

Mutación NPM1-A en pacientes cubanos con leucemia mieloide aguda, su coexistencia con otras alteraciones moleculares

NPM1-A mutation in cuban patients with acute myeloid leukemia, its coexistence with other molecular disorders

Ana María Amor-Vigil, Carmen A Díaz-Alonso, Heydis Garrote-Santana

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

RESUMEN

En el año 2005 se reportó por primera vez que en la leucemia mieloide aguda (LMA) se detectan frecuentemente mutaciones en el gen de la nucleofosmina (NPM1). Actualmente, estas mutaciones representan la alteración genética más frecuente en dicha entidad y han mostrado tener significado pronóstico. La mutación más común de las descritas es la NPM1-A, que aparece entre el 75 y el 80 % de los enfermos. Mediante un ensayo de RT-PCR alelo específico, se estudió la NPM1-A en 32 pacientes cubanos con LMA, cuyas muestras de ARN estaban conservadas a -20°C. Once pacientes (34,4 %) fueron positivos a la mutación. Entre los pacientes positivos a NPM1-A, uno portaba dos alteraciones moleculares más, el gen de fusión AML1-ETO y la duplicación interna en tándem del gen FLT3 (FLT3-ITD, siglas en inglés). En dos pacientes concomitó la mutación NPM1-A con la FLT3-ITD y en otro, se encontró la mutación junto con el gen de fusión AML1-ETO. Un estudio más amplio permitirá correlacionar la NPM1-A con la evolución de la enfermedad, así como conocer su interacción con otros marcadores moleculares.

Palabras clave: mutación NPM1-A; leucemia mieloide aguda; FLT3-ITD.

ABSTRACT

In 2005 the frequent detection of nucleophosmin-1 (NPM1) gene mutation in acute myeloid leukemia (AML) was reported for the first time. At present, this represents the most frequent gene alteration in AML which has demonstrated prognostic

significance. The most common NPM1 mutation type appearing in 75 - 80 % of the patients, is the NPM1-A. Through an allele-specific RT-PCR assay the NPM1-A was studied in 32 AML Cuban patients at the onset of the disease. RNA samples conserved at -20°C were used. Eleven patients (34,4%) showed NPM1-A. Among the NPM1-A positive patients, one presented two additional molecular disorders: the AML1-ETO fusion gene and the FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD). In other patient, NPM1-A was concomitant to FLT3-ITD and in a third one, the AML1-ETO fusion gene was found besides NPM1-A. An extended study will allow to correlate NPM1-A mutation and outcome disease, and will let us know the interaction with other molecular markers.

Keywords: NPM1-A mutation; acute myeloid leukemia; FLT3-ITD.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los estudios genéticos y moleculares en la leucemia mieloide aguda (LMA) ha permitido asociar ciertas alteraciones genéticas con algunos subtipos de LMA. Esta clasificación estratifica a la LMA de manera más relacionada con el origen o causa de la leucemogénesis. Conocer las bases moleculares de esta entidad ha dado comienzo al desarrollo y aplicación de fármacos más específicos a los diferentes subtipos leucémicos.

Desde la clasificación de la LMA propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2001, ya se incluyeron como entidades particulares aquellas donde están presentes la t(8;21), la inv(16) y la t(15;17) junto con otras relacionadas con el gen RAR α del cromosoma 17. En 2008 se emitieron nuevas recomendaciones para la clasificación de la LMA¹. En ella se establecen nuevos subtipos caracterizados por otras alteraciones moleculares, como la presencia de la t(6;9) que da lugar al gen de fusión DEK-NUP214 y la t(1;22) que forma el RBM15-MKL1. También se propone que las LMA con mutaciones en el gen de la nucleofosmina (NPM1) se agrupen en una entidad provisional en espera de nuevos estudios para su definitiva clasificación.^{1,2}

La nucleofosmina (NPM1, conocida también como B23, No38 y numatrina) es una proteína multifuncional. Fue identificada primeramente en grandes cantidades como una fosfoproteína en la región granular del nucleolo, a lo que debe su nombre. Se conoce que viaja entre el núcleo y el citoplasma y que tiene una importante función en varios procesos celulares. Su actividad se asoció inicialmente a la estimulación de la expresión del ARN ribosomal, al ensamblaje y procesamiento del ARN pre-ribosomal y a la exportación del ribosoma hacia el citoplasma³. Sin embargo, en los últimos años ha crecido exponencialmente el conocimiento acerca de los procesos celulares en los que participa dicha proteína. Las evidencias señalan que interviene también en la remodelación de la cromatina, en la duplicación del centrosoma, en la replicación, recombinación, transcripción y reparación del ADN, así como en el control de la progresión del ciclo celular y en la respuesta al daño celular.³

En los pacientes con LMA aparecen frecuentemente mutaciones en el gen NPM1. Dichas mutaciones están con frecuencia localizadas en el exón 12 del gen y consisten en pequeñas deleciones o inserciones que producen modificaciones en el dominio C-

terminal de la proteína. Esta modificación provoca la exportación aberrante de la proteína NPM1 desde el núcleo hacia el citoplasma donde se acumula. Aunque se han descrito más de 50 mutaciones diferentes, la más común es la denominada mutación A (NPM1-A) que aparece en el 75 al 80 % de los casos. Esta consiste en una duplicación del tetranucleótido TCTG en la posición 956 a 959 de la secuencia del gen NPM1.⁴

Las mutaciones en NPM1 aparecen en el 35 % de casi todos los subtipos morfológicos de LMA y representan la mutación más frecuente en esta entidad. Las mutaciones están asociadas a un cariotipo normal en el 85 % de los casos de las LMA *de novo*. Los pacientes con LMA que tienen un cariotipo normal y que portan solamente el gen NPM1 mutado, transitan por una mejor respuesta al tratamiento y tienen mayor supervivencia libre de enfermedad. Sin embargo, es bien conocido que la presencia simultánea del gen NPM1 mutado y una alteración molecular de pronóstico desfavorable, como puede ser la duplicación interna en tándem del gen FLT3 (FLT3-ITD, por sus siglas en inglés), se asocia a un curso de alto riesgo para el paciente.⁵

Se han desarrollado varios protocolos y técnicas para detectar las mutaciones en el gen NPM1. Entre ellos, la secuenciación y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) cuantitativa en tiempo real son los más recomendados.⁶ Ambos tienen alta especificidad y sensibilidad pero el elevado costo es su mayor desventaja y por esta razón son inaccesibles a muchos laboratorios. Con la intención de encontrar un método con mayor posibilidad de generalización, Ottone y col diseñaron un protocolo de PCR alelo específica con previa reverso transcripción (ASO-RT-PCR, por sus siglas en inglés), que permite la amplificación específica de la mutación NPM1-A.⁷ Este ensayo realiza una detección rápida y sensible de la mutación más frecuente del gen NPM1.

Con la introducción de dicho protocolo se reporta por primera vez la presencia de la NPM1-A en pacientes cubanos. Además, se muestra la coexistencia de otras alteraciones moleculares, los genes de fusión AML1-ETO y la FLT3-ITD, en los pacientes positivos a la NPM1-A que ya estaban estudiados con anterioridad.

MÉTODOS

Se estudiaron 32 muestras de ARN conservadas a -20°C, de pacientes con LMA en los que habían sido estudiadas con anterioridad otras alteraciones moleculares: los genes de fusión AML1-ETO y CBFβ-MYH11, así como la FLT3-ITD. La selección de las muestras dependió solo de la integridad del ARN y no de la positividad a alguno de los marcadores moleculares mencionados. La degradación del material fue descartada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

El estudio se realizó según el protocolo ASO-RT-PCR reportado por Ottone y col.⁷ Después de obtener ADN complementario (ADNc) mediante reverso transcripción⁸ se realizó la amplificación del fragmento con el empleo de los siguientes cebadores:

NPM1-A (5´ CCAAGAGGCTATTCAAGATCTCTCTC 3´)

NPM1-Rev6 (5´ ACCATTTCCATGTCTGAGCACC 3´)

Para la PCR se añadieron 2 mL de ADNc a un volumen total de 50 µL. La mezcla de reacción contenía: 10 pmoles de cada cebador, 2.5 mmol/L de MgCl₂, 5 mmol/L de dntp y 0.7 U de Taq ADN polimerasa en tampón de PCR. La amplificación se realizó en

un termociclador con el programa propuesto por Ottone y col.⁷ Primeramente, un paso de desnaturalización a 95°C durante 7 min, seguido de 35 ciclos con ÷ desnaturalización a 95°C por 30 s, hibridación a 67°C durante 45 s y polimerización a 72°C durante 45 s; al final, una polimerización a 72°C durante 7 min.

El producto de PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % junto a un control positivo y un marcador de peso molecular. La positividad se confirmó con la presencia de una banda de 320 pb.

RESULTADOS

De los pacientes estudiados, 11 fueron positivos a la NPM1-A, lo que representó el 34,4 %. Del total de pacientes, siete habían sido positivos al gen de fusión AML1-ETO (21,9 %), dos al gen de fusión CBFb-MYH11 (6,2 %), y siete a la FLT3-ITD (21,9 %).

Entre los pacientes positivos a NPM1-A (tabla), cuatro presentaron otra de las alteraciones estudiadas con anterioridad. Así, tres fueron positivos a la FLT3-ITD (27,3 %) y dos al AML1-ETO (18,2 %). A su vez, uno de los cuatro pacientes fue positivo simultáneamente a ambas alteraciones, la FLT3-ITD y el gen de fusión AML1-ETO. En ningún paciente se encontró coexistencia de la NPM1-A con el gen de fusión CBFb-MYH11.

Tabla. Coexistencia de la mutación NPM1-A con otras alteraciones moleculares

CANTIDAD DE PACIENTES	NPM1-A	FLT3-ITD	AML1-ETO	CBFβ-MYH11
1	+	+	+	negativo
2	+	+	negativo	negativo
1	+	negativo	+	negativo
7	+	Negativo	negativo	negativo
Pacientes positivos (%)*	11	3 (27,3 %)	2 (18,2 %)	0

* Porcentaje relativo a los pacientes positivos a la mutación NPM1-A.

DISCUSIÓN

Desde que fueron identificadas las mutaciones en el gen NPM1, se han encontrado más de 50 variantes moleculares, siendo la NPM1-A la más frecuente (75 al 80 %).⁴ Teniendo en cuenta lo anterior, Ottone y col propusieron un ensayo de PCR que amplifica de manera específica la mutación NPM1-A.⁷ El ensayo consiste en una PCR cualitativa con reverso transcripción previa, por lo que en un laboratorio con equipamiento básico para estudios de biología molecular a partir de ARN, solo se requerirá la adquisición del par de cebadores correspondientes. Su principal desventaja es que detecta solamente la NPM1-A, pero la escasa presencia del resto de mutaciones NPM1, hace meritoria su implementación.⁷

A pesar de que solo se estudió la NPM1-A de entre el resto de mutaciones posibles en NPM1, los resultados corroboran que esta fue la más frecuente entre otras alteraciones moleculares que habían sido estudiadas con antelación en estos pacientes: los genes de fusión AML1-ETO y CBFb-MYH11 y la FLT3-ITD. En cuanto a la prevalencia del gen NPM1 mutado, el resultado coincide con lo reportado por otros autores.⁹⁻¹

En el 85 % de los casos, las mutaciones en NPM1 están asociadas a un cariotipo normal². Aunque algunos autores han sugerido que estas mutaciones y las anormalidades genéticas recurrentes son mutuamente excluyentes en los pacientes con LMA,¹¹ se han encontrado ejemplos de la coexistencia de mutaciones en NPM1 con otras anormalidades cromosómicas y moleculares.^{11,12} El gen de fusión AML1-ETO es consecuencia de una translocación entre los cromosomas 8 y 21. La coexistencia de la NPM1-A con dicho gen de fusión corresponde, por tanto, a dos pacientes con cariotipo anormal. Ambas alteraciones se reportan como de buen pronóstico. Sin embargo, en uno de estos pacientes fue hallada también la FLT3-ITD, alteración que confiere pronóstico desfavorable.

La FLT3-ITD es la alteración más frecuente entre las LMA con NPM1 mutado¹³, y en el pequeño grupo de pacientes de este estudio se cumplió esta característica.

No fue objetivo de este reporte analizar el significado pronóstico de la NPM1-A ni las interacciones y consecuencias de su coexistencia con otras alteraciones moleculares. Comenzar a estudiar la NPM1-A en nuestras condiciones, permitirá arribar a conclusiones cuando se cuente con un mayor número de pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arber DA, Brunning RD, Le Beau MM, Falini B, Vardiman JW, Porwit A, et al. Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. En: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al (eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer: 2008.
2. Falini B, Martelli MP, Bolli N, Sportoletti P, Liso A, Tiacci E, et al. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? *Blood*. 2011 Jan;117(4):1109-20. doi:10.1182/blood-2010-08-299990
3. Federici L, Falini B. Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: A tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Science*. 2013 Feb;22(5):545-56. doi:10.1002/pro.2240
4. Pastore F, Greif PA, Schneider S, Ksienzyk B, Mellert G, Zellmeier E, et al. The NPM1 Mutation Type Has No Impact on Survival in Cytogenetically Normal AML. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e109759. doi:10.1371/journal.pone.0109759.
5. Shamaa S, Laimon N, Aladle DA, Azmy E, Elghannam DM, Salem DA, et al. Prognostic implications of NPM1 mutations and FLT3 internal tandem duplications in Egyptian patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Hematology*. 2014 Jan;19(1):22-30. doi:10.1179/1607845413Y.0000000085.

6. Falini B, Martelli MP, Pileri SA, Mecucci C. Molecular and alternative methods for diagnosis of acute myeloid leukemia with mutated NPM1: flexibility may help. *Haematologica*. 2010 Apr;95(4):529-34. doi:10.3324/haematol.2009.0178225.
7. Ottone T, Ammatuna E, Lavorgna S, Noguera NI, Buccisano F, Vendittiet 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 Diagnostics*. 2008 May;10(3):212-6. doi:10.2353/jmoldx.2008.070166.
8. van Dongen JJ, 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 the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13:1901-28. doi:10.1038/sj/leu/2401245.
9. Braoudaki M, Papathanassiou C, Katsibardi K, Tourkadoni N, Karamolegou K and Tzortzatou-Stathopoulou F. The frequency of NPM1 mutations in childhood acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2010 Oct;3(1):41-5. doi:10.1186/1756-8722-3-41
10. Schneider F, Hoster E, Schneider S, Dufour A, Benthaus T, Kakadia PM, et al. Age-dependent frequencies of NPM1 mutations and FLT3-ITD in patients with normal karyotype AML (NK-AML). *Ann Hematol*. 2012;91:9-18.
11. Falini B, Mecucci C, Saglio G, Lo Coco F, Diverio D, Brown P, et al. NPM1 mutations and cytoplasmic nucleophosmin are mutually exclusive of recurrent genetic abnormalities: a comparative analysis of 2562 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2008 Mar;93(3):439-42. doi: 10.3324/haematol.12153.
12. Balatzenko G, Spassov B, Stoyanov N, Ganeva P, Dikov T, Konstantinov S, et al. NPM1 Gene Type A Mutation in Bulgarian Adults with Acute Myeloid Leukemia: A Single-Institution Study. *Turk J Hematol*. 2014 Mar;31(1):40-8. doi: 10.4274/Tjh.2013.0023.
13. 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.

Recibido: febrero 23, 2015.

Aceptado: noviembre 21, 2015.

DraC. Ana María Amor Vigil. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA. Tel (537) 643 8695, 8268
Email: rchematologia@infomed.sld.cu