

PREVALENCIA DE MUTACIÓN A DE NPM1 EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA. ASOCIACIÓN CON EL PERFIL INMUNOFENOTÍPICO Y MUTACIONES SOBRE FLT3.

Autores:

Esteban L. Remy¹; Cecilia M. Rodriguez²; Pamela Gaich³; Darío A. Sastre⁴.

¹Bioquímico. Servicio de Oncohematología. Clínica Privada Vélez Sarsfield. Córdoba.

²Bioquímica Especialista en Hematología. Jefe del laboratorio del Servicio de Oncohematología. Hospital Nacional de Clínicas. UNC. Córdoba.

³Bioquímica Especialista en Hematología. Becaria del laboratorio del Servicio de Oncohematología. Hospital Nacional de Clínicas. UNC. Córdoba.

⁴Bioquímico Especialista en Hematología. Jefe del Área de Biología Molecular. Servicio de Oncohematología. Hospital Nacional de Clínicas. UNC. Córdoba.

Laboratorio de Oncohematología, Hospital Nacional de Clínicas-
Facultad de Ciencias Médicas- Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
Santa Rosa 1564 - HNC- Córdoba. C.P. 5000

Correo electrónico: estebanremy@gmail.com

Tel: 0351-4881346

RESUMEN:

Dentro del grupo de Leucemias Mieloides Agudas (LMA) existen marcadores moleculares como NPM1 y Flt3 cuyas mutaciones han demostrado tener valor pronóstico como predictores de respuesta a la quimioterapia. En este trabajo estudiamos 49 pacientes con Neoplasias Hematológicas. Empleando una ASO RT-PCR para NPM1 y una RT PCR-Multiplex para Flt3 hallamos una prevalencia del 15% de la mutación A de NPM1 (NPM1 mutA) en LMA y una estrecha asociación entre ésta y las que afectan al gen de Flt3. Observamos también una estrecha relación entre NPM1 mutA y un perfil de diferenciación hacia linaje monocítico o mielomonocítico. Consideramos de gran importancia la detección de ambas mutaciones, para su clasificación y pronóstico, como así también determinar aquellos pacientes que podrían beneficiarse de terapias específicas contra estas mutaciones. Destacamos el empleo de la ASO RT-PCR, la cual demostró gran utilidad para la detección de NPM1 mutA en nuestro grupo de estudio.

ABSTRACT:

Within the Acute Myeloid Leukemia (AML) group there are molecular markers as NPM1 and Flt3, which mutations have been demonstrated to have prognostic value as predictors of response to chemotherapy. Herein, we studied 49 patients with Hematologic Neoplasms. Through ASO RT-PCR for NPM1 and Multiplex PCR for Flt3 we found a 15% prevalence of NPM1 mutation A (NPM1 mutA) in AML and a close association between it and those affecting the Flt3 gene. We also observed a close relationship between NPM1 mutA and a profile differentiation towards the monocytic or myelomonocytic lineage. We consider of great importance the detection of both mutations, for classification and

prognosis, as well as to identify those patients who may benefit from specific therapies against these mutations. We also highlight the use of ASO RT-PCR which proved to be very useful for the detection of NPM1 mutA within the studied group.

PALABRAS CLAVES:

Leucemia Mieloide Aguda, Nucleofosmina, ASO RT-PCR, mutación A de NPM1.

INTRODUCCION:

La Leucemia Mieloide Aguda (LMA) es una patología caracterizada por su gran heterogeneidad a nivel clínico, citogenético y molecular. Alrededor del 30% de los casos presentan alteraciones citogenéticas recurrentes que identifican a cada entidad con distintas características clínicas y diferente pronóstico. Entre el 40-50% presentan un cariotipo normal (1,2), sin embargo en el análisis molecular de este subgrupo se han identificado diversas mutaciones sobre genes que codifican para factores de transcripción como Acute Myeloid Leukemia 1 protein (AML1) y CCAAT/enhancer-binding protein α (CEBPA), receptores tirosina Quinasa como fms-like tyrosine kinase 3 (Flt3), y además otros que inducen proliferación como los genes RAS (3,4). Más recientemente, se han descrito diferentes mutaciones que afectan al gen de la Nucleofosmina (NPM1) (5), las cuales tienen un impacto pronóstico importante.

La NPM1 es una proteína de 37 KDa (6) con capacidad para translocarse entre núcleo y citoplasma. Se expresa ampliamente en la mayoría de los tejidos y cumple un papel importante en distintos procesos celulares: unión a ácidos nucleicos, transporte y ensamblado de partículas pre-ribosomales y proteínas, regulación de la duplicación de los centrosomas y modulación de genes supresores de tumores como p53 y ARF (7). El gen de NPM1 se localiza en el cromosoma 5 (5q35) (6), contiene 12 exones y puede ser blanco de mutaciones sobre el exón 12 que en la mayoría de los casos consisten en la inserción neta de 4 pares de bases (pb) (5,8-10). Estas alteraciones llevan a la pérdida de los residuos triptófano en posición 288 y/o 290 (en la región C-terminal), los cuales son esenciales para la localización nucleolar de la proteína. El tipo más común de mutación, es la mutación A

(NPM1 mutA) (5), encontrada en el 75%-80% de los casos y consiste en una duplicación del tetranucleotido TCTG en las posiciones 956-959 de la secuencia de referencia (GenBank accession number NM_002520). Las mutaciones sobre el exón 12 son detectadas en el 35% de las LMA en adultos, y en casi un 60% de las LMA con cariotipo normal (LMA-CN) (5). Tienen gran asociación con LMA primarias y baja frecuencia en Síndromes Mieloproliferativos crónicos (SMPc) y Síndromes Mielodisplásicos (SMD) (11,12).

Flt3 es un receptor de membrana perteneciente a los receptores Tirosina Quinasa clase III (13,14) y es expresado principalmente en células madres hematopoyéticas CD34(+) (15). Su activación involucra diferentes vías de señalización (MAPK, STAT, PI3K/AKT) que intervienen en la regulación de la diferenciación, proliferación, apoptosis y supervivencia celular (16). Las mutaciones en el gen de Flt3 presentan alta frecuencia en LMA y se han identificado dos tipos principales (17-19): duplicaciones Internas en *Tandem* (Flt3/ITD) en el dominio juxtamembrana (JM) del receptor y mutaciones puntuales en el sitio de activación del dominio TKD (Flt3/TKD) (19-23). Ambos tipos de mutaciones promueven la autofosforilación del receptor con la activación constitutiva del mismo y proliferación ligando independiente (16,22). La presencia de mutaciones FLT3/ITD es un factor de mal pronóstico en LMA, asociado a progresión clínica y a recaída; mientras que las mutaciones FLT3/TKD no tienen un impacto significativo en el pronóstico de las mismas (16,20,21).

Las mutaciones que afectan a ambos marcadores moleculares, tienen un importante valor pronóstico como predictores de respuesta a la quimioterapia. Se observa la mayor tasa de

remisión completa en los pacientes con mutación en NPM1 y negatividad para Flt3/ITD, una respuesta intermedia en el grupo que presentan ambas mutaciones y el pronóstico más adverso en aquellos con positividad únicamente para Flt3/ITD (8-10,24).

El objetivo del presente trabajo fue, principalmente, evaluar la prevalencia de NPM1 mutA en pacientes con neoplasias hematológicas estudiados en el Servicio de Oncohematología del Hospital Nacional de Clínicas, Córdoba, Argentina. También se analizó la relación entre el perfil inmunofenotípico y la NPM1 mutA, así como la asociación existente entre NPM1 mutA y las mutaciones sobre el gen de Flt3 en el grupo de pacientes estudiados.

MATERIALES Y METODOS:

Se analizó la presencia de NPM1 mutA en muestras de sangre periférica (SP) y/o médula ósea (MO) obtenidas con EDTA en el periodo incluido entre 2004-2011. Las muestras pertenecieron a 49 pacientes adultos, con edades comprendidas entre 18-90 años (mediana: 56 años): 39 con diagnóstico de LMA (20 mujeres y 19 hombres), 7 con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) (5 mujeres y 2 hombres), 2 con SMD (1 mujer y 1 hombre) y 1 paciente masculino con Leucemia Mieloide Crónica en crisis blástica (LMC en CB). El diagnóstico fue realizado según criterios morfológicos e inmunofenotípicos (OMS 2008).

En 32 de los 49 casos se analizó además, la presencia de mutaciones sobre el gen Flt3 (25 LMA, 4 LLA, 2 SMD y una LMC en CB).

Obtención de ADNc para el análisis de mutaciones en NPM1 y Flt3:

El ARN total celular fue extraído a partir de 5-10 x10⁶ leucocitos de SP y/o MO obtenidos por lisis de eritrocitos con solución de Cloruro de amonio utilizando el método de Chomczynsky y Sacchi (modificado) (25). La cantidad y calidad del ARN se evaluó mediante la lectura espectrofotométrica a 260/280 nm. La obtención del ADNc, se realizó por Transcripción Reversa (RT), incubando 20 µL del ARN total celular (5-15 µg) con 21 µL de Master Mix. La concentración final de los reactivos en la mezcla de reacción fue: 5 mM de buffer Tris (pH=8.3); 75 mM de KCl; 3 mM de MgCl₂; 1 mM de DTT; 120 µg/mL de random primers (Promega); 0.2 mM de dNTP (Promega); 1.4 x10⁴ U/mL de M-MLV transcriptasa reversa (Promega) y 1400 U/mL de ARNsin (Promega). La reacción de RT se llevó a cabo a

37°C durante 2 hs, seguida del calentamiento del ADNc a 65°C durante 10 min, luego los productos se conservaron hasta su procesamiento a -20°C. Un control negativo conteniendo todos los reactivos a excepción del ARN fue incorporado a las reacciones de RT (26,27).

Análisis de mutaciones en NPM1:

Se llevó a cabo una PCR alelo específica previa retrotranscripción (ASO RT-PCR) (28) para la amplificación de un segmento de 320 pb en el exón 12. La hibridización de los primers y la posterior visualización de los productos de amplificación se producen cuando la NPM1 mutA se encuentra presente (Figura 1).

Para tal fin 1 µl de ADNc fue amplificado en un volumen total de 25 µl y la concentración final de los reactivos en la mezcla de reacción fue: 5 mM de dNTPs (Promega), 1x Buffer de PCR (Invitrogen), 0.7 U de Taq Polimerasa (Invitrogen), 2.5 mM de MgCl₂ y 10 pmol de cada primer (NPM-A y NPM-REV-6). La reacción de PCR se realizó en un Termociclador MJ Research comenzando con un precalentamiento inicial de 7 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 67°C y 45 segundos a 72°C, con una extensión final de 7 minutos a 72°C. A los fines de evaluar la viabilidad e integridad de las muestras, se realizó una reacción de PCR utilizando el gen ABL como gen control de amplificación. Finalmente, la visualización de los productos de PCR se llevó a cabo por Electroforesis en gel de Agarosa al 2% p/v y posterior coloración con Bromuro de Etidio.

Análisis de mutaciones en Flt3:

Con el objetivo de analizar los dos tipos de mutaciones: ITD y TKD (D835) en forma simultánea, se aplicó la estrategia de PCR-Multiplex previa retrotranscripción (RT PCR-Multiplex). Para dicha reacción 2 μ L de ADNc fueron amplificados en un volumen total de 50 μ L, la concentración final de los reactivos en la mezcla de reacción fue: 200 μ M de cada dNTP (Promega), 1x Buffer de PCR (Invitrogen), 1.5 U de Taq Polimerasa (Invitrogen) y 30 pmol de cada primer (17F, 17R, R5, R6) (Sigma, Genesys). La reacción se efectuó comenzando con un precalentamiento inicial de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30s a 94°C, 45s a 56°C y 30s a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C. Posteriormente, 10 μ L de los productos amplificados por PCR fueron digeridos con la Enzima de Restricción EcoRV (Promega). La digestión enzimática se llevó a cabo a 37°C durante 2 hs, seguida de un calentamiento a 65°C durante 10 min y posteriormente conservándose a 4°C (29). Finalmente, se realizó una Electroforesis en gel de Agarosa al 3% y tinción con Bromuro de Etidio para la visualización al UV de los productos obtenidos. Dado que la mutación Flt3/TDK (D835) elimina el sitio de restricción para la enzima EcoRV, en aquellos pacientes en los que se encuentra presente la mutación, el sitio de restricción desaparece y la digestión enzimática no es posible, por lo cual la presencia de digestión enzimática denota la ausencia la mutación D835.

En todos los casos fueron incluidos controles positivos y negativos.

Análisis estadístico:

Se utilizó el test exacto de Fisher por medio del programa InStat (GraphPad Software), para evaluar la asociación entre las mutaciones de NPM1 y Flt3. Los resultados fueron considerados significativos con un nivel de $p < 0.05$.

RESULTADOS:

Mutación A en NPM1:

En el total de pacientes estudiados (n=49) se detectó la NPM1 mutA en 6 casos, todos correspondientes al grupo de LMA (6/39). Es decir que la prevalencia observada fue de 15% en el grupo con LMA (Figura 2), no observándose predominio según el sexo. Todos los casos NPM1 mutA exhibían una banda de 320 pb correspondiente al alelo mutado (Figura 3). No se detectó la mutación en ninguno de los caso de LLA, SMD o SMPc estudiados, y en todos los casos, el control de amplificación interno (gen ABL) fue positivo.

Se analizó el perfil fenotípico en 21 casos de LMA, observándose en 4/6 casos NPM1 mutA un compromiso hacia linaje mieloide y/o monocítico y expresión aberrante de CD56 (2/4) (Figura 4). Hallamos una gran heterogeneidad en la expresión de CD34. Dos casos (2/4) presentaban poblaciones de blastos CD34(-), 1/4 con una subpoblación de blastos negativa para éste marcador, y 1/4 casos contaba con blastos CD34(+).

Mutación en Flt3:

En 4 de 32 casos fue posible detectar mutaciones en el gen de Flt3. Todas ellas pertenecieron al grupo de LMA (4/25) (16%). Se observó que todos los casos con mutación en Flt3 exhibían una banda de 366 pb correspondiente al alelo *wild type (wt)* y una banda adicional de mayor peso molecular correspondiente a las duplicaciones internas en *tandem (Flt3/ITD)* (Figura 5). Ningún caso analizado presentó fragmentos de 146 pb correspondiente a la presencia de la mutación Flt3/TKD, observándose solo los

fragmentos de 46 y 68 pb pertenecientes a la digestión con enzima de restricción del alelo *wt.*

Asociación entre mutaciones de NPM1 y Flt3:

Dentro del grupo NPM1 mutA observamos una mayor prevalencia de Flt3/ITD (12%), mientras que en el grupo sin la mutación A, la prevalencia de Flt3/ITD fue solo del 4% ($p < 0.05$) (Figura 6).

DISCUSION:

Las mutaciones en el gen de NPM1, junto a las que afectan al gen de Flt3, representan las alteraciones genéticas con mayor prevalencia en pacientes con LMA y han demostrado poseer impacto sobre el pronóstico de los mismos. En el presente trabajo evaluamos la prevalencia de la NPM1 mutA, su asociación con el perfil fenotípico y con Flt3/ITD. Detectamos una prevalencia en LMA del 15% de NPM1 mutA, un valor algo menor al reportado en la bibliografía (35% en LMA de novo) (5,8-10). Consideramos que puede deberse a varios motivos: 1) solo estudiamos la mutación A, 2) pueden influir en el estudio diferencias geográficas de los pacientes estudiados, 3) incluimos algunos casos de LMA con alteraciones recurrentes, las cuales en su mayoría no presentan mutaciones en el gen NPM1 (5). A pesar de las diferencias encontradas, no detectamos la NPM1 mutA en los casos de LLA, SMD y SMPc estudiados, hallazgos que difieren levemente a los descritos por Caudill y col (11), u Oki y col (12), quienes encontraron apenas un 2% en pacientes con SMPc y un 4% en pacientes con SMD, respectivamente, de casos positivos para mutaciones en NPM1. Aún así creemos que para estudios de prevalencia y poblacionales es necesario llevar a cabo nuestro estudio en un número mayor de pacientes.

En el análisis del perfil inmunofenotípico, hallamos en general, y en concordancia con la bibliografía (5,30) una estrecha asociación entre NPM1 mutA y un perfil con diferenciación mielomonocítica o monocítica. Diversos trabajos reportan la presencia de mutaciones en NPM1 en células leucémicas CD34(-) (5), en el presente estudio encontramos una gran heterogeneidad en la expresión de este marcador en los casos NPM1 mutA analizados.

En aquellos pacientes en los que fueron estudiadas ambas mutaciones (25 casos de LMA) hallamos una mayor proporción de casos Flt3/ITD en el grupo NPM1 mutA, respecto al grupo sin la mutación A (12% vs 4%), resultados que concuerdan con los reportados por varios autores. Falini y col (5) encontraron aproximadamente un 20% de casos Flt3/ITD en pacientes con mutaciones en NPM1, en contraposición al 10% observado en el grupo sin mutaciones en NPM1. Por otra parte Schnittger y col (8), y Döhner y col (9) llegaron a valores que rondan un 40% para el primer grupo, a diferencia de un 26% para el segundo. Dichos hallazgos podrían indicar una posible interacción entre ambas mutaciones en la patogenia de LMA (9).

Por un lado, consideramos, que es importante la detección de la NPM1 mutA conjuntamente con aquellas que afectan al gen de Flt3, tanto en la clasificación, como así también para pronóstico. Por otra parte, se encuentran en desarrollo terapias que utilizarían a estos marcadores como “blancos moleculares”, (por ejemplo inhibidores de Flt3) (17,31,32), por lo que la detección de dichas mutaciones al momento del diagnóstico permitiría clasificar a aquellos pacientes que podrían beneficiarse con este tipo de terapias. Por esta razón y por lo expuesto anteriormente es necesario contar con técnicas rápidas y aplicables para su correcta clasificación. En nuestra experiencia, la ASO RT-PCR desarrollada por Ottone y col (28), demostró ser efectiva y aplicable en la detección de NPM1 mutA en nuestro medio.

REFERENCIAS:

1. Byrd JC, Mroźek K, Dodge RK, y col. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002; 100: 4325-4336.
2. Grimwade D, Walker H, Oliver F, y col. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood*. 1998; 92: 2322-2333.
3. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, y col. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal Acute Myeloid Leukemia. *NEJM*. 2008; 358: 1909-1918.
4. Kumar CC. Genetic abnormalities and challenges in the treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Genes Cancer*. 2011; 2: 95-107.
5. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, y col. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005; 352: 254–266.
6. Chang JH, Olson MO. Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. *J Biol Chem*. 1990; 265: 18227-18233.
7. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc⁺ AML): biologic and clinical features. *Blood*. 2007; 109: 874-885.
8. Schnittger S, Schoch C, Kern W, y col. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005; 106: 3733-3739.

9. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, y col. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005; 106: 3740-3746.
10. Thiede C, Koch S, Creutzig E, y col. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006; 107: 4011-4020.
11. Caudill JS, Sternberg AJ, Li CY, y col. C-terminal nucleophosmin mutations are uncommon in chronic myeloid disorders. *Br J Haematol*. 2006; 133: 638-641.
12. Oki Y, Jelinek J, Beran M, y col. Mutations and promoter methylation status of NPM1 in myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2006; 91: 1147-1148.
13. Rosnet O, Birnbaum D. Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. *Crit Rev Oncog*. 1993; 4: 595-613.
14. Agnès F, Shamoon B, Dina C y col. Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene*. 1994; 145: 283-288.
15. Parcels BW, Ikeda AK, Simms-Waldrip T, Moore TB, Sakamoto KM. FMS-like Tyrosine Kinase 3 in Normal Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia. *Stem Cells*. 2006; 24: 1174-1184.
16. Meshinchi S, Appelbaum F. Structural and functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 4263-4269.
17. Small D. Targeting FLT3 for treatment of leukemia. *Semin hematolog*. 2008; 45: 17-21.

18. Gregory TK, Wald D, Chen Y, y col. Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetic. *J Hematol Oncol.* 2009; 2: 23-32.
19. Guilliland D, Griffin J. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood.* 2002; 100: 1532-1542.
20. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. FLT3 mutations and leukaemia. *Brit J Hematol.* 2003; 122: 523-538.
21. Nakao M, Yokota S, Iwai T, y col. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1996; 10: 1911-1918.
22. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, y col. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood.* 2001; 97: 2434-2439.
23. Abu-Duhier F, Goodeve A, Wilson G, y col. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Brit J Hematol.* 2001; 113: 983–988.
24. Licinio MA, Santos Da Silva MC. Importância da detecção das mutações no gene FLT3 e no gene NPM1 na leucemia mieloide aguda – Classificação da Organização Mundial de Saúde 2008. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010; 32(6): 476-481.
25. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162: 156-159.
26. Cross N, Melo J, Feng L, Goldman J. An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of BCR-ABL fusion mRNA in hematological disorders. *Leukemia.* 1994; 8: 186-189.

27. Cross N. Detection of BCR-ABL in Hematological malignancies by RT-PCR. En: Coterr FE (ed). Molecular Diagnosis of Cancer. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 1996. P. 25-35.
28. Ottone T, Ammatuna E, Lavorgna S, y col. An Allele-Specific RT-PCR Assay to Detect Type A Mutation of the Nucleophosmin-1 Gene in Acute Myeloid Leukemia. J Mol Diag. 2008; 10: 212-216.
29. Noguera N, Breccia M, Divona M y col. Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol. Leukemia. 2002; 16: 2185-2189.
30. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, y col (ed). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008.
31. Wadleigh M, DeAngelo DJ, Griffin JD, Stone RM. After Chronic Myelogenous Leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies. Blood. 2005; 105: 22-30.
32. Galanis A, Ma H, Rajkhowa T, y col. Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants. Blood. 2014; 123: 94-100.

FIGURAS:

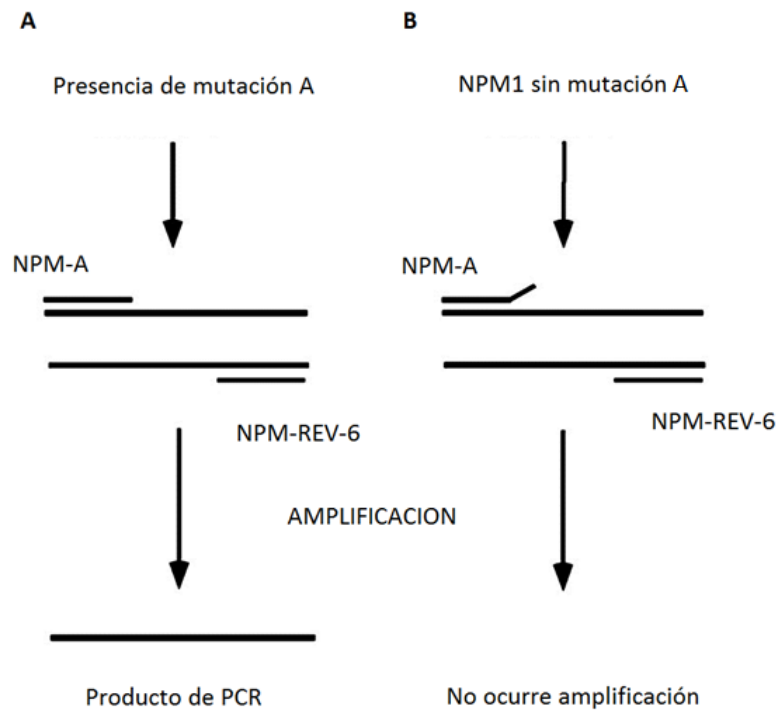


Figura 1: Representación esquemática de la técnica ASO RT-PCR. A) La presencia de la mutación A permite la hibridación de los primers favoreciendo la formación del producto de PCR. B) La ausencia de la mutación A impide la hibridación del primer forward y no ocurre amplificación.

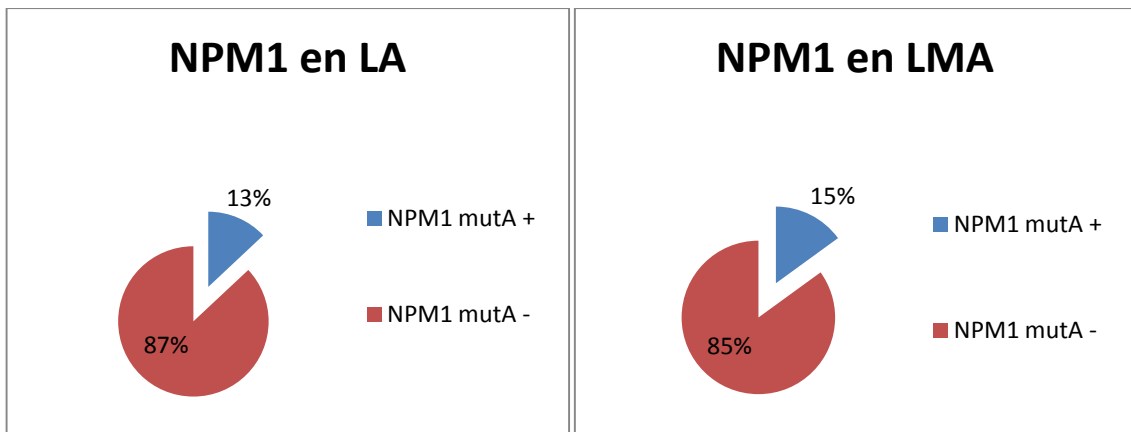


Figura 2: Prevalencia de mutación A en NPM1 en los casos de LA y LMA estudiadas. En el grupo de LA, 6/46 casos fueron positivos para la mutación A (13%). Considerando los casos de LMA estudiados, 6/39 fueron positivos para la mutación (15%).

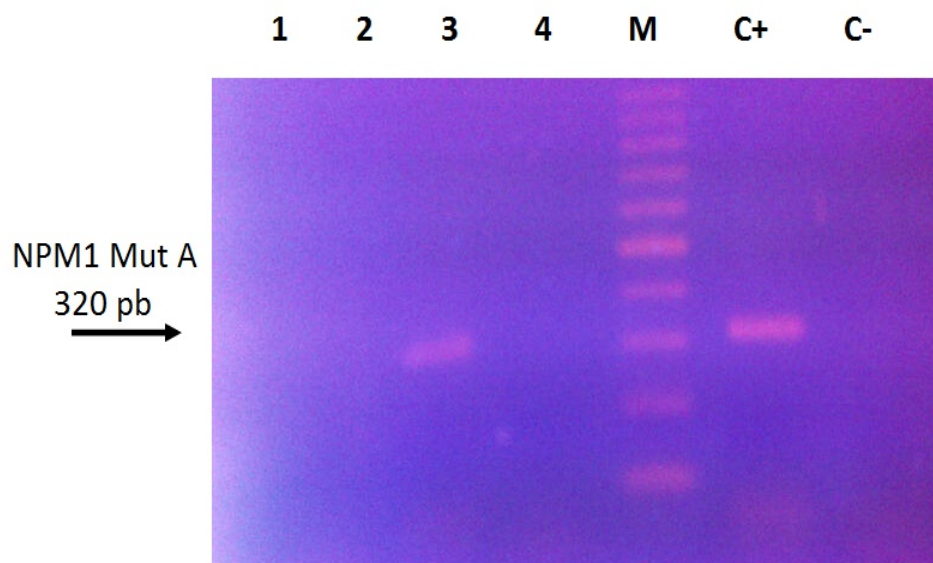


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos a partir de la ASO RT-PCR. M: Marcador de Peso Molecular. Línea 3: Paciente positivo para la mutación A. Líneas 1, 2 y 4: Pacientes negativos para la mutación. C+: Control positivo. C-: Control negativo.

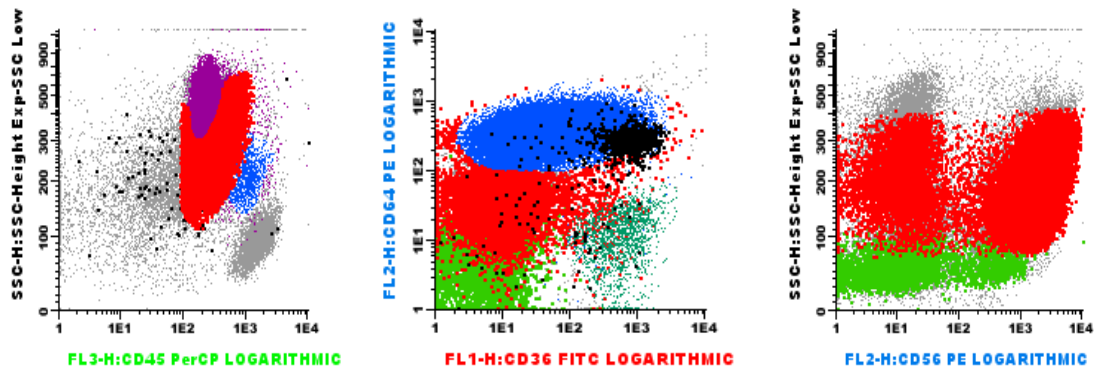


Figura 4: Perfil inmunofenotípico hallado en un paciente con LMA y mutación A en **NPM1**. El perfil inmunofenotípico muestra compromiso de las líneas mieloides y monocíticas. La población correspondiente a la línea mioide presenta un patrón de expresión aberrante y bimodal del marcador CD56.

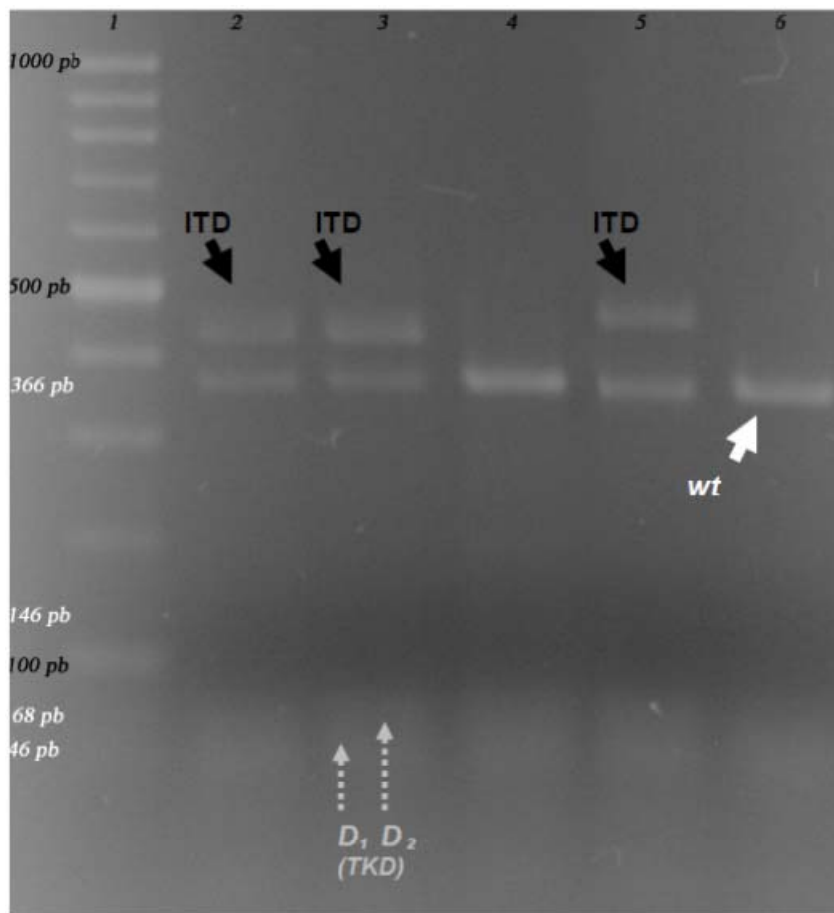


Figura 5: Electroforesis en gel de Agarosa de productos obtenidos a partir de RT-PCR Multipléx. Flecha blanca: bandas correspondientes al alelo *wt*. Flechas negras: bandas correspondientes a ITD. Las bandas a 46 y 68pb. Flechas grises: bandas correspondientes a los productos digeridos. Línea 1: marcador de PM. Línea 2: control positivo de ITD. Líneas 3 y 5: pacientes *Flt3/ITD+*. Línea 4: paciente *FLT3/ITD-*. Línea 6: control negativo de ITD.

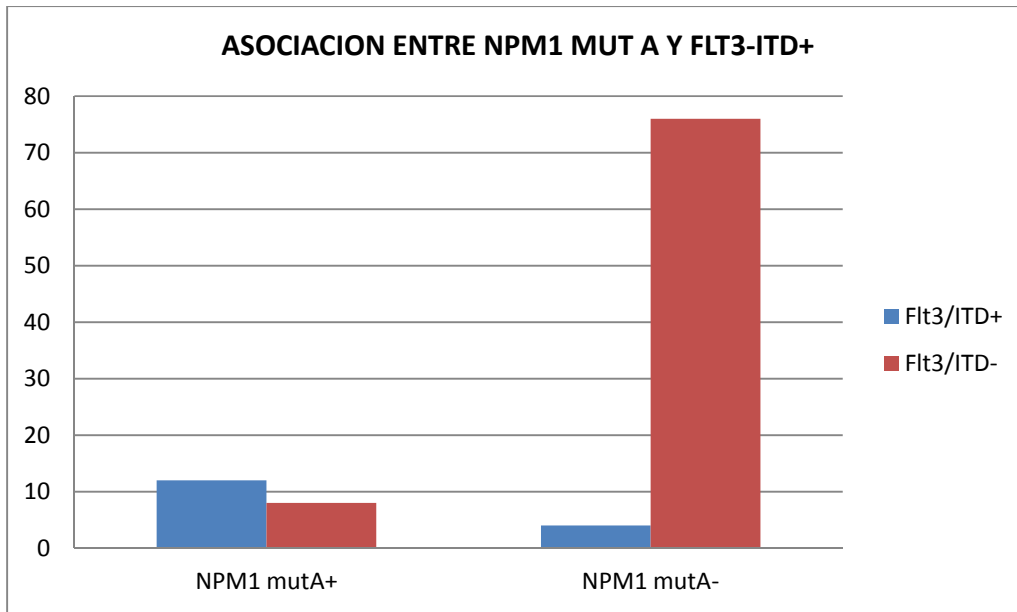


Figura 6: Asociación entre NPM1 mutA y Flt3/ITD en LMA. En el grupo de pacientes con NPM1 mutA se observa una mayor proporción de pacientes Flt3/ITD+ (12% del total) en comparación con el grupo sin la mutación A (4% del total fueron Flt3/ITD+), $p=0.016$.