

Factores moleculares pronóstico en leucemia mieloide aguda: detección de mutaciones en FLT3, NPM1 y CEBPA

Dourisboure R.

Bioquímico, Laboratorio Central, Hospital Gral. De Agudos "J.M. Ramos Mejía".
Oncolab-Unidad de Investigaciones Oncohematológicas

e-mail: rdourisboure@yahoo.com.ar

Fecha de recepción: 03/11/2012
Fecha de aprobación: 12/11/2012



LABORATORIO

HEMATOLOGIA, Vol. 16 N° 3: 200-202
Septiembre-Diciembre, 2012

RESUMEN

Los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) y estudio citogenético normal (LMA-CN) quedan clasificados dentro del grupo de riesgo intermedio (aproximadamente 40-50%) con un período libre de enfermedad variable debido probablemente a la heterogeneidad molecular que presentan estos pacientes. Se han identificado mutaciones somáticas en varios genes como: FLT3, NPM1, CEBPA, MLL, NRAS, KIT, WT1, RUNX1, TET2, IDH1/2, DNMT3A, ASXL1, PHF6 cuyo significado pronóstico varía entre ellos. De esta manera, mutaciones en FLT3 (37% a 46% de los pacientes) indican mal pronóstico mientras que lo inverso ocurre con mutaciones en NPM1 (48% a 53% de los pacientes) y CEBPA (13% a 15% de los pacientes).

Palabras claves: leucemia aguda, pronóstico, FLT3, NPM1, CEBPA

ABSTRACT

Patients with acute leukemia and normal karyotype (AML-NK) are classified in an intermediate risk group (approximately 40-50%) with a variable disease free survival period probably due to their molecular heterogeneity. Somatic mutations have been identified in several genes: FLT3, NPM1, CEBPA, MLL, NRAS, KIT, WT1, RUNX1, TET2, IDH1/2, DNMT3A, ASXL1, PHF6 with different prognosis impact. Thereby, mutations in FLT3 (37%-46% of patients) have negative prognostic impact while the opposite occur with mutations in NPM1 (48%-53% of patients) and CEBPA (13%-15% of patients).

Key words: acute leukemia, prognosis, FLT3, NPM1, CEBPA

INTRODUCCIÓN

Mutaciones en FLT3

FLT3 (fms-like tirosina quinasa 3) pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa clase III como el KIT, FMS y PDGFR con quienes comparte una estructura similar como ser 5 dominios tipo-inmunoglobulina en la región extracelular, un dominio yuxtamembrana (JM), 2 dominios quinasa (TK1 y TK2) separados por un dominio de inserción (KI) y un dominio C-terminal en la región intracelular. Debido a que está expresado predominantemente en células stem hematopoyéticas y su ligando (FL) se encuentra en el estroma medular, la interacción FLT3-FL juega un rol importante en la hematopoyesis inicial. La amplificación, sobre-expresión o mutaciones somáticas del receptor están implicadas en su activación constitutiva en el desarrollo de la malignidad. Una alteración encontrada en pacientes con LMA es una duplicación en tándem (ITD) de la secuencia del dominio JM cuya longitud puede variar entre 3 y 400 pares de bases y su posición difiere entre los pacientes pero siempre se encuentra dentro del marco de lectura (*in frame*) produciendo una proteína funcional. Este cambio está asociado a leucocitosis, alto porcentaje de blastos en la médula ósea, un riesgo aumentado de recaída y supervivencia disminuida. Otra alteración molecular se encontró en los codones 835 y 836 en un porcentaje menor de pacientes (7-10%) y consiste en una mutación puntual en el loop de activación del segundo dominio

tirosina quinasa (TK2) aunque su relevancia como factor pronóstico no es aún clara.

Muestra: Médula ósea o sangre periférica en el momento del diagnóstico extraída con EDTA como anticoagulante. Gradiente de ficoll para separación de células mononucleares y extracción de ADN o ARN. Los ácidos nucleicos pueden conservarse a baja temperatura hasta tener información del estudio citogenético para proceder a su procesamiento.

Fundamento:

1. Detección de ITD: amplificación de un fragmento del ADN o del cADN entre los exones 14 y 15 del gen. Para la visualización el producto de PCR se siembra en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio y se observa la duplicación de la banda original comparándola con la del control negativo. Debido a que puede existir una duplicación menor a 3 bases de longitud se recomienda la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida 9-10% debido a su mayor sensibilidad en la detección de pequeños cambios. En el caso de que el laboratorio tenga disponibilidad de un equipo de secuenciación puede efectuarse *gene scanning* para determinar la longitud de los fragmentos utilizando oligonucleótidos marcados con fluoróforos.
2. Detección de la mutación puntual en TK2: amplificación del ADN del exón 20 y secuenciación directa del producto de PCR. Se describieron diversos cambios en el codón 835 que involucran en todos los casos el cambio en la proteína de un ácido aspártico (D) por Y, V, H, E y N. Por la técnica de PCR en tiempo real puede detectarse la mutación con sondas específicas. También puede efectuarse la digestión enzimática con EcoRV y análisis de los RFLP en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. Como la mutación elimina un sitio de corte para esta enzima, se observa una banda extra de mayor tamaño comparada con un control *wild type*.

Mutaciones en NPM1:

El gen de la nucleofosmina (NPM1) se encuentra en el cromosoma 5 y codifica para una fosfoproteína nucleolar de 294 aminoácidos que se traslada constantemente entre el núcleo, el nucleolo y el citoplasma. Se han identificado algunas funciones como promotor de la biogénesis de los ribosomas, control de la duplicación del centrosoma durante el ciclo celular, modulación de la función de factores de transcripción supresores de tumores y regulación de la función y estabilidad de varias proteínas nucleares por su pro-

iedad de molécula chaperona. Se han identificado más de 26 mutaciones diferentes en pacientes con leucemia mieloide aguda que consisten en inserciones/deleciones cortas (entre 4 y 10 pb) en las posiciones 956 a 971 en el exón 12 del gen que conducen a un cambio en el marco de lectura provocando diferentes proteínas variantes que difieren en la porción C terminal. La mutación A es la más común y consiste en una duplicación TCTG en la posición 956 a 959.

Fundamento:

Amplificación del exón 12 del gen NPM1 y secuenciación directa o *gene scanning* del producto amplificado. Debido a que la zona de inserción de bases se encuentra cercana al sitio de *splicing* y el intrón precedente posee un tramo de T prolongado, se produce "patinaje" de la ADN polimerasa y las secuenciaciones pueden resultar muy dificultosas. Se recomienda utilizar cADN para la amplificación de esta zona. En el caso de no contar con equipamiento para estas técnicas está descrita en la literatura una amplificación alelo específica solamente para la mutación A como una semi-nested ASO PCR.

Mutaciones en CEBPA:

El gen CEBPA codifica para un factor de transcripción, CCAAT/enhancer binding proteína alfa (CEBP/ α) perteneciente a la familia de los cierras de leucina y juega un rol en la diferenciación de granulocitos. La mayor parte de los pacientes con leucemia mieloide aguda y mutaciones en CEBPA tienen 2 mutaciones simultáneamente (CEBPAdoble-mut), que involucran con mayor frecuencia una combinación de una mutación con cambio del marco de lectura en la región N-terminal y una inserción C-terminal que generalmente son bialélicas. Actualmente se considera que solamente la CEBPAdoble-mut está asociada a un pronóstico favorable.

Fundamento:

Amplificación del ADN o del cADN de toda la región codificante del gen con 3 juegos de oligonucleótidos superpuestos y secuenciación directa de los productos amplificados. Se han encontrado duplicaciones, inserciones y deleciones entre 2 bases y 4 bases.

Utilidad clínica:

Los marcadores pronósticos clínicos y genéticos son centrales en la evaluación de pacientes con leu-

cemia mieloide aguda adquiriendo una importancia crítica para el manejo racional de la clínica, lo que puede incluir la selección de pacientes para ensayos clínicos de terapias dirigidas (como inhibidores de tirosina quinasa para FLT3 mutado) o la decisión del trasplante alogénico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Smith ML, Hills RK, Grimwade D. Independent prognostic variables in acute myeloid leukaemia. **Blood Rev** (2011) Jan; 25(1): 39-51.
2. Rosemary E. Gale, Claire Green, Christopher Allen, Adam J. Mead, Alan K. Burnett, Robert K. Hills, and David C. Linch, The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. **Blood** (2008); 111: 2776-2784.
3. Weina Chen, Georgios Z. Rassidakis, and L. Jeffrey Medeiros. Nucleophosmin Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia. **Arch Pathol Lab Med.** (2006); 130: 1687-1692.
4. Bas J. Wouters, Bob Lowenberg, Claudia A. J. Erpelinck-Verschueren, Wim L. J. van Putten, Peter J. M. Valk, and Ruud Delwel. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. **Blood** (2009); 113: 3088-3091.