

Artículo de revisión

El papel de la nucleofosmina (NPM1) en las neoplasias malignas mieloides

Nélida Inés Noguera,^{*,***,***} Eduardo Garza de la Peña,^{*,**} Francesco Lo-Coco^{*,**}

RESUMEN

La nucleofosmina (NPM1) pertenece a la familia de chaperonas de las nucleoplasminas; es una fosfoproteína de expresión ubicua de localización fundamentalmente nucleolar, que se desplaza constantemente del núcleo al citoplasma. Se ha descrito un gran número de proteínas que interaccionan con la nucleofosmina, que juega un papel relevante en diversas funciones celulares, incluidas la duplicación centrosómica, la biogénesis de los ribosomas, la respuesta al daño celular y la reparación del ADN. En pacientes con linfoma maligno no Hodgkin tipo anaplásico y en leucemia mieloide aguda se han reportado alteraciones en el gen NPM1. Las leucemias mieloides agudas con nucleofosmina mutada (también conocida como NPMc+) constituyen una entidad clínico-patológica y molecular diferente lo que ha llevado a crear un ingreso provisional para esta entidad en la clasificación de neoplasias linfo-hematopoyéticas de la OMS 2008. En esta revisión se discute el papel de la nucleofosmina en las neoplasias malignas mieloides centrándonos en: 1) su participación en la patogénesis de las leucemias mieloides agudas; 2) el diagnóstico; 3) su significado pronóstico; 4) la importancia del seguimiento de la enfermedad mínima residual y 5) la potencialidad de usar la NPMc+ como diana terapéutica.

Palabras clave: nucleofosmina, NPM1, nucleoplasminas, neoplasias malignas mieloides.

ABSTRACT

Nucleophosmin (NPM1) is a ubiquitously expressed phosphoprotein that belongs to the nucleoplasmin family of chaperones. NPM1 is mainly localized in the nucleolus, and continuously shuttles between the nucleus and the cytoplasm. A high number of proteins have been described to interact with NPM1. NPM1 play a relevant role in diverse cellular functions, including, centrosome duplication, ribosome biogenesis, response to stress and ADN repair. Alterations of the NPM1 gene have been reported in anaplastic non Hodgkin's lymphoma and acute myeloid leukemia (AML).

AML carrying nucleophosmin mutations (also referred to as NPMc+) displays distinct molecular and clinical-pathological features that led to its inclusion as a provisional entity in the 2008 WHO classification of myeloid neoplasms. Here, we discuss the role of NPM1 in myeloid malignancies focusing on i) involvement in AML pathogenesis; ii) diagnosis; iii) prognostic significance; iv) minimal residual disease monitoring and v) its potential as a target for tailored therapy.

Key words: Nucleophosmin, NPM1, myeloid malignancies.

* Laboratorio de Neuro-Oncohematología, Fundación Santa Lucía, Roma, Italia.

** Departamento de Biopatología, Universidad Tor Vergata, Roma, Italia.

*** Departamento de Hematología y Bioquímica Clínica, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Correspondencia: Dra. Nélida I. Noguera. Laboratorio de Neuro-Oncohematología, Fundación Santa Lucía. Vía del Fosso di Fiorano 65, Roma 00143, Italia. Correo electrónico: nelnoguer@yahoo.com.ar Recibido: marzo 2012. Aceptado: abril 2012.

Este artículo debe citarse como: 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.

La nucleofosmina (NPM1), también conocida como B23, numatrín o NO38 es una fosfoproteína fundamentalmente nucleolar, que trasloca del núcleo al citoplasma. Distintos estudios revelan un complejo escenario para las funciones e interacciones de la nucleofosmina, que cumple un papel proliferativo y supresor del crecimiento.¹ La nucleofosmina forma parte de la familia de chaperonas conocidas como nucleoplasminas y cumple una gran cantidad de funciones celulares como: 1) biogénesis y transporte de ribosomas, 2) duplicación centrosómica, 3) respuesta al daño celular y reparación del ADN.¹⁻⁵

La nucleofosmina está implicada en procesos de tumorigénesis y se ha encontrado sobreexpresada en tumores sólidos de diverso origen histológico (colon, hígado, ovario y próstata).^{6,7,8} En tumores hematopoyéticos frecuentemente ocurren alteraciones genéticas que involucran el gen de la NPM1 que forman parte de las traslocaciones cromosómicas que suceden en alteraciones linfoides y mieloides, asociadas con diversas proteínas de fusión. Así la t(2;5) característica del linfoma anaplásico de células grandes, involucra los genes NPM1 y ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase).⁹ La t(5;17), descrita en cuatro casos de leucemia aguda promielocítica (LAP), fusiona el gen NPM1 con el gen RAR α (Retinoic Acid Receptor α). Es posible que parte del potencial transformante de NPM-RAR α derive del efecto dominante negativo sobre NPM1, porque si bien todos los casos de LAP con NPM-RAR α tienen un alelo NPM1 normal, la NPM1 es parcialmente deslocalizada al nucleoplasma debido a su interacción con NPM-RAR α .¹⁰ Las LAP con t(5;17) presentan el fenotipo clásico de las LAP con t(15;17) y responden al tratamiento con ácido todo-trans retinoico (ATRA).¹¹

En las leucemias mieloides agudas con t(3;5) los genes involucrados son NPM1 y MLF1 (Myeloid Leukemia Factor1), también aquí la proteína NPM1 salvaje viene deslocalizada por la proteína de fusión NPM-MLF1. En todas las proteínas de fusión, la región NH2 terminal de la nucleofosmina está conservada, aparentemente esta fracción no contribuye al potencial transformante de la proteína de fusión pero provee un dominio de dimerización fundamental para la oligomerización y la acción oncogénica de los diversos compañeros de la NPM1. Es interesante que una significativa proporción de LMA que presentan la t(3;5) con puntos de ruptura localizados fuera de NPM1 y MLF1 tengan, además, pérdida de una copia del gen NPM1 lo que indica que la haploinsuficiencia de NPM1 puede ser relevante para la leucemogénesis.¹²

En el año 2005 se describió una variante mutada de la proteína NPM1 que produce su deslocalización al citoplasma (NPMc+), esta mutación fue reportada en 35% de LMAs de todos los subtipos morfológicos, excepto M3, M4Eo y M7.¹³⁻¹⁶ La NPMc+ se asocia con cariotipo normal (85%) y es mutuamente exclusiva con otras anomalías genéticas mayores asociadas con LMA, lo que sugiere que esta alteración representa un evento iniciador en el proceso de leucemogénesis.¹⁷

Estructura de la nucleofosmina

El gen de *NPM1* humano mapea en el cromosoma 5 en el locus 5q35 y está compuesto por 12 exones. Existen dos isoformas de la proteína que corresponden a *splicing* alternativos, la variante NPM1 (294 aminoácidos) se localiza a altos niveles en el nucléolo; la variante NPM1.2 (259 aminoácidos) carece de la región carboxi-terminal y en el nucleoplasma y en el citoplasma sus concentraciones son bajas.

La proteína NPM1 tiene diversos dominios estructurales, cada uno de ellos asociados con funciones específicas. La región N-terminal participa en la oligomerización y es necesaria para la función de chaperona de las proteínas. En la región central tiene dos dominios acídicos necesarios para su actividad como chaperona de histonas, con ella interviene en la modulación y ensamblaje de la cromatina. La región C-terminal de la nucleofosmina contiene un dominio básico con capacidad de unirse al ADN y al ARN. La NPM1 contiene, además, un motivo NES (señal de exportación nuclear) hidrofóbico rico en Leu (LxxPxxLxLx, 94-102) y dos motivos, NLS (señal de localización nuclear, 141-157) y NoLS (señal de localización nucleolar, W 288-290).^{18,19}

La nucleofosmina sufre, además, numerosas modificaciones postranscripcionales que modulan su actividad, con numerosos sitios de fosforilación que son decisivos para su actividad en el control de la duplicación centrosómica y para la unión al ARN. Otras modificaciones que regulan la función de la NPM1 son la ubiquitinación, que induce la degradación de la misma mediante el proteasoma y la sumoilación que aumenta la estabilidad de la proteína, la acetilación y su afinidad por las histonas.^{20,21,22}

La NPMc+ en la patogénesis de la leucemia mieloide aguda

Aún queda por establecerse de qué forma la NPMc+ promueve la leucemogénesis; sin embargo, sin duda la deslocalización citoplasmática de la proteína mutada es un evento crítico en la patogénesis de la enfermedad. El incremento de exportación de la NPM1 al citoplasma perturba diversas vías celulares provocando pérdida o ganancia de funciones (por ejemplo, las proteínas que interaccionan con NPM1 en el nucléolo se deslocalizan por la mutante al citoplasma en la célula leucémica). Además, existe la posibilidad de que la NPMc+ pueda interaccionar con nuevas proteínas en el citoplasma.

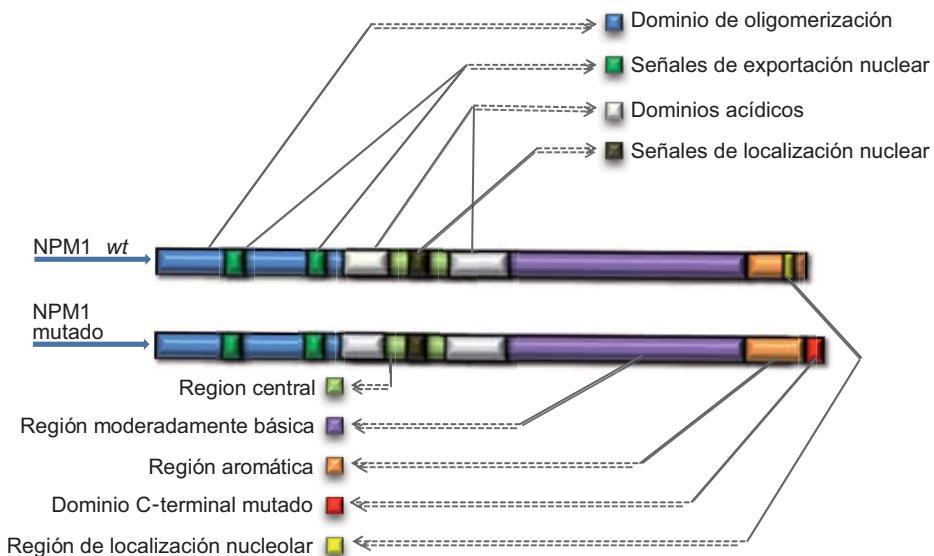


Figura 1. Dibujo descriptivo de la isoforma 1 de NPM1 que muestra ambas variantes; *wt* y mutado, se señalan los sitios y regiones críticos para su función

$p^{14}\text{Arf}$ es una proteína nucleolar capaz de arrestar el ciclo celular, fundamentalmente a través de la inhibición y degradación de p53 mediada por Hdm2, también es capaz de inhibir el ciclo celular de manera independiente de p53 (23, 24). La NPMc+ deslocaliza a $p^{14}\text{Arf}$ en el citoplasma, afectando su estabilidad y función.^{23,24}

c-Myc es una proteína oncogénica con una participación importante en la progresión del ciclo celular, apoptosis y transformación celular. Fbw7 es la E3 ubiquitin ligasa involucrada en su degradación. NPMc+ interacciona de forma directa con Fbw7 deslocalizándola al citoplasma y favoreciendo su degradación, como consecuencia las concentraciones de c-Myc aumentan.²⁵ En modelos de ratón se ha demostrado que las concentraciones elevadas de c-Myc favorecen la leucemogénesis.²⁶ NPMc+ también coopera con E1A, que ejerce su actividad transformante a través de la inactivación del oncosupresor pRB, lo que sugiere que NPMc+ puede actuar activando de manera indirecta la vía del Rb.²⁷

Miz1 es un factor de transcripción que activa la expresión de dos importantes inhibidores del ciclo celular, p15Ink4b y p21. NPMc+ deslocaliza a Miz1 en el citoplasma, favoreciendo la progresión descontrolada del ciclo celular.²⁸

La función de la NPM1 está profundamente afectada por su reducción en el nucléolo. La reducción de NPM1

en éste se debe no sólo a la heterocigosis sino también a su deslocalización en el citoplasma a través de la formación de heterodímeros con NPMc+.²⁹ En ratones knock-out para NPM1, la inactivación de NPM1 conduce a inestabilidad genómica, lo que promueve susceptibilidad *in vivo* e *in vitro* al cáncer. Los ratones NPM1± forman tumores espontáneos, sobre todo de estirpe mieloide.³⁰

Sin embargo, hasta ahora no ha podido demostrarse que la NPM1 mutada por si sola sea capaz de iniciar una LMA. Es probable que para ejercer su efecto oncogénico NPMc+ necesite condiciones diferentes a las que se han estudiado hasta el momento, así como un precursor mieloide específico, o alcanzar una relación de expresión mutante-salvaje determinada para producir la deslocalización al citoplasma de ambas formas, o acompañarse de un evento secundario. Sin duda, será necesario realizar diversos estudios que permitan esclarecer esta situación.

Diagnóstico de NPMc+ en leucemia mieloide aguda

Se han identificado alrededor de 50 variantes moleculares de NPMc+.³¹ Casi siempre se localizan en el exón 12, pero también se las encuentra en el exón 11.³² Las mutaciones de NPM1 se detectan en alrededor de 25 a 35% de todas las LMA,^{9,13} pero sólo en 6.5 a 8.4 % de pacientes pediátricos

con LMA.^{33,34} La mutación NPM1 tipo A, que consiste en una inserción de cuatro pares de bases TCTG, es la más frecuente en adultos (75 a 80% de los casos) mientras en los niños predominan otras variantes.³⁵

Desde que se identificó la mutación de la nucleofosmina, se desarrolló una gran cantidad de métodos para su estudio (Cuadro 1). En la actualidad se han realizado ensayos moleculares altamente sensibles y específicos. Uno de los más utilizados es el análisis de fragmentos que tiene la ventaja de analizar de manera simultánea alteraciones en los genes *fms-related tyrosine kinase 3 (FLT3)* o *CCAAT/enhancer binding protein α (CEBPA)*.^{36,37} Estos métodos no discriminan la mutación A de las demás variantes y las muestras positivas deben someterse a análisis de secuenciación para su caracterización detallada. Existe otro ensayo que se basa en el uso de la curva de temperatura de *melting*, este método incluye el uso de sondas específicas lo que permite discriminar entre las variantes A, B y D.³⁸

Para el estudio de la enfermedad mínima residual se han desarrollado métodos más sensibles; el más utilizado es con PCR cuantitativa o PCR en tiempo real.^{39,40} En centros que no cuentan con el instrumental apropiado existe la posibilidad de trabajar con PCR en *heminested* y realizar la corrida electroforética en gel de agar. Este método es específico para la mutación A⁴¹ o realizar la corrida en gel

de poliacrilamida que permite individualizar cualquiera de las variantes del exón 12.⁴²

Significado clínico de NPMc+ en la leucemia mieloide aguda

En estudios recientes de clasificación pronóstica en LMA de cariotipo normal se ha evidenciado que aproximadamente en 45% de los casos es posible identificar una o varias mutaciones, permitiéndose con esto la estratificación en grupos moleculares de pronóstico favorable o adverso.⁴³

Mediante análisis genómico con el auxilio de técnicas moleculares se ha encontrado una gran cantidad de mutaciones nuevas en pacientes diagnosticados con LMA y cariotipo normal, mutaciones que pueden o no coexistir con NPM1 mutado, tales como; *FLT3 internal tandem duplications (ITD)* o *mutations of the tyrosine kinase domain (TKD)*, *partial tandem duplications (PTD)* del gen *mixed myeloid-lymphoid or mixed lineage leukemia (MLL)*, así como las mutaciones del gen homólogo del oncogen viral de neuroblastoma (*NRAS*), *CEBPA*, mutación 1 del gen del tumor de Wilms (*WT1*), gen *brain and acute leukemia cytoplasmic (BAALC)*, gen *ETS-related (ERG)*, el oncogen *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (c-KIT)*, *isocitrate*

Cuadro 1. Métodos para el diagnóstico de las mutaciones del gen *NPM1*

	Sensibilidad	Ventaja	Desventaja	Aplicación
Secuenciación	0.2	Identifica con precisión el tipo de mutación	Baja sensibilidad, costoso	Tamizaje diagnóstico
*DHPLC	10 ⁻²	Detecta todas las mutaciones	Requiere instrumental costoso	Tamizaje diagnóstico
**ASO-RT-PCR	10 ⁻²	Económico, instrumental de baja complejidad	Detecta sólo la mutación A	Tamizaje diagnóstico y EMR (mutación específica)
Semi-nested-ASO-PCR	10 ⁻⁴	Económico	Detecta sólo la mutación A	Tamizaje diagnóstico
***HRM	10 ⁻⁴ - 10 ⁻⁵	Detecta todas las mutaciones y permite saber el número de copias	Requiere instrumental costoso	Tamizaje diagnóstico
RT-PCR y electroforesis en poliacrilamida	10 ⁻⁴	Económico, instrumental de baja complejidad	Es necesario trabajar con poliacrilamida	Tamizaje diagnóstico y EMR
Electroforesis capilar	10 ⁻² - 10 ⁻³	Detecta todas las mutaciones	Requiere instrumental costoso	Tamizaje diagnóstico
PCR cuantitativa	10 ⁻⁴ - 10 ⁻⁶	Identifica todas las mutaciones y permite saber el número de copias	Requiere instrumental costoso	Tamizaje diagnóstico y EMR (mutación específica)

*DHPLC (*denaturing high-performance liquid chromatography*);

**ASO (*allele-specific oligonucleotide*), RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

***HRM: (*High-resolution melting curve analysis*).

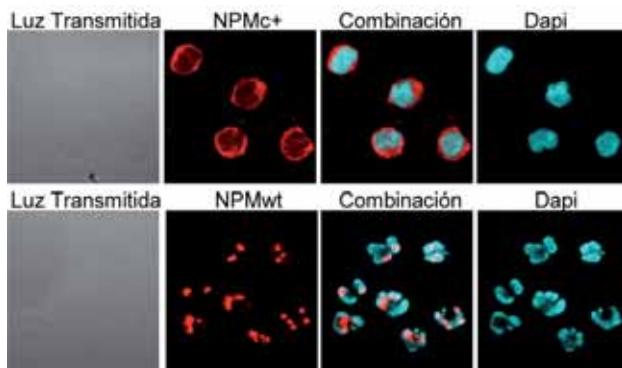


Figura 2. Localización citoplasmática de NPMc+ en un paciente con LMA; y localización nucleolar de NPM1 salvaje (NPMwt) en la línea celular OCI-AML2

dehydrogenase 1 y 2 (*IDH1* e *IDH2*), DNA(cytosine-5)-methyltransferase 3 beta (DNMT3) entre otros. Como se mencionó, es posible identificar distintos subgrupos de sujetos con una o varias de estas alteraciones que cuentan con diversos significados pronósticos e implicaciones terapéuticas. De las mutaciones más frecuentes, las descritas en el exón 12 del gen NPM1 se presentan en 25% de los casos de LMA *de novo* y en 50% de los casos de LMA con cariotipo normal.⁹ En relación con el pronóstico, en la bibliografía se reporta que tienen un impacto favorable en adultos y niños.³³ En cuanto al tratamiento, se estima que 70% de los sujetos con LMA de cariotipo normal, mutaciones en NPM1 positiva, FLT3-ITD negativa (FLT3 de tipo salvaje) y concentraciones bajas del gen ERG, logran hasta dos años de supervivencia libre de progresión de la enfermedad después del tratamiento de inducción con citarabina, daunorrubicina y etopósido, seguido de citarabina en altas dosis o trasplante hematopoyético autólogo posterior a la quimioterapia de intensificación.⁴⁴ En otro estudio, 60% de los pacientes con características similares lograron cuatro años de supervivencia general.⁴⁵

Con base en la clasificación de la OMS 2008, la evidencia actual en referencia a las nuevas clasificaciones citogenéticas y moleculares para LMA con implicaciones clínicas, de estratificación del riesgo, pronósticas y terapéuticas se ha hecho hincapié en la identificación de las mutaciones del gen NPM1 en presencia o ausencia de mutaciones del gen FLT3, tanto que se ha propuesto un ingreso provisional para este grupo particular en la clasificación de neoplasias linfo-hematopoyéticas.

En la actualidad, el mecanismo de quimiosensibilidad para las LMAs con mutaciones en NPM1 no ha sido esclarecido totalmente; sin embargo, se sabe que la coexistencia de mutaciones en FLT3-ITD repercute en el significado pronóstico haciéndolo menos favorable, como se demostró en los estudios clínicos prospectivos del Medical Research Council (MRC, Reino Unido) donde en una cohorte de 215 adultos jóvenes diagnosticados con LMA de cariotipo normal con mutaciones de FLT3-ITD y NPM1 de tipo salvaje (NPM1-salvaje) tuvo un mal pronóstico (13% vivos a 10 años), mientras que la cohorte de pacientes con mutaciones en NPM1 y FLT3-salvaje registró una tasa de supervivencia muy superior (50% vivos a 10 años).^{9,46-49} De igual forma, los pacientes mayores con mutaciones en NPM1 tienen mejor pronóstico.⁵⁰ Los pacientes con mutaciones en NPM1 y FLT3-ITD tienen la peor respuesta a la terapia de inducción (63% en comparación con 86% de quienes tienen NPM1 mutado y FLT3-ITD negativo); sin embargo, la supervivencia general de este grupo a cinco años es menor de 30% a diferencia del grupo con mutación de NPM1 y FLT3-ITD negativo cuyo porcentaje es de aproximadamente 60%.⁵¹ Con intención de definir el mecanismo por el que las mutaciones en NPM1 y FLT3 afectan el pronóstico de los pacientes con LMA se han formulado hipótesis centradas en la interacción de estas proteínas con p53, donde se ha visto que ante mutaciones en NPM1 existe un predominio en la expresión de las isoformas β y γ de p53 asociadas con mejor respuesta a las antraciclinas y citarabina en comparación con las mutaciones FLT3-ITD donde predomina la expresión de la isoforma p53 de tamaño completo, que promueve la resistencia al tratamiento.⁵²

En estudios más recientes sobre el binomio NPM1-FLT3 en pacientes con LMA de *de novo*, con cariotipo normal, se ha observado que el porcentaje de blastos en médula ósea al momento del diagnóstico está ligado al estado mutacional de ambos genes, en donde los pacientes con un alto porcentaje de blastos presentan mutaciones en NPM1 y FLT3-ITD comparado con quienes tienen menor porcentaje de blastos donde ambos genes son normales.⁴⁹ Más aún, en estudios donde se ha cuantificado la expresión del ARNm de FLT3-ITD en pacientes con LMA de cariotipo normal se ha observado que mientras más alto es el nivel de expresión de FLT3-ITD peor es el pronóstico comparado con los casos donde la expresión es baja.

Si se toma en cuenta que aproximadamente 80% de las mutaciones del exón 12 de NPM1 son del tipo A, resulta poco claro el significado pronóstico del 20% restante en presencia y ausencia de FLT3 mutado. Con respecto a las mutaciones no A de NPM1, dado al bajo número de casos estudiados, es difícil precisar si existen diferencias en el pronóstico comparándolas con las mutaciones tipo A.

Las características distintivas de LAM con *NPM1* mutado se describen en el Cuadro 2.

NPMc+ como diana en el tratamiento en la leucemia mieloide aguda

En diversas publicaciones se ha descrito que los pacientes con LMA y cariotipo normal, con mutaciones en NPM1, tienen mejor respuesta al tratamiento convencional con agentes quimioterapéuticos. El enfoque de un tratamiento dirigido hacia NPM1 en estos pacientes se estudia actualmente explorando distintas estrategias: interferencia con el transporte del mutante leucémico de NPM1, inhibición de la capacidad funcional residual de NPM1 salvaje y otros componentes nucleolares y la intervención en la enfermedad mínima residual (copias de los transcriptos de NPM1 mutante) antes de que ocurra la recaída hematológica (terapia de pre-vaciamiento).⁴⁸ Desde el punto de vista molecular, las células leucémicas con mutación de NPM1 presentan la proteína NPMc+ deslocalizada de su origen nucleolar. Con base en este hecho se ha reportado que algunos agentes quimioterapéuticos, como la actinomicina D, daunorrubicina, 5-fluoroacilo y camptotecina alteran la estructura nucleolar deslocalizando a la nucleofosmina; éste es un evento que precede a la apoptosis. En el caso de la daunorrubicina se ha demostrado en estudios que la

translocación de la nucleofosmina del núcleo al nucleoplasma es proporcional al incremento en la dosis.³⁹

Otros agentes anticáncer, como el CIG-300, se han desarrollado con la finalidad de interferir en el ensamblaje nucleolar de NPM1 al inhibir su fosforilación consiguiendo la inducción de apoptosis.⁵³ En vista de que se ha reportado una expresión aumentada de CD33 en el inmunofenotipo de los pacientes portadores de LMA con mutaciones de NPM1, se han estudiado anticuerpos monoclonales anti-CD33 como el gemtuzumab ozogamicina con el que se consiguen resultados prometedores.⁵⁴

NPM1 y mielodisplasia

El rol de la nucleofosmina se ha estudiado en modelos murinos “knock out” para *NPM1* donde se encontró que los ratones *NPM^{fl/fl}* presentan características hematológicas similares a las encontradas en los síndromes mielodisplásicos (SMD), como diseritropoyesis y dismegacariopoyesis, además la inactivación de *NPM1* conlleva a la duplicación del centrosoma sin restricción y a la inestabilidad genómica.⁵⁵

Además de las mutaciones, se han observado otras anomalías de NPM1 en relación con el estado de haploinsuficiencia. El gen *NPM1* se localiza en el cromosoma 5 región q35, en donde se ha identificado la haploinsuficiencia en casos de SMD con delecciones en el cromosoma 5q. En estudios hechos en pacientes con síndrome 5q- aislada no se ha detectado haploinsuficiencia ni mutación de *NPM1*, lo contrario a los casos de SMD con del(5q) y cariotipo complejo donde se han detectado microdelecciones teloméricas que involucran la región 5q35 que provoca el estado de haploinsuficiencia.^{56,57,58}

Cuadro 2. Características de las mutaciones en el gen *NPM1*

Características genéticas de las mutaciones en NPM1

Aparecen *de novo* y son muy estables en las células leucémicas y están presentes en las células tallo.

Contienen perfiles particulares de expresión génica y de microARN.

Otras alteraciones como, FLT3-ITD, ocurren después que se presentan las mutaciones en NPM1.

Características clínicas y biológicas de las mutaciones en NPM1

La frecuencia es menor en niños, y mayor en mujeres.

Las características inmunofenotípicas son particulares, porque existe una expresión aumentada de CD33 con disminución de la expresión de CD34 en las células leucémicas, siendo más frecuentes en LMA tipo M4 y M5.

En cuanto a la citogenética, cerca de 85% de los casos de LMA con mutaciones en NPM1 no tienen alteraciones.

Los pacientes con mutaciones en NPM1 sin alteraciones en el gen FLT3 tienen excelente respuesta a la terapia de inducción en comparación con quienes no tienen la mutación, y también pronóstico más favorable.

En otras investigaciones se ha reportado que la delección de *NPM1* ocurre en 40% de los casos de SMD/LMA de alto riesgo con cariotipo complejo y pérdida de 5q.⁵⁹ Se ha descrito que los pacientes con tales características tienen peor pronóstico y mayor riesgo de LMA.⁵⁶

Fuera de los genes haploinsuficientes que se pierden en las regiones que comúnmente sufren pérdida (5q31 a 5q33) existen otros genes importantes a los que se les ha atribuido un papel en el desarrollo de la mielodisplasia, de entre más de 100 genes que permanecen en las regiones de 5q que comúnmente no sufren pérdida, los genes *APC* y *NPM1* son los que se han estudiado con mayor profundidad. Con respecto a *NPM1*, se han investigado los niveles de expresión génica en pacientes que padecen SMD con y sin del(5q), donde se observó que existe disminución en la expresión de *NPM1* sólo en el grupo de casos con del(5q) de los que tienen anemia resistente con exceso de blastos 1 y 2 fueron los que mostraron la expresión más baja de todos los casos estudiados. Con respecto a los casos de SMD sin del(5q) se observó que los niveles de expresión de *NPM1* son similares a los vistos en personas sanas.⁶⁰

Para buscar alguna causa de la disminución en la expresión de *NPM1* vista en los casos de SMD con del(5q) resultaría necesario investigar en detalle los sitios de ruptura de *NPM1* mediante el uso de sondas fluorescentes (p. ej. *Bacterial Artificial Chromosome BAC*) y así evidenciar si existen o no micropérdidas crípticas que no son detectadas por las técnicas citogenéticas convencionales estableciéndose una relación de la haploinsuficiencia de *NPM1* con este tipo de SMD.

NPM1: perspectivas

En la actualidad se sigue investigando la función de *NPM1* con el fin de ligar mecanismos biológicos que expliquen su papel en condiciones normales y patológicas, con esto se pretende avanzar en el desarrollo de herramientas diagnósticas y farmacológicas para el tratamiento de pacientes con enfermedades hematológicas.

Desde el punto de vista diagnóstico, la identificación de *NPM1* mutado mediante métodos moleculares continúa siendo un área importante de investigación. Trabajos recientes reportan que la cuantificación de copias de transcriptos de *NPM1* por PCR en tiempo real permite determinar la enfermedad mínima residual o la recidiva.⁶¹ La práctica de la cuantificación de *NPM1* mutado aunada a un seguimiento clínico estrecho ofrece la posibilidad de modular las

intervenciones terapéuticas ajustando los agentes quimioterapéuticos, las dosis y la duración del tratamiento.

En cuanto al tratamiento, los datos reportados hasta el presente sostienen la idea que *NPM1* puede ser un importante diana terapéutica, si bien dada la similitud existente entre *NPMc+* y *NPM1* salvaje será difícil diseñar una molécula que afecte de manera específica solo a la proteína mutada.

También sigue estudiándose el efecto de los medicamentos en el pronóstico de los pacientes con LMA y mutaciones en *NPM1*. Recientemente se publicó que en pacientes entre 17 y 60 años de edad con LMA existe un aumento en la supervivencia general a tres años cuando son sometidos a terapia de inducción con dosis de 90 mg/m² de daunorrubicina en presencia de mutaciones en los genes *NPM1*, *DNMT3A* o translocaciones *MLL* en comparación con los que son tratados con dosis de 45 mg/m² del mismo fármaco (44% vs 25%).⁶²

En conclusión, queda aún mucho por aprender en el horizonte de las mielopatías malignas y su comportamiento biológico. En el caso de las alteraciones de *NPM1*, éstas seguirán cobrando un papel importante en LMA y SMD, por tal motivo hoy en día resulta importante en la práctica clínica contar con las herramientas necesarias para integrar el estado mutacional del binomio *NPM1-FLT3* como parte del diagnóstico clínico y clasificación de la enfermedad. Asimismo, la cuantificación de las mutaciones de *NPM1* será de gran utilidad para mejorar la evaluación de la respuesta al tratamiento y dosificar de modo más racional el seguimiento de la terapia en las LMA *NPMc+*.

REFERENCIAS

1. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:493-505
2. Ruggero D, Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* 2003;3:179-192
3. Ye K. Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. *Cancer Biol Ther* 2005;4(9):918-23.
4. Colombo E, Martinelli P, Zamponi R, Shing DC, Bonetti P, Luzi L, et al. Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant. *Cancer Res* 2006; 66(6):3044-50.
5. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, et al. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *javascript:AL_get(this, 'jour', 'Cell.');* *Cell* 2000;103(1):127-40.
6. Tanaka M, Sasaki H, Kino I, Sugimura T, Terada M. Genes preferentially expressed in embryo stomach are predominantly expressed in gastric cancer. *Cancer Res* 1992;52(12):3372-7.

7. Nozawa Y, Van Belzen N, Van der Made AC, Dinjens WN, Bosman FT. Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. *J Pathol* 1996;178(1):48-52.
8. Bernard K, Litman E, Fitzpatrick JL, Shellman YG, Argast G, Polvinen K, et al. Functional proteomic analysis of melanoma progression. *Cancer Res* 2003;63(20):6716-25.
9. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, Liso A, Gorello P, et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* 2007;92(4):519-32. Review.
10. Meani N, Alcalay M. Role of nucleophosmin in acute myeloid leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;(9):1283-94.
11. Okazuka K, Masuko M, Seki Y, Hama H, Honma N, Furukawa T, et al. Successful all-trans retinoic acid treatment of acute promyelocytic leukemia in a patient with NPM/RAR fusion. *Int J Hematol* 2007;86(3):246-249.
12. Sportoletti P, Grisendi S, Majid SM, Cheng K, Clohessy JG, et al. Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse. *Blood* 2008;111(7):3859-3862.
13. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, et al. Cytoplasmic Nucleophosmin (NPM) Identifies a Subtype of Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype and NPM1 Gene Mutations. *New Engl Med* 2005;352:254-266.
14. Falini B, Mecucci C, Saglio G, Lo Coco F, Diverio D, 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;93(3):439-442.
15. Braoudaki M, Papathanassiou C, Katsibardi K, Tourkadoni N, Karamolegou K, et al. The frequency of NPM1 mutations in childhood acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2010;3:41.
16. Falini B. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): molecular, pathological, and clinical features. *Cancer Treat Res* 2010;145:149-168.
17. 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;117(4):1109-1120.
18. Okuwaki M. The structure and functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *J Biochem* 2008;143(4):441-448.
19. Hingorani K, Szebeni A, Olson MO. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem* 2000;275(32):24451-24457.
20. Tokuyama Y, Horn HF, Kawamura K, Tarapore P, Fukasawa K. Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *J Biol Chem* 2001; 276(24):21529-21537.
21. Liu X, Liu Z, Jang SW, Shinmura K, Kang S, Dong S, et al. Sumoylation of nucleophosmin/B23 regulates its subcellular localization, mediating cell proliferation and survival. *Proc Natl Acad Sci US A*. 2007; 104(23):9679-9684.
22. Shandilya J, Swaminathan V, Gadad SS, Choudhari R, Kodaganur GS, Kundu TK. Acetylated NPM1 localizes in the nucleoplasm and regulates transcriptional activation of genes implicated in oral cancer manifestation. *Mol Cell Biol* 2009;18:5115-5127.
23. Weber JD, Jeffers JR, Rehg JE, Randle DH, Lozano G, Roussel MF, et al. p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 2000;14:2358-65.
24. Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1999;1: 20-6.
25. Bonetti P, Davoli T, Sironi C, Amati B, Pelicci PG, Colombo E. Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 gamma. *J Cell Biol* 2008;182(1):19-26.
26. Luo H, Q Li J, O'Neal, Kreisel F, Le Beau MM, Tomasson MH. c-Myc rapidly induces acute myeloid leukemia in mice without evidence of lymphoma-associated antiapoptotic mutations. *Blood* 2005;106:2452-2461.
27. Cheng K, Grisendi S, Clohessy JG, Majid S, Bernardi R, et al. The leukemia-associated cytoplasmic nucleophosmin mutant is an oncogene with paradoxical functions: Arf inactivation and induction of cellular senescence. *Oncogene* 2007;26:7391-400.
28. Wanzel M, Russ AC, Kleine-Kohlbrecher D, Colombo E, Pelicci PG, Eilers M. A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Mizl function with cell growth. *Nat Cell Biol* 2008;10:1051-1061.
29. Falini B, Bolli N, Liso A, Martelli MP, Mannucci R, Pileri S, et al. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. *Leukemia* 2009;23(10):1731-1743.
30. Sportoletti P, Grisendi S, Majid SM, Cheng K, Clohessy JG, Viale A, et al. Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse. *Blood* 2008;111(7):3859-3862.
31. Rau R, Brown P. Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity. *Hematol Oncol* 2009;27(4):171-181.
32. Albiero E, Madeo D, Bolli N, Giaretta I, Bona ED, Martelli MF, et al. Identification and functional characterization of a cytoplasmic nucleophosmin leukaemic mutant generated by a novel exon-11 NPM mutation. *Leukemia* 2007;21(5):1099-1103.
33. Brown P, McIntyre E, Rau R, Meshinchi S, Lacayo N, Dahl G, et al. The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. *Blood* 2007;110(3):979-985.
34. Hollink IH, Zwaan CM, Zimmermann M, Arentsen-Peters TC, Pieters R, Cloos J, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. *Leukemia* 2009;23(2):262-270.
35. Thiede C, Creutzig E, Reinhardt D, Ehninger G, Creutzig U. Different types of NPM1 mutations in children and adults: evidence for an effect of patient age on the prevalence of the TCTG-tandem duplication in NPM1-exon 12. *Leukemia* 2007;21(2):366-367.
36. Noguera NI, Ammatuna E, Zangrilli D, Lavorgna S, Divona M, Buccisano F, et al. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005;19(8):1479-82. Erratum in: *Leukemia*. 2007 May;21(5):1134.
37. Lin LI, Lin TC, Chou WC, Tang JL, Lin DT, Tien HF. A novel fluorescence-based multiplex PCR assay for rapid simultaneous detection of CEBPA mutations and NPM1 mutations in patients with acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2006;20(10):1899-1903.
38. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005;106(12):3733-3739.

39. B. Falini, Gionfriddo I, Cecchetti F, Ballanti S, Pettirossi V, Martelli MP. Acute myeloid leukemia with mutations nucleophosmin (NPM1): any hope for a targeted therapy? *Blood Reviews* 2011;25:247-257.
40. Gorelo P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'Oro MG, Gottardi E, Specchia G, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia* 2006;20(6):1103-1108.
41. Ottone T, Ammatuna E, Lavorgna S, Noguera NI, Buccisano F, Venditti A, et al. Lo-Coco F. An allele-specific rt-PCR assay to detect type A mutation of the nucleophosmin-1 gene in acute myeloid leukemia. *J Mol Diagn.* 2008;10(3):212-6.
42. Calvo KL, Ojeda MJ, Ammatuna E, Lavorgna S, Ottone T, Targovnik HM, et al. Detection of the nucleophosmin gene mutations in acute myelogenous leukemia through RT-PCR and polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur J Haematol.* 2009;82(1):69-72.
43. Santamaría CM, Chillón MC, García-Sanz R, Pérez C, Caballero MD, Ramos F, et al. Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2009;114:148
44. Marcucci G, Maharry K, Whitman SP, Vukosavljevic T, Paschka P, Langer C, et al. High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2007;25(22):3337-43.
45. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008;358(18):1909-18.
46. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010;116(3):354-65.
47. Schneider F, Hoster E, Unterhalt M, Schneider S, Dufour A, Benthaus T, et al. The FLT3ITD mRNA level has a high prognostic impact in NPM1 mutated, but not in NPM1 unmutated AML with a normal karyotype. *Blood* 2012;Feb 28, Epub.
48. Sockel K, Wermke M, Radke J, Kiani A, Schaich M, Bornhäuser M, et al. Minimal residual disease-directed preemptive treatment with azacitidine in patients with NPM1-mutant acute myeloid leukemia and molecular relapse. *Haematologica* 2011;96(10):1568-70. Epub 2011 Jul 12.
49. Haferlach T, Bacher U, Alpermann T, Haferlach C, Kern W, Schnittger S. Amount of bone marrow blasts is strongly correlated to NPM1 and FLT3-ITD mutation rate in AML with normal karyotype. *Leukemia Research* 2012;36:51-58
50. Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2010;28(4):596
51. Döhner Konstanze, Schlenk FS, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005;106(12):3740-3748.
52. Anensen N, Hjelle SM, Van Belle W, Haaland I, Silden E, Bourdon JC, et al. Correlation analysis of p53 protein isoforms with NPM1/FLT3 mutations and therapy response in acute myeloid leukemia. *Oncogene* 2011;1-13 online publication.
53. Perera Y, Farina HG, Gil G. Anticancer peptide CIGB-300 binds to nucleophosmin/B23, impairs its CK2-mediated phosphorylation, and leads to apoptosis through its nucleolar disassembly activity. *Mol Cancer Ther* 2009;8:1189-1196.
54. Chevallier P, Prebet T, Pigneux A, Hunault M, Delaunay J, Perry F, et al. Influence of NPM1 and FLT3-ITD status on outcome in relapsed/refractory AML patients receiving salvage therapy including gemtuzumab ozogamicin. *Leukemia* 2010;24:467-469.
55. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Manova K, et al. Role of nucleophosmin in embrionic development and tumorigenesis. *Nature* 2005;437:147-153.
56. Ebert B. Molecular Dissection of the 5q Deletion in Myelodysplastic Syndrome. *Seminars in Oncology* 2011;38(5):621-626.
57. Ammatuna E, Panetta P, Agirre X, Ottone T, Lavorgna S, Calasanz MJ, et al. NPM1 gene deletions in myelodysplastic syndromes with 5q- and complex karyotype. *Haematologica* 2011;96(5):784-785.
58. Douet-Guilbert N, De Braekeleer E, Basenko A, Guéganic N, Bovo C, Le Bris MJ, et al. Molecular characterization of deletions of the long arm of chromosome 5 (del(5q)) in 94 MDS/ AML patient. *Leukemia* 2012;1-3 online publication.
59. La Starza R, Matteucci C, Gorelo P, Brandimarte L, Pierini V, Crescenzi B, et al. NPM1 deletion is associated with gross chromosomal rearrangement in leukemia. *PLoS ONE* 2010; 5(9):e12855.
60. Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis A, Perry J, Malcovati L, Della Porta MG, et al. Marked down-regulation of nucleophosmin-1 is associated with advanced del(5q) myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2011;155:272-274.
61. Bakarat F, Luthra R, Yin C, Barkoh BA, Hai S, Jamil W, et al. Detection of Nucleophosmin 1 Mutations by Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction versus Capillary Electrophoresis. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:994-1000.
62. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2012;366(12):1079-89.