

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Aplicación de un método de screening para la detección de mutaciones en el exón 12 del gen de la nucleofosmina (NPM1) en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda

Martins, María Constanza<sup>1</sup>; Nuñez, Andrea Del Pilar<sup>1</sup>; Alonso, Cristina<sup>2</sup>; Rubio, Patricia<sup>2</sup>; Orellano, Laura<sup>3</sup>; Alonso, Marta Beatriz<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Servicio de Bioquímica, Sección Hematología, Sector Hematología-Oncología, Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Departamento de Diagnóstico y Tratamiento, Hospital Nacional Alejandro Posadas, El Palomar, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Servicio de Hematología-Oncología, Hospital de Pediatría Garrahan, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup>Laboratorio de Biología Molecular-Genética, Servicio de Laboratorio Central, Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría Sor María Ludovica, La Plata, Argentina.

Contacto: Martins, María Constanza; Hospital Nacional Alejandro Posadas, Presidente Illia y Marconi, El Palomar (1684), Morón, Buenos Aires, Argentina; martinsconstanza@gmail.com

## Resumen

Introducción: la edición revisada del año 2017 de la clasificación de Neoplasias Mieloides y Leucemias Agudas de la Organización Mundial de la Salud clasificó las leucemias mieloides agudas con la mutación en el gen NPM1 como una entidad definida. Por esta razón, se cree que es importante implementar esta determinación en todos los laboratorios que realicen estudios de biología molecular, para completar el perfil de estudios moleculares de la leucemia mieloide aguda. Objetivo: evaluar un método de *screening* simple y rápido para la detección de mutaciones en el gen de la nucleofosmina (NPM1) en los laboratorios de diagnóstico molecular de baja complejidad. Materiales y métodos: se procesaron muestras de pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda y el gen NPM1 mutado. Se realizó una amplificación, con el método de la reacción en cadena de la polimerasa, de la zona del gen en la cual se reportan las mutaciones. Luego, se favoreció la formación de heterodúplex y se visualizó en un gel de agarosa de alta resolución. Se probaron en paralelo muestras de pacientes con otras neoplasias no mieloides consideradas como controles negativos. Resultados: se procesaron 29 muestras (17 adultos y 12 pediátricos) con leucemia mieloide aguda y 60 muestras de pacientes con otras neoplasias. Las muestras con mutaciones del gen NPM1 presentaron una banda de mayor peso molecular respecto de la *wild type*. En las muestras de otras neoplasias no mieloides solo se observó la banda *wild type*. Conclusiones: se propone este método como *screening* de las mutaciones del gen NPM1 y la incorporación de un algoritmo propuesto para su confirmación y posterior caracterización.

**Palabras clave:** NPM1, leucemia mieloide aguda, diagnóstico molecular, estratificación de riesgo, *screening*, heterodúplex.

## Abstract

Introduction. The 2017 revised edition of the Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias of the World Health Organization classified acute myeloid leukemias with mutations in the nucleophosmin gene (NPM1) as a defined entity. Thus, it should be important to implement an assay to detect these mutations in all laboratories that perform molecular biology studies to complete the profile of molecular studies of AML. Objective. To evaluate a simple, fast screening method to detect mutations in NPM1 in low complexity molecular diagnostic laboratories. Materials and methods. Samples from patients diagnosed with acute myeloid leukemia and mutated NPM1 were processed, and PCR amplification of the area of the gene in which mutations are reported was performed. Then, the formation of heteroduplex was favored and visualized by high-resolution agarose electrophoresis. Samples from other non-myeloid neoplasms, considered as negative controls, were tested in parallel. Results. The samples with mutations of the NPM1 gene included (17 adults and 12 children) in this study had a higher molecular weight band than the wild-type band. In the samples of other non-myeloid neoplasms (n=60), only the wild-type band was observed. Conclusions. This methodology is proposed as screening of mutations of the NPM1 gene. Besides, the algorithm presented in this work should be incorporated for confirmation and subsequent characterization of these mutations.

**Keywords:** NPM1, acute myeloid leukemia, molecular diagnosis, risk stratification, *screening*, heteroduplex.

**Introducción**

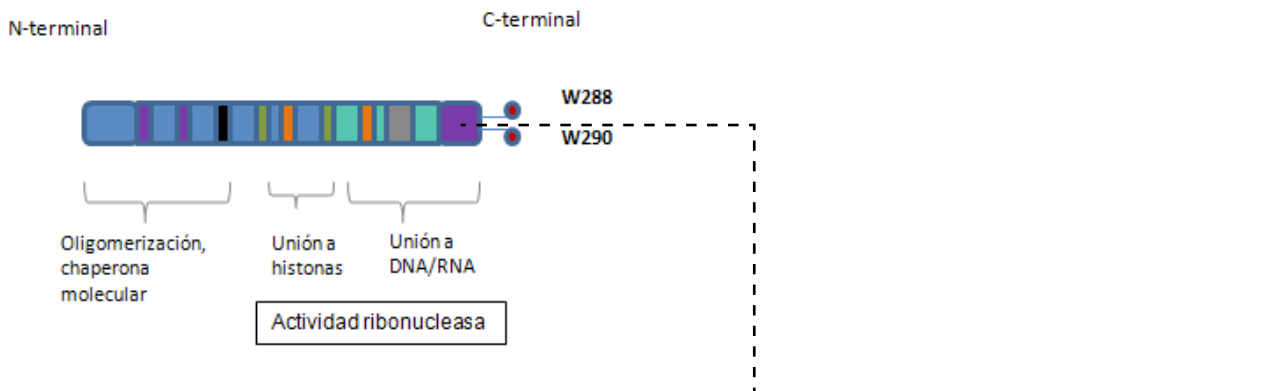
Las leucemias mieloides agudas (LMA) representan un grupo de neoplasias con marcada diversidad y heterogeneidad genética, etiología diversa y potencial evolución clonal entre los pacientes<sup>1</sup>. El 50-60% de los pacientes con LMA presentan alteraciones cromosómicas recurrentes, que se relacionan con el proceso leucemogénico y que proveen una importante información pronóstica. En los últimos años han sido descritas además, diversas alteraciones genéticas con impacto pronóstico que han contribuido notablemente a ampliar el conocimiento sobre el desarrollo de esta patología, como son las mutaciones en el gen de la nucleofosmina (NPM1). El gen NPM1 humano mapea en el cromosoma 5, en el locus 5q35, y está compuesto por 12 exones. La nucleofosmina pertenece a la familia de las chaperonas de las nucleoplasminas. Es una fosfoproteína de expresión ubicua y de localización fundamentalmente nucleolar que se desplaza constantemente del núcleo al citoplasma<sup>2</sup>. La alteración molecular de este gen produce una mutación de clase II con bloqueo en la diferenciación.

En el año 2005 fue descrita una variante mutada de la proteína NPM1 que produce una deslocalización al citoplasma, reportada en un 35% de las LMA de todos los subtipos morfológicos, exceptuados el M3, M4 (variante eosinofílica) y M7. Esta mutación fue asociada a cariotipo normal en un 85% de los casos<sup>3</sup>. Las mutaciones en el exón 12 del gen NPM1 corresponden a las alteraciones genéticas más frecuentes en la LMA con cariotipo normal, y se asocian a un pronóstico favorable en ausencia de FLT3 ITD (duplicaciones internas en

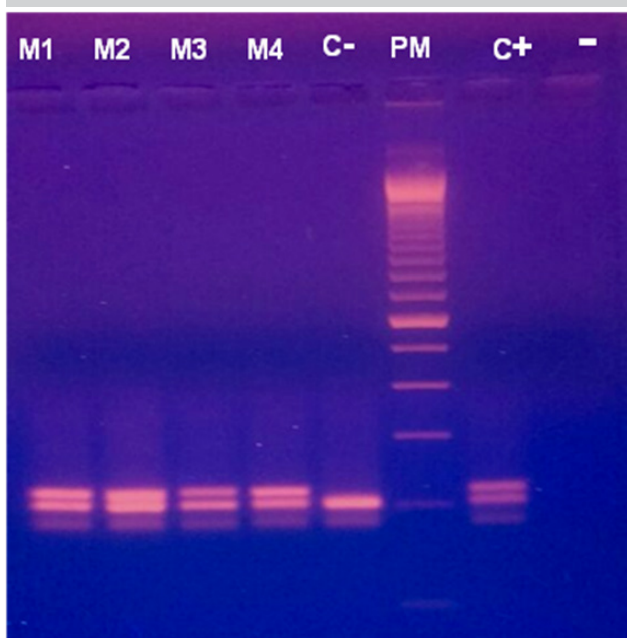
tándem en el gen FLT3) o FLT3 ITD con ratio bajo < 0.5<sup>4</sup>. Hasta el momento, existen más de 50 tipos de mutaciones reportadas<sup>5</sup>. En la figura 1 se muestra un esquema del gen y las variantes más frecuentes. Todas las mutaciones descritas producen un corrimiento en el marco de lectura que involucra la región C-terminal de la proteína. La más frecuente es la mutación de tipo A, en la cual se produce una duplicación del tetranucleótido TCTG en las posiciones comprendidas desde 956 a 959 de la secuencia nucleotídica. Le siguen en frecuencia las mutaciones tipo B, C y D, que incluyen distintas inserciones de cuatro pares de bases en la posición 960 de la secuencia. En estos casos, se produce el cambio de los últimos aminoácidos (WQWRKSL) por (CLAVEEVSLRK) en la proteína. Otras mutaciones encontradas con menor frecuencia son las tipo E y F, en las cuales se producen inserciones y deleciones, con cambios similares en la región C-terminal de la proteína. Todas muestran la pérdida de alguno de los residuos de triptófano de las posiciones 288 y 290, y comparten los mismos cinco últimos aminoácidos (VSLRK)<sup>6</sup>.

La última versión del año 2017 de la clasificación de Neoplasias y Leucemias Agudas Mieloides emitida por la Organización mundial de la Salud (OMS) clasificó las LMA con la mutación en NPM1 como una entidad definida. Por ello, en este estudio, se considera que es importante implementar la búsqueda de esta mutación en todos los laboratorios que realicen estudios de diagnóstico molecular, para completar el perfil de la LMA, y poder estratificar a los pacientes en los grupos de riesgo correspondientes para una mejor adecuación de su tratamiento<sup>7</sup>. Existen varios métodos descriptos para

**Figura 1.** Esquema de la proteína NPM1 indicando la ubicación de sus dominios funcionales y las mutaciones más frecuentes.



Tipo de mutación	Nº acceso GenBank	Secuencia	Proteína
Ninguna	NM_002520	GATCTCTGε. GCAGTE.GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DLWQWRKSL
Mutación A	AY740634	GATCTCTG <b>TCTG</b> GCAGTE. GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DLCLAVKEVSLRK
Mutación B	AY740635	GATCTCTG <b>CATG</b> GCAGTE. GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DLCMAVEEVSLRK
Mutación C	AY740636	GATCTCTG <b>CGTG</b> GCAGTE. GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DLCVAVEEVSLRK
Mutación D	AY740637	GATCTCTG <b>CCTG</b> GCAGTE. GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DLCLAVKEVSLRK
Mutación E	AY740638	GATCTCTGε. GCAGT <b>CTCTTGCCCA</b> AGTCTCTTTAAGAAAATAG	DLWQSLAQVSLRK
Mutación F	AY740639	GATCTCTGε. GCAGT <b>CCCTGGAGA</b> AAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DLWQSLKKVSLRK

**Figura 2.** Gel de agarosa de alta resolución al 3% en buffer TBE 1X.

► PM, marcador de peso molecular de 100 pb; M1, M2, M3, M4, muestras con la NPM1 mutada. En todas se observa una banda de peso molecular superior. C-, muestra control negativo donde solo se observa la banda wild type de 208 pb; C+, muestra control positivo; [-], control negativo de reactivos.

la detección de las mutaciones en este gen pero muchos requieren del uso de secuenciador, un recurso que no siempre está disponible en los laboratorios de diagnóstico molecular.

El objetivo del estudio fue evaluar un método de *screening* simple, rápido y eficaz para la detección de las mutaciones más frecuentemente descritas hasta el momento en el gen NPM1, en laboratorios de biología molecular de baja complejidad y, adicionalmente, proponer un algoritmo para la caracterización de las mutaciones detectadas.

### Materiales y métodos

Se procesaron 29 muestras de ácido desoxirribonucleico copia (ADNc) obtenidas de células de la médula ósea a partir de la punción-aspiración de la misma. Las muestras tomadas, de pacientes con diagnóstico de LMA y NPM1 mutada, provenían 17, de pacientes adultos y 12, de pacientes pediátricos, detectados en su totalidad en tres instituciones públicas de salud de la provincia de Buenos Aires y de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. El laboratorio de cada institución, realizó la caracterización de las mutaciones del gen de NPM1, según la metodología que tenía puesta a punto: PCR y corrida del producto amplificado en gel de poliacrilamida, ASO-PCR para la mutación A y corrida del producto amplificado en gel de agarosa y PCR-*GeneScanning* y secuenciación Sanger. Se analizaron 20 mutaciones de tipo A, 2 mutaciones de tipo B, 5 noveles y 2 mutaciones no A no caracterizadas (Tabla I). Se probaron en paralelo 60 muestras de neoplasias no mieloides consideradas controles negativos. Se utilizó ADNc y se ampli-

**Tabla I.** Mutaciones incluidas en el estudio.

Tipo de Mutación	Nomenclatura	Cantidad
Tipo A	c.956_959dupTCTGG	20
Tipo B	c.960_963insCATG	2
Noveles	c.961_962insCCTTTTCCC	5
	c.956_959insTGCC	
	c.955_958insATCT	
	c.961_962insTACTTTCCC	
	c.961_962indelTAGATCTCAGCAAGA	
No A/no caracterizada		2

ficó con oligonucleótidos específicos un fragmento de 208 pares de bases (pb) para el alelo *wild type*. Los oligonucleótidos utilizados fueron: forward (F) 5'-CTTCCCAAAGTGGAGCC-3' y Reverse (R) 5'-GGAAAGTTCTCACTCTGC-3'.

Las condiciones finales para 25 µl de reacción de PCR fueron las siguientes: enzima Promega 1U, buffer 1X, cloruro de magnesio 1,5 mM, oligonucleótidos forward y reverse 0,8 µM cada uno y dNTPs 200 µM cada uno. A los 24 µl de mix de reactivos se le agregó 1 µl de la muestra de ADNc. Luego se amplificó en el termociclador *Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler*, con las siguientes características de ciclado: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 54°C durante 60 segundos, 72°C durante 45 segundos y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. A continuación se prosiguió con el ciclado de 95°C durante 5 minutos, 25°C durante 15 minutos y finalmente 4°C para la formación de los heterodúplex. Los productos se conservaron en hielo mientras se sembraban 14 µl en un gel de agarosa de alta resolución *UltraPure™ Agarose 1000 de Invitrogen* al 3% en buffer TBE 1X, utilizando bromuro de etidio como agente intercalante. La corrida electroforética se realizó en una cuba horizontal a 90 voltios durante 2 horas. El resultado se visualizó en el transiluminador UV (*UV Transilluminator UVP*) y se documentó fotográficamente.

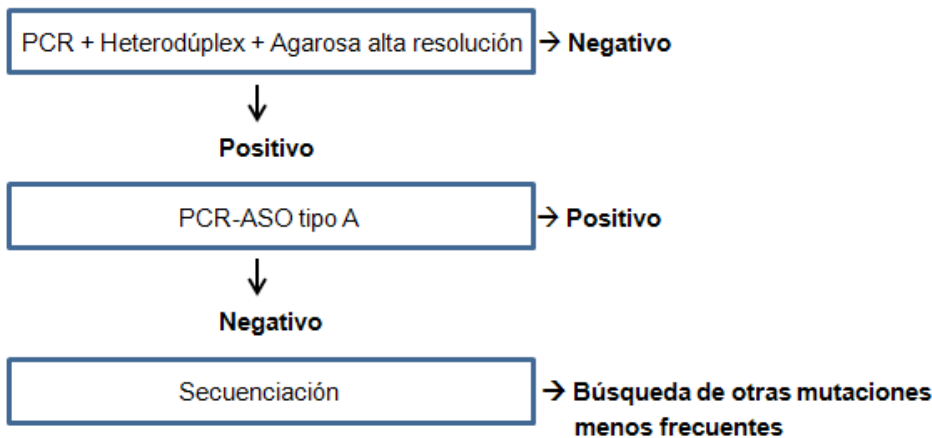
### Resultados

En las 29 muestras positivas analizadas se observó la banda de 208 pb (*wild type*) y otra banda superior correspondiente a la mutación. Las 60 muestras utilizadas como controles negativos solo presentaron la banda de 208 pares de bases (*wild type*), como se puede observar en la figura 2.

### Discusión

La corrida electroforética de los productos de PCR con heterodúplex en un gel de alta resolución y preparado al 3% permitió la detección y visualización de mutaciones en el gen de la NPM1, a diferencia de lo que ocurre cuando las corridas son realizadas en geles de agarosa común (no de alta resolución), de baja concentración y con tiempos de corrida más

**Figura 3.** Algoritmo diagnóstico y caracterización de las mutaciones más frecuentes en el gen de la NPM1.



cortos. Estas diferencias observadas se deben a que los productos de PCR obtenidos, correspondientes a los alelos *wild type* y a los alelos con variantes, presentan pequeñas diferencias de nucleótidos [4 pb] que no se pueden detectar con la corrida en gel de agarosa en las condiciones estándares, por la falta de sensibilidad.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que muchos laboratorios de baja complejidad solo requieren la caracterización de la mutación más frecuente [tipo A].

Por lo expuesto, proponemos la aplicación de estas técnicas como *screening* de las mutaciones del gen NPM1 y la incorporación de un algoritmo propuesto (Figura 3) para su confirmación y su posterior caracterización. El empleo de este algoritmo diagnóstico permitiría la caracterización de las mutaciones más frecuentes en el gen NPM1, mediante la realización de dos reacciones de PCR, sin la necesidad de realizar la secuenciación de los productos, lo que implica la utilización de equipamiento que no siempre está disponible en los laboratorios de biología molecular.

Como se mencionó anteriormente, la LMA es una enfermedad heterogénea con diversas anomalías genéticas y respuesta variable a la terapia, por lo cual, los análisis citogenéticos y moleculares se utilizan actualmente para estratificar el riesgo de LMA<sup>4</sup>.

Existen publicaciones que reportan que aproximadamente el 40% de los pacientes que presentan mutaciones en NPM1 tendrían además mutaciones en el gen FLT3, especialmente, duplicaciones internas en tándem<sup>8</sup>. Estos pacientes con ambas mutaciones, tendrían una menor supervivencia libre de enfermedad [SLE] y supervivencia global [SG]<sup>9</sup>.

Las LMA con NPM1 mutado y cariotipo normal, en ausencia de FLT3-ITD, tendrían un pronóstico favorable, mientras que, en caso de coexistencia con FLT3-ITD, predominaría un pronóstico más pobre<sup>10</sup>.

La detección del estado mutacional de la NPM1 permite no sólo clasificar las LMA adecuadamente sino también estratificar a los pacientes en grupos de riesgo para una mejor aplicación de tratamiento quimioterápico.

### Referencias bibliográficas

1. Sociedad Argentina de Hematología. Guía de diagnóstico y tratamiento de Leucemias agudas. 2017.
2. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, Liso A, Gorello P. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *The hematology journal*. 2007; 92:519-532.
3. Noguera NI, Garza de la Peña E, Lo-Coco F. El papel de la nucleofosmina (NPM1) en las neoplasias malignas mieloides. *Rev Hematol Mex*. 2012; 13[2]:65-73.
4. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017; 129[4]:424-47.
5. Martelli MP, Sportoletti P, Tiacci E, Martelli MF, Falini B. Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: Biological and clinical implications. *Blood Reviews*. 2013; 27:13–22.
6. 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; 352:254-66.
7. Swerdlow SH, Campo E, Harris Lee N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4<sup>th</sup> Edition IARC; 2017.
8. Falini B, Martelli MP, Bolli N, Sportoletti P, Liso A, Tiacci E. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity?. *Blood*. 2011;117[4]:1109-1120.
9. Brown P, McIntyre E, Rau R, Meshinchi S, Lacayo N, Dahl G. The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. *Blood*. 2007;110:979-985.
10. Verhaak RG, Goudswaard SC, Putten WV, Bijl MA, Sanders MA, Hagens 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. *The American Society of Hematology*, 2005.