial, que presentó astenia marcada, palidez cutáneo-mucosa, diarreas y vómitos ocasionales durante los dos meses anteriores a su asistencia al servicio de salud. Cuando acudió a su área de salud presentaba, además, cuadro febril y disnea al esfuerzo. En ese momento se comprobó leucocitosis y anemia con 50 % de blastos, por lo que fue remitido al servicio de hematología.

En el examen físico externo se encontraron: mucosas húmedas y pálidas. A la auscultación se encontró murmullo vesicular disminuido de manera global con estertores crepitantes en la base pulmonar derecha. El resto del examen físico fue normal. Se indicaron estudios complementarios.

Los parámetros sanguíneos en periferia mostraron valores de hemoglobina en 5,9 g/dL y de leucocitos en  $40 \times 10^9/L$  con 58 % de blastos, 6 % de mielocitos, 7 % de juveniles, 19 % de neutrófilos, 3 % de stabs, 3 % de monocitos y 4 % de linfocitos. El conteo de plaquetas fue de  $10 \times 10^9/L$  y el de reticulocitos de 0,2 %.

El estudio de rayos X de tórax anteroposterior mostró una lesión inflamatoria en la base del pulmón derecho. En el ultrasonido abdominal se apreció aumento de la ecogenicidad hepática, con hepatomegalia de aproximadamente 3 cm, un quiste renal de 39 mm en el polo inferior del riñón izquierdo y el bazo y páncreas de aspecto normal.

El coagulograma mostró trombocitopenia severa. El tiempo de coagulación fue de 6 min, el dímero D estaba elevado (6  $\mu g/mL$ ) y el fibrinógeno en 2,82 g/L. La velocidad de eritrosedimentación fue de 45 mm/h.

La citoquímica fue negativa para la mieloperoxidasa, al sudán negro B y al PAS. El extendido de sangre medular mostró infiltración de blastos de gran tamaño, algunos con núcleos convolutos y otros con vacuolas citoplasmáticas sugestivos de micromegacariocitos. Con dicha apariencia, se diagnosticó una leucemia aguda de linaje mixto. Sin embargo, no se descartó la posibilidad de un proceso mieloproliferativo crónico en CB por la observación de manera marcada de elementos maduros del sistema granulocítico, eosinofilia y basofilia ligeras. El paciente fue ingresado y se indicaron estudios de marcadores inmunológicos, biopsia de médula ósea (BMO), citogenética y estudio molecular.

A la espera de los resultados, el paciente comenzó quimioterapia con arabinósido de citosina en dosis diarias de 10 mg/m<sup>2</sup>, por 21 días.

El inmunofenotipo, por la técnica de ultramicro inmunocitoquímica, mostró antígenos propios de líneas mieloides y linfoides. Los de tipo linfoide fueron positivos para CD22 (34 %), CD20 (45 %), lo que los caracteriza como de linaje B; mientras que los de tipo mieloides fueron positivos para CD13 (64 %) y CD33 (43 %), característicos de la línea mieloides; CD14 (53 %), característico de componente monocitario; y CD42 (62 %) marcador de megacariocitos. Con estos resultados se concluyó una leucemia aguda híbrida B-mieloides con componente monocítico y megacarioblástico.

El estudio de BMO se realizó mediante las técnicas habituales de hematoxilina y eosina. Se observó una alta celularidad, del 98 al 100 %, con presencia de las tres series hematopoyéticas, con hipoplasia eritropoyética y megacariopoyética de moderada a severa, respectivamente, hiperplasia granulopoyética moderada con extendido de células blásticas de escaso citoplasma y núcleos ligeramente

irregulares con nucléolos evidentes y citoplasma homogéneo, una fibrosis reticulínica grado II y hemosiderina ausente.

El estudio inmunohistoquímico de la biopsia resultó intensamente positivo a la mieloperoxidasa, negativo al factor VIII, CD20, CD3 y CD68 positivo en alrededor del 40 %. Estas características permitieron asegurar que se trataba de un proceso mielóide con componente monocítico y se concluyó como leucemia mielóide aguda con componente monocítico.

Para el estudio molecular se amplificaron cuatro alteraciones moleculares características de LMA y el gen de fusión BCR-ABL. Se aisló ARN a partir de células mononucleares de sangre medular y se procedió a la amplificación de los genes de fusión AML1/ETO, CBF $\beta$ /MYH11 y BCR/ABL, mediante reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa (*PCR* por su sigla en inglés) de acuerdo con el protocolo Biomed-1.<sup>22</sup> Con el producto de la reverso transcripción se amplificaron también por PCR: la duplicación interna en tándem del gen FLT3 (FLT3-DIT)<sup>23</sup> y la mutación NPM-1A.<sup>24</sup>

Los genes de fusión BCR-ABL (transcripto b2a2) y AML1-ETO, así como la mutación NPM-1A, resultaron positivos. El estudio citogenético resultó no útil.

Al mes de evolución, la concentración de hemoglobina era de 6,9 g/dL, las cifras de leucocitos eran de  $10 \times 10^9/L$  con 74 % de blastos y el conteo de plaquetas de  $15 \times 10^9/L$ . El paciente no respondió al tratamiento y falleció en un periodo menor de dos meses a partir del hallazgo de la presencia de blastos en sangre periférica.

## DISCUSIÓN

Debido la existencia del 50 % de blastos en periferia al inicio del estudio de este paciente, inicialmente se pensó en un proceso leucémico agudo. La descripción del medulograma hizo pensar en un proceso agudo mixto debido a la presencia de blastos de naturaleza mielóide y linfóide. Sin embargo, también se observaron elementos característicos de un proceso mieloproliferativo crónico y con estos elementos surgió la sospecha de que se trataba de una LMC en CB.

El estudio de los marcadores inmunológicos, así como el análisis de la BMO, apuntaron hacia un proceso leucémico agudo híbrido en el caso del inmunofenotipo, y no linfóide en el caso de la BMO. El estudio molecular detectó la positividad del gen de fusión "Major" BCR/ABL, característica de LMC. Por tanto, con el resultado de estos tres estudios se pudo concluir que se trataba de una LMC en CB.

El estudio de marcadores moleculares que se realiza de manera rutinaria para el estudio de las LMA develó la positividad en dos de ellos, el gen de fusión AML-1/ETO y la mutación NPM-1A. Este resultado permitió caracterizar a la CB como de naturaleza mielóide. Hasta donde conocemos, no ha sido reportado con anterioridad la presencia simultánea del gen de fusión AML-1/ETO y la mutación NPM-1A en un paciente con LMC en CB.

Del gen AML-1, conocido también como RUNX1, se sabe que aparece con relativa frecuencia involucrado en diferentes traslocaciones o que sufre mutaciones en los pacientes con LMC en CB.<sup>25</sup> Un estudio de secuenciación de una serie de genes, en pacientes con LMC en CB, encontró una mayor frecuencia de mutaciones en el gen RUNX1 (33,3 %), seguido del ASXL1 (20,5 %) y el IKZF1 (17,9 %).<sup>8</sup>

Particularmente se conoce que los genes RUNX1 e IKZF1 están involucrados en la diferenciación celular y que representan alteraciones moleculares de importancia en la progresión de la LMC hacia la CB.<sup>8,26</sup>

En cuanto a las mutaciones en el gen NPM-1, contrariamente a su frecuencia en las LMA, se presentan muy raramente en la LMC. Watkins y col no encontraron absolutamente ninguna mutación en este gen en dos grupos de pacientes con LMC en diferentes estadios, uno en FC y otro en CB.<sup>20</sup> Por su parte, Grossman y cols. estudiaron la presencia de aberraciones en el exón 12 del gen NPM-1 pero no encontraron anormalidad alguna.<sup>8</sup> Ambos grupos concluyeron que estas mutaciones no tienen una implicación de importancia en el inicio y progresión de la LMC. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, al menos dos trabajos previos han encontrado el gen NPM-1 mutado asociado a la LMC. En un primer reporte, el gen NPM-1 se encontró mutado en un caso de LMC en CB, mientras que en el segundo, se considera que la mutación surgió a consecuencia de una LMA secundaria al tratamiento con imatinib.<sup>18,19</sup>

El caso que se presenta es extremadamente raro, debido a la presencia simultánea de dos marcadores moleculares de LMA: el gen de fusión AML1-ETO y la mutación NPM-1A, y sería, además, el tercer reporte de casos de LMC en CB donde aparece el gen NPM-1 mutado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, Skorski T. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J Clin Invest.* 2010 Jul;120(7):2254-64. doi: 10.1172/JCI41246
2. Cortes J. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am.* 2004 Jun;18(3):569-84.
3. Radich JP. The Biology of CML Blast Crisis. *ASH Education Book.* 2007 Jan, 2007(1):384-91. doi: 10.1182/asheducation-2007.1.384
4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. Myeloproliferative neoplasms. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon, France, 2008.
5. Comert M, Baran Y, Saydam G. Changes in molecular biology of chronic myeloid leukemia in tyrosine kinase inhibitor era. *Am J Blood Res* 2013;3(3):191-200.
6. Burke BA, Carroll M. BCR-ABL: a multi-faceted promoter of DNA mutation in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 2010;24:1105-12
7. Hehlmann R, Saussele S. Treatment of chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Haematologica* 2008;93(12):1765-69.
8. Grossmann V, Kohlmann A, Zenger M, Schindela S, Eder C, Weissmann S, et al. A deep-sequencing study of chronic myeloid leukemia patients in blast crisis (BC-CML) detects mutations in 76.9% of cases. *Leukemia* 2011;25:557-60, doi:10.1038/leu.2010.298

9. Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, Kato N, Uchida T, Haraguchi K, et al. Hes1 immortalizes committed progenitors plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2010 Apr;115(14):2872-81. doi: 10.1182/blood-2009-05-222836
10. Ito T, Kwon HY, Zimdahl B, Congdon KL, Blum J, Lento WE, et al. Regulation of myeloid leukaemia by the cell-fate determinant Musashi. *Nature*. 2010 Aug 5;466(7307):765-8. doi: 10.1038/nature09171.
11. Shen Q, Liu S, Hu J, Chen S, Yang L, Li B, et al. The differential expression pattern of the BMI-1, SALL4 and ABCA3 genes in myeloid leukemia. *Cancer Cell Int*. 2012 Oct;12(1):42. doi: 10.1186/1475-2867-12-42.
12. Merzianu M, Medeiros LJ, Cortes J, Yin C, Lin P, Jones D, et al. inv(16)(p13q22) in chronic myelogenous leukemia in blast phase: a clinicopathologic, cytogenetic, and molecular study of five cases. *Am J Clin Pathol* 2005;124:807-14.
13. Dvorak P, Hruby M, Subrt I. Development of acute myeloid leukemia associated with Ph-negative clone with inv(3)(q21q26) during imatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2009;33:860-1.
14. Castaigne S, Berger R, Jolly V, Daniel MT, Bernheim A, Marty M, et al. Promyelocytic blast crisis of chronic myelocytic leukemia with both t(9;22) and t(15;17) in M3 cells. *Cancer* 1984 Dec;54(11):2409-13.
15. Najfeld V, Wisch N, Mascarenhas J, Issa L, Tripodi J, Sidhu M, et al. Development of t(8;21) and RUNX1-RUNX1T1 in the Philadelphia-positive clone of a patient with chronic myelogenous leukemia: additional evidence for multiple steps involved in disease progression. *Cancer Genetics*. 2011 Mar;204(3):165-70.
16. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood*. 2007 Feb;109(3):874-85.
17. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005 Jan;352(3):254-66.
18. Georgiou G, Efthymiou A, Vardounioti I, Boutsikas G, Angelopoulou MK, Vassilakopoulos TP, et al. Development of acute myeloid leukemia with NPM1 mutation, in Ph-negative clone, during treatment of CML with imatinib. *Leukemia*. 2012;26:824-26. doi:10.1038/leu.2011.280.
19. Piccaluga PP, Sabattini E, Bacci F, Agostinelli C, Righi S, Salmi F, et al. Cytoplasmic mutated nucleophosmin (NPM1) in blast crisis of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2009;23:1370-71. doi:10.1038/leu.2009.95.
20. Watkins DB, Hughes TP, White DL, D'Andrea RJ. NPM1 mutations occur rarely or not at all in chronic myeloid leukaemia patients in chronic phase or blast crisis. Letters to the editor. *Leukemia* 2013;27:489-90; doi:10.1038/leu.2012.193
21. Oki Y, Jelinek J, Beran M, Verstovsek S, Kantarjian HM, Issa JP. Mutations and promoter methylation status of NPM1 in myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2006;91:1147-48.



22. van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of BIOMED-1 Concerted Action. *Leukemia* 1999;13:1901-28.
23. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*.1996;10:1911-8.
24. Ottone T, Ammatuna E, Lavorgna S, Noguera NI, Buccisano F, Venditti A, et al. An allele-specific RT-PCR assay to detect type A mutation of the nucleophosmin-1 gene in acute myeloid leukemia. *J Mol Diagn.* 2008 May;10(3):212-6. doi: 10.2353/jmoldx.2008.070166
25. Yamamoto K, Tsuzuki S, Minami Y, Yamamoto Y, Abe A, Ohshima K, et al. Functionally deregulated AML1/RUNX1 cooperates with BCR-ABL to induce a blastic phase-like phenotype of chronic myelogenous leukemia in mice. *PLoS One.* 2013 Sep;8(9):e74864. doi: 10.1371/journal.pone.0074864
26. Zhao LJ, Wang YY, Li G, Ma LY, Xiong SM, Weng XQ, et al. Functional features of RUNX1 mutants in acute transformation of chronic myeloid leukemia and their contribution to inducing murine full-blown leukemia. *Blood.* 2012 Mar;119(12):2873-82; doi:10.1182/blood-2011-08-370981.

Recibido: 7 de julio de 2014.

Aceptado: 17 de agosto de 2014.

DraC. *Ana María Amor Vigil*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, Cuba. Tel (537) 643 8695, 8268. Fax (537) 644 2334. E mail: [rchematologia@infomed.sld.cu](mailto:rchematologia@infomed.sld.cu)