

Tesis de Maestría

Estudio de la frecuencia de las mutaciones en el gen FLT3 (ITD Y D835) y su significado pronóstico en la LMA

Fernández, Carina Valeria

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la Universidad de Buenos Aires en Biología Molecular Médica de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Fernández, Carina Valeria. (2004). Estudio de la frecuencia de las mutaciones en el gen FLT3 (ITD Y D835) y su significado pronóstico en la LMA. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4206_Fernandez

Cita tipo Chicago:

Fernández, Carina Valeria. "Estudio de la frecuencia de las mutaciones en el gen FLT3 (ITD Y D835) y su significado pronóstico en la LMA". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4206_Fernandez

EXACTAS
UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCE y N BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA ?

FACULTAD DE MEDICINA

**(Departamento de Medicina. Servicio de Hematología del Hospital
Clínico de Salamanca)**



**ESTUDIO DE LA FRECUENCIA DE LAS
MUTACIONES EN EL GEN *FLT3* (ITD y D835)
Y SU SIGNIFICADO PRONÓSTICO
EN LA LMA**

77821

Carina Valeria Fernández

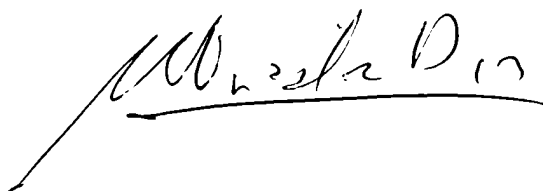
2004

Dr Marcos González Díaz, Profesor Asociado de Hematología de la Facultad de Medicina y Jefe de Sección del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca,

CERTIFICA:

Que Carina Valeria Fernández ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesina titulado “ESTUDIO DE LA FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES EN EL GEN FLT3 (ITD-D835) Y SU SIGNIFICADO PRONÓSTICO EN LA LMA” y que reúne las condiciones de originalidad necesarias para optar al Título de Magíster en Biología Molecular Médica de la Universidad de Buenos Aires.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en Salamanca, a 30 de Agosto de 2004.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marcos González Díaz', is written over a horizontal line. The signature is fluid and cursive.

Fdo.: Dr. Marcos González Díaz

Agradecimientos

Un sincero agradecimiento a mi tutor, el Dr Marcos González Díaz, por brindarme su apoyo y darme la oportunidad de realizar este trabajo, permitiéndome ampliar mi formación en el campo de la medicina molecular.

A Ramón, por su desinteresada ayuda y colaboración. Gracias, también, por tanta alegría y optimismo.

Al Prof. Jesús San Miguel, por su cordial acogida en el Servicio de Hematología y por el interés puesto en el presente estudio.

A Carmen, por su gran colaboración y constante apoyo y optimismo que hicieron posible la realización de este trabajo. Gracias, también, por ser tan buena compañera y por transmitirme tus conocimientos tan desinteresadamente.

A los compañeros del laboratorio que me brindaron su colaboración, conocimientos y sobre todo amistad y cariño.

A mis amigos del alma, que a pesar de la distancia de alguna forma se la ingeniaron para estar siempre presente.

A mis amigos "recientes" por hacer de mi estancia en Salamanca una experiencia humana de gran valor.

A Carina, por su amistad y apoyo durante todo este tiempo. A Belén, Mariela y Tomás, gracias por los lindos momentos compartidos en el máster y por la linda amistad que nos une. A Claudia, gracias por "aquella charla" sin la cual quizás hoy no estaría aquí.

Y en especial a mis padres y hermanas por comprenderme y apoyarme en todos mis emprendimientos.

1. INTRODUCCIÓN	1
Expresión y función del gen <i>FLT3</i>	2
Ligando de <i>FLT3</i>	4
Regulación de la activación de <i>FLT3</i> por el ligando	5
Vías de señalización de <i>FLT3</i>	6
Mutaciones en <i>FLT3</i>	7
Posibles mecanismos de activación del receptor mutado	8
Incidencia de mutaciones en el gen <i>FLT3</i> en hemopatías malignas	11
Significado clínico de las mutaciones en el gen <i>FLT3</i> en la LMA	12
2. HIPÓTESIS de TRABAJO y OBJETIVOS	16
Hipótesis de trabajo	17
Objetivos	18
3. MATERIAL y MÉTODOS	19
3.1. Pacientes	20
3.2. Preparación de muestras	21
3.3. Extracción de ARN total	21
3.4. Síntesis de ADN complementario	22
3.5. Detección de mutaciones en el gen <i>FLT3</i>	23
3.6. Detección de los transcritos de fusión PML/RAR α , AML/ETO y CBF β /MYH11	25
3.7. Análisis estadístico	27
4. RESULTADOS	28
4.1. Detección de los transcritos de fusión	29
4.2. Detección de mutaciones en el gen <i>FLT3</i>	29
4.3. Estado de <i>FLT3</i> y características leucémicas	33
4.4. Análisis de supervivencia con el método Kaplan-Meier	35

5. DISCUSIÓN	37
6. CONCLUSIONES	40
7. GLOSARIO DE ABREVIATURAS	42
8. BIBLIOGRAFÍA	43

INTRODUCCIÓN

El gen FMS-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) también conocido como fetal liver kinase-2 (*FLK-2*) o stem cell tyrosine kinase-1 (*STK-1*), se identificó y caracterizó por primera vez en el ratón¹ y posteriormente en 1991 fue clonado en humanos por dos grupos de forma independiente^{2,3}. El gen *FLT3* se localiza en la banda q12 del cromosoma 13 y está formado por 24 exones que se distribuyen a lo largo de más de 100 kb presentando un 85% de homología en la secuencia de aminoácidos con el gen *FLT3* de ratón⁴. La secuencia de aminoácidos en humanos se corresponde con una proteína de 993 residuos correspondiente a un receptor tirosina kinasa (RTK) perteneciente a la clase III de la familia de RTK y por lo tanto estrechamente relacionado a otros receptores conocidos como KIT, FMS y PDGF entre los cuales existe una gran homología en su estructura^{5,6}.

En el desarrollo hematopoyético normal las células utilizan un complejo sistema de control de la proliferación, diferenciación y muerte celular. El control de la proliferación, en parte, depende de la estimulación de receptores tirosina kinasa inducida por sus ligandos, generándose la activación de una cascada de proteínas quinasas con la consiguiente transmisión de señales desde el medio externo al núcleo de la célula. Diversos estudios han demostrado que el gen *FLT3* está implicado de forma importante en el control de la hematopoyesis normal^{7,8}.

En la actualidad se han descrito mutaciones en el gen *FLT3* que originan la autoactivación del receptor pudiendo estas mutaciones contribuir a la progresión leucémica⁹. Estudios recientes han demostrado que mutaciones en este gen, principalmente duplicaciones internas en tándem y mutaciones puntuales, son las alteraciones genéticas más frecuentes en las Leucemias Mieloblásticas Agudas (LMA)^{10, 11, 12, 13}.

Expresión y función del gen *FLT3*

El gen *FLT3* se expresa en una gran variedad de líneas celulares humanas y de ratón tanto de origen mieloide como linfóide de línea B^{14, 15}. En la médula ósea normal el gen *FLT3* se expresa en las células progenitoras hematopoyéticas CD34+^{7, 11}. También se

encontró ARNm de *FLT3* en otros órganos linfo-hematopoyéticos como el hígado, bazo, timo y placenta aunque la expresión en estos órganos parece debido a contaminación de células hematopoyéticas más bien que a la expresión del gen en dichos tejidos¹⁶. Por otra parte, varios tipos de leucemias expresan *FLT3*, con mayor incidencia en los blastos leucémicos del 70-90% de los pacientes con LMA y en menor frecuencia en los Síndromes Mielodisplásicos (SMD), en las Leucemias Linfoblásticas Agudas (LLA) (principalmente precursores de línea B) y en las crisis blásticas de las Leucemias Mieloides Crónicas (LMC)^{17,18}.

La transcripción del gen *FLT3* produce un ARNm que se traduce en una proteína con cinco dominios extracelulares del tipo inmunoglobulinas, un dominio transmembrana, un dominio yuxtamembrana y dos dominios intracelulares tirosina kinasa unidos por un dominio kinasa. La glicosilación de la proteína *FLT3* citoplasmática promueve su localización a la membrana celular permaneciendo como receptor inactivo en estado monomérico. La unión del ligando provoca su dimerización y posterior fosforilación de los residuos tirosina del dominio catalítico conduciendo a la activación del receptor y efectores "downstream". Los receptores dimerizados son rápidamente internalizados y degradados (Figura 1).

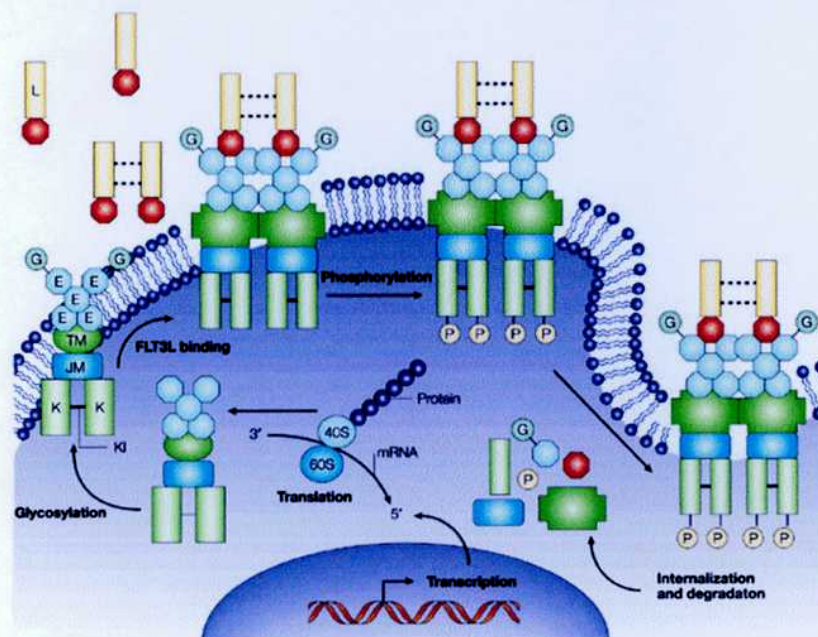


Figura 1 – Estructura y activación del receptor FLT3

E - Dominio extracelular tipo inmunoglobulina, TM - Dominio transmembrana, JM - Dominio yuxtamembrana, K - Dominio tirosina kinasa, KI - Dominio de union de kinasas, L - Ligando, P - Grupo fosforilo, G - Grupo glicosilo
(Tomado de Stirewalt D & Radich J³¹)

El receptor FLT3 desarrolla un papel importante en la diferenciación y proliferación de las células progenitoras de la médula ósea^{7, 8}. La activación de FLT3 por el ligando (FLT3-L) promueve *in vitro* el crecimiento de células progenitoras. Las respuestas mediadas por FLT3 son altamente dependientes del tipo celular y de otros factores de crecimiento de la célula. Gabbianelli et al¹⁹ y otros grupos²⁰ observaron que la estimulación mediante FLT3-L sin la adición de otros factores de crecimiento promueve la diferenciación monocítica de progenitores hematopoyéticos pero sin una marcada respuesta proliferativa. Sin embargo, la estimulación de FLT3-L en combinación con otros factores de crecimiento tales como IL-3, G-CSF, GM-CSF y KIT ligando produce una fuerte respuesta proliferativa²¹ y aumenta el desarrollo de unidades formadoras de colonias de monocitos y granulocitos^{19, 20}. En una serie de experimentos en los que se compararon varias combinaciones de factores de crecimiento se observó que la combinación de FLT3-L, KIT ligando e IL-3 produce un efecto proliferativo más fuerte en progenitores mieloides. Por el contrario, la estimulación con FLT3-L no tuvo un efecto significativo en la eritropoyesis o megacariopoyesis. Estas observaciones concuerdan con que en estas líneas celulares no se exprese *FLT3* ni tampoco en los eritrocitos o megacariocitos de la médula ósea²⁰.

La estimulación de FLT3 también es importante en el desarrollo de los linfocitos. FLT3-L en combinación con IL-7 y IL-11 promueven la expansión clonal y la diferenciación de progenitores hematopoyéticos no comprometidos en el ratón²².

Ligando de FLT3

El gen del ligando del receptor FLT3 (*FLT3-L*) fue clonado en 1993²³ y codifica una proteína de 235 aminoácidos con un 72% de homología con el ligando FLT3 de ratón.

FLT3-L es una proteína transmembrana de tipo 1 que mediante proteólisis puede ser dividida en una proteína soluble homodimérica²⁴ que, a diferencia de la proteína transmembrana, no posee el carboxilo terminal, conservando principalmente los dominios extracelulares en los cuales reside la actividad del ligando. La isoforma más frecuente es la unida a la membrana aunque ambas son biológicamente activas.

FLT3-L es un factor de crecimiento de células mieloides inmaduras y de células progenitoras pudiendo estimular la proliferación de células CD34+ tanto *in vitro* como *in vivo*^{25,26}. Por otro lado, FLT3-L también estimula la proliferación y la supervivencia de los blastos leucémicos de la LMA que expresan FLT3. En estudios realizados con FLT3-L junto a otros factores de crecimiento, se pudo observar una mayor proliferación de células frescas tanto de LMA como de LLA^{18,27}.

En otros estudios también se observó que la mayoría de las líneas celulares de leucemias de origen mieloide expresan FLT3-L o FLT3 y en algunos casos ambos (receptor y ligando), además de observarse un importante efecto antiapoptótico de FLT3-L²⁸.

Regulación de la activación de FLT3 por el ligando

En ausencia del ligando, FLT3 reside mayoritariamente como monómero inactivo en la membrana plasmática. En este estado inactivo, la conformación del receptor debería resultar en una inhibición estérica de la dimerización resultando en la no exposición de los sitios de fosforilación en los dominios tirosina kinasa. Un mecanismo similar de inhibición entre dominios regulatorios y catalíticos se describieron en otras familias de receptores tirosina kinasa²⁸. La unión de FLT3-L produciría un cambio en la conformación de FLT3 y su posterior dimerización y exposición de los sitios de fosforilación en los dominios tirosina kinasa²⁵. La dimerización estabilizaría el receptor, ahora constituido como homodímero, y por lo tanto con un mayor nivel de activación. No obstante, todavía no se conocen con certeza ni el mecanismo de activación de FLT3 por FLT3-L ni la posterior degradación del complejo receptor-ligando y muchas son las preguntas que permanecen sin responder.

La exposición al ligando es un componente crucial en la regulación de la actividad de FLT3. Si bien los niveles en suero de FLT3-L en adultos normales son bajos, en ciertas condiciones puede inducirse su producción. Así, pacientes con un bajo número de leucocitos, ya sea por una enfermedad hematológica (por ejemplo Anemia de Fanconi o Anemia Aplástica) o por el propio tratamiento quimioterápico, presentan un marcado

aumento de los niveles de FLT3-L en suero y por lo tanto un intento de promover la hematopoyesis ²⁹.

Ambas isoformas de FLT3-L pueden inducir la actividad tirosina quinasa de FLT3 y estimular la proliferación de células progenitoras. Sin embargo, de forma similar a lo que ocurre con el ligando de c-KIT, FLT3-L no induce de una forma eficiente la proliferación de progenitores mieloides y linfoides por sí mismo, teniendo un efecto mayor en combinación con otros factores de crecimiento hematopoyéticos e interleucinas ³⁰.

Vías de señalización de FLT3

Se han realizado muchos estudios a fin de conocer las vías de transducción por activación de FLT3, aunque éstas todavía no han sido definitivamente caracterizadas. La figura 2 muestra algunas de las complejas asociaciones y efectores “downstream” que probablemente se produzcan tras la activación de FLT3. La unión de FLT3-L dispara las vías de señalización mediadas por PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) y RAS, lo que conduce a la proliferación celular y a la inhibición de la apoptosis. La actividad de PI3K probablemente esté regulada a través de varias interacciones entre FLT3, SHCs y otras u otras proteínas como SHIP, SHP2, CBL y GRB2 (GAB2). Cuando se activa PI3K se estimulan proteínas “downstream” como PDK1 o la proteína quinasa B (PKB/AKT) entre otras, iniciando la transcripción y transducción de genes cruciales para la regulación, al mismo tiempo que se inhibe la actividad de otras proteínas. Además PI3K bloquea la apoptosis a través de la inhibición de la fosforilación de BAD, proteína proapoptótica de la familia BCL2.

El receptor FLT3 activado se asocia también con GRB2 a través de SHG y por lo tanto a la vía de señalización mediada por RAS, activando a través de efectores “downstream” la transcripción de proteínas STATs (entre otras) y por lo tanto la transcripción de genes implicados en la proliferación celular. Además, ambas vías de transducción (PI3K y RAS) probablemente interaccionen con muchas otras proteínas del ciclo celular y antiapoptóticas ³¹.

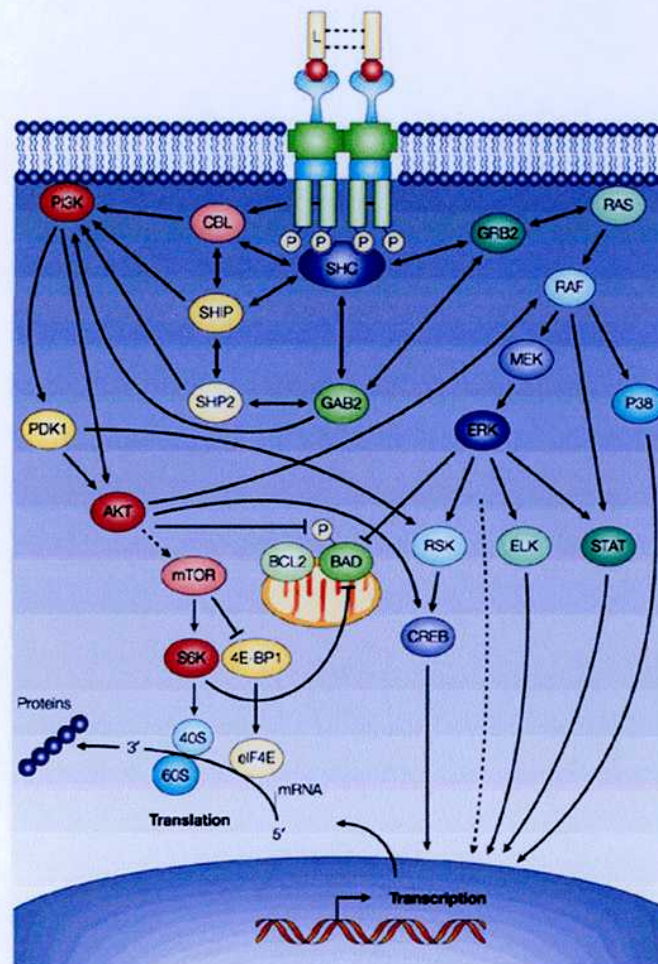


Figura 2. Cascada de señales mediadas por FLT3.

(Tomado de Stirewalt D & Radich J³¹)

Mutaciones en *FLT3*

Nakao y colaboradores³² fueron los primeros en describir mutaciones en el gen *FLT3* en hemopatías malignas. La mutación más frecuente es la duplicación interna en tándem (internal tandem duplication: ITD) en la región que codifica el dominio juxtamembrana (JM). La longitud de la duplicación varía aproximadamente entre 3 y ≥ 400 pb¹⁰ y se produce en el exón 14 (figura 3), típicamente, pero no siempre, cerca de los residuos 590-600 de la secuencia de aminoácidos de FLT3.

Ocasionalmente, la región duplicada incluye una porción del exón 15. De cualquier forma en todos los casos se conserva el marco de lectura incluso cuando dentro de esta mutación se producen inserciones o deleciones de nucleótidos ³³.

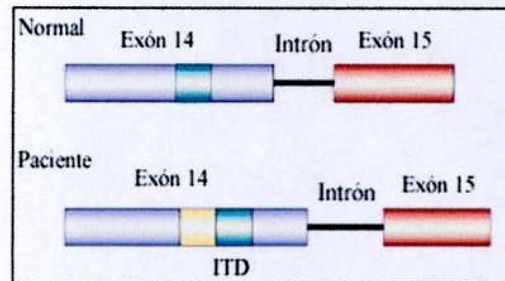


Figura 3 – ITD en el exón 14

Más recientemente se han descrito mutaciones puntuales en el exón 20 del segundo dominio tirosina kinasa (DTK2). La más frecuente es la denominada D835 en la cual se produce la sustitución de G → T (GAT → TAT) del codón 835 y por lo tanto la sustitución del ácido aspártico por tirosina. Menos comunes son otras mutaciones, como deleciones en el mismo codón 835 o deleciones o inserciones en codones circunvecinos al 835 ^{34, 35}. Al igual que la ITD, todas las mutaciones en el dominio tirosina kinasa mantienen el marco de lectura.

La mayoría de los pacientes presentan un solo tipo de mutación (ITD o D835) aunque, ocasionalmente, se han encontrado en un mismo paciente ambas mutaciones ^{34, 35}.

Posibles mecanismos de activación del receptor mutado

Estudios *in vitro* de transducción han demostrado que la ITD produce una activación constitutiva del receptor FLT3, por lo que permanece en forma dimérica y autofosforilada aún en ausencia del ligando ^{36, 37}.

Las figuras 4 y 5 muestran una comparación de los posibles mecanismos de activación de FLT3 no mutado y mutado, respectivamente. En el modelo propuesto para

el receptor FLT3 no mutado (figura 4), los receptores no unidos al ligando permanecen en la membrana celular en forma inactiva como monómeros (4a). La conformación del receptor monomérico probablemente prevenga la dimerización y posiblemente bloquee la unión de proteínas adaptadoras. Tras la unión del ligando, cambios conformacionales del receptor promueven la dimerización, autofosforilación y unión de proteínas adaptadoras con la consecuente activación de efectores “downstream”³¹ (4b).

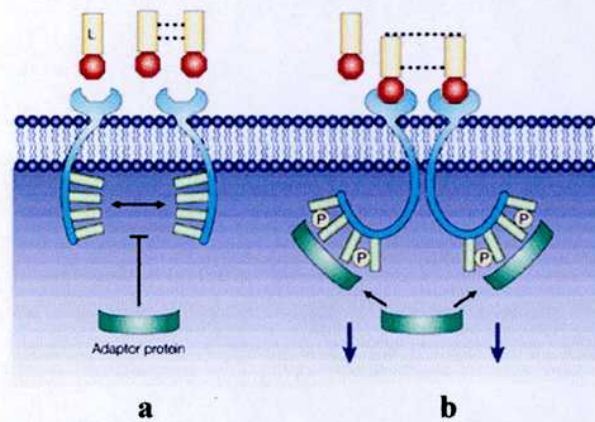


Figura 4. Posible mecanismo de activación del receptor no mutado.

- a- Receptores monoméricos inactivos.
 - b- Receptores dimerizados activos unidos al ligando con la consiguiente activación de efectores “downstream”.
- (Tomado de Stirewalt D & Radich J³¹)

En el modelo propuesto para el receptor FLT3 mutado (figura 5a), la ITD, probablemente a través de un cambio conformacional, promueven la dimerización y activación del receptor independiente de ligando. Además, el cambio conformacional asociado con la ITD debería modificar la estructura del receptor de forma tal que puedan unirse proteínas adaptadoras. También se ha demostrado que la mutación D835 confiere una activación constitutiva del receptor de forma similar a la ITD^{34, 40} (figura 5b) aunque todavía se desconoce si los efectores “downstream” son similares a los activados por el receptor no mutado³¹.

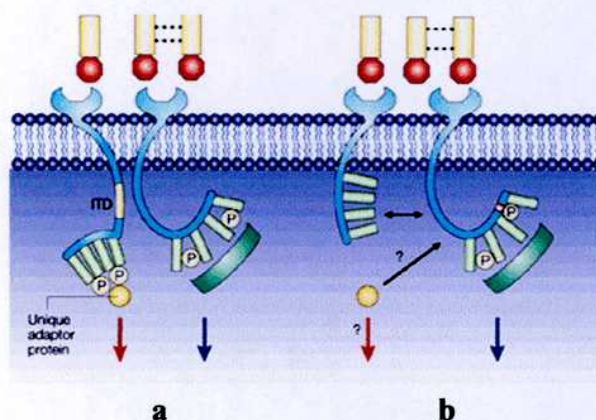


Figura 5. Posibles mecanismos de activación del receptor mutado.

En **a** la mutación que causa la activación constitutiva del receptor es la ITD mientras que en **b** es la mutación puntual. En ambos casos se produce la activación de efectores "downstream". (Tomado de Stirewalt D & Radich J³¹)

Otras mutaciones como inserciones o deleciones en diversas regiones del dominio yuxtamembrana también promueven la activación constitutiva del receptor, sin bien todavía no se conoce con exactitud el mecanismo de activación.

Diferentes estudios en líneas celulares y modelos animales demuestran el potencial leucémico de tales alteraciones, estimulando la proliferación e inhibición de la apoptosis^{38, 39}. Los experimentos muestran que, probablemente, las mutaciones en el dominio yuxtamembrana eliminan regiones en FLT3 que previenen la dimerización del receptor en ausencia del ligando. Además, receptores con ITD y con pérdida del dominio tirosina kinasa pueden dimerizarse con receptores no mutados en ausencia del ligando produciendo su activación⁴¹. Un mecanismo similar de activación se ha descrito en el gen vascular endotelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) en el cual se han identificado secuencias represivas similares a las presentes en el dominio yuxtamembrana de FLT3 y la pérdida de dichas secuencias provoca la activación de una proteína quimérica VEGFR-1/VEGFR-2⁴². Por lo tanto, la pérdida de secuencias represoras de dimerización con la subsecuente activación constitutiva del receptor podría ser un evento relativamente común.

Existe aproximadamente un 80% de similitud entre los dominios tirosina kinasa de c-FMS, c-KIT y FLT3. También se han encontrado mutaciones en el dominio tirosina kinasa de c-FMS y c-KIT donde el grado de actividad kinasa depende del tipo de aminoácido sustituido. Así, mientras que algunas mutaciones puntuales causan un marcado aumento en la actividad tirosina quinasa, otras generan un efecto contrario^{43,44}. En contraste con estos experimentos, los realizados con receptores mutantes en el dominio jxtamembrana demostraron que cualquier tipo de mutación produce un aumento en la actividad del receptor⁴¹. Teniendo en cuenta otros experimentos realizados con otros RTK de clase III, se podría pensar que las mutaciones en el dominio tirosina kinasa probablemente incrementen el nivel intrínseco de actividad tirosina kinasa más que interferir con dominios represores y por lo tanto con el proceso de dimerización. No obstante, todavía se desconoce cómo las mutaciones en FLT3 cooperan realmente en la tumorigénesis y si las vías de señalización son similares a las activadas por el receptor no mutado.

Incidencia de las mutaciones en el gen *FLT3* en hemopatías malignas.

Se ha descrito una mayor incidencia de estas mutaciones principalmente en la LMA estando prácticamente ausente en otras hemopatías malignas¹⁰. La ITD está presente en la LMA de nuevo diagnóstico en un 15-35%^{32, 11} de los pacientes y solo en un 5-10% de los pacientes con SMD^{11, 45}, mientras que es muy raro detectar esta mutación en la LLA⁴⁶. Por otro lado, en la LMA se ha observado que la incidencia de la mutación aumenta con la edad del paciente siendo aproximadamente de un 17% en pacientes pediátricos, un 20% en pacientes adultos y un 34% en los de edad avanzada^{47, 48}. En cuanto a la D835 su frecuencia es significativamente menor respecto de la ITD, presentándose en un 5-10% de los pacientes con LMA, en un 2-5% de los pacientes con SMD y en 1-3% de los pacientes con LLA^{12, 13}.

Por otro lado, la presencia de dichas alteraciones se ha relacionado con características morfológicas y citogenéticas de la LMA, siendo su mayor incidencia en la Leucemia Promielocítica Aguda (LPA). Por el contrario su posible correlación con otras

alteraciones genéticas frecuentes en la LMA como la t(8;21), la inv(16) o alteraciones en 11q23 es menos conocida^{49, 50}.

Significado clínico de las mutaciones en el gen *FLT3* en la LMA

La mayoría de los estudios publicados indican que la ITD del gen *FLT3* en la LMA se asocia a factores pronósticos adversos y a una menor supervivencia. En la mayoría de las series, tanto de adultos como de niños, las LMAs ITD positivas presentan una mayor leucocitosis (generalmente mayor a dos veces)^{10, 13, 47, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 62, 63} y algunas series encuentran además un porcentaje de blastos en médula ósea y sangre periférica más elevado junto a niveles de LDH incrementados^{12, 48, 49, 50, 57, 58}.

En cuanto a las implicaciones pronósticas de la ITD, los estudios realizados en pacientes pediátricos concuerdan acerca del impacto negativo de la ITD, con tasas de supervivencia notablemente inferiores respecto de los pacientes negativos para dicha mutación^{47, 59, 60, 61}. También concuerdan los resultados obtenidos con pacientes de edad avanzada (>60 años) donde la presencia de la ITD no influye de forma desfavorable en el pronóstico^{48, 62}. Por el contrario, existen datos contradictorios al momento de establecer la implicancia de la ITD en el pronóstico de los pacientes adultos (<60 años). Si bien varios estudios (tabla 1) demuestran que la ITD confiere un peor pronóstico en estos pacientes, los datos son discordantes cuando se estudia el valor pronóstico independiente de esta mutación. Mientras que algunos estudios demuestran que la presencia de la ITD se correlaciona de forma independiente con supervivencia global (SG) disminuida^{49, 50, 56, 57, 58}, otros más recientes, algunos con un número importante de pacientes, no han demostrado en estudios multivariantes que su presencia se asocia de forma independiente a mal pronóstico^{10, 12, 48, 54}.

Respecto de la D835 todavía no se ha podido conocer claramente su significado clínico dado a su baja frecuencia. Por otro lado, los pocos estudios realizados también difieren en cuanto al valor pronóstico de esta mutación (tabla 1). Mientras que un grupo no encuentra correlación con la SG¹³ otro, con un mayor número de pacientes, demuestra una relación estadísticamente significativa con menor supervivencia¹². Por

lo tanto, son necesarios nuevos estudios a fin de despejar las controversias existentes respecto al valor pronóstico de las mutaciones en *FLT3*.

En pacientes con LPA, la mayoría de los estudios realizados^{50, 52, 53}, muestran que las mutaciones en *FLT3* no influyen negativamente sobre la supervivencia a pesar de ser la LMA con mayor incidencia de mutaciones. Por el contrario, poco se conoce acerca de la correlación y el valor pronóstico de las mutaciones en *FLT3* con otras alteraciones genéticas frecuentes en la LMA como la t(8;21), la inv(16) o alteraciones en 11q23 si bien recientes estudios observaron un incremento en la incidencia de las mutaciones en *FLT3* dentro del subgrupo FAB M5^{49, 50, 65}.

Tabla 1: Resultados obtenidos en diferentes estudios en cuanto a la incidencia y valor pronóstico de las alteraciones en el gen *FLT3* en la LMA.

Referencia	Casos	Características-LMA	Mutaciones (incidencia)	Evolución clínica (p)	Análisis Multivariable
Sheikhha <i>et al.</i> ⁵¹	80	LMA en adultos	ITD: 8/80 (10%) D835: 6/80 (7.5%)	alta RR menor SG (0.006) menor SLE (0.047) sin diferencias	NR
Rombouts <i>et al.</i> ⁶³	81	LMA en adultos	ITD: 18/81 (22%)	menor RC (0.03) menor SLEv (0.003) incrementada RR (0.01)	NR
Whitman <i>et al.</i> ⁹	82	LMA en adultos- Citogenética normal. <60 años	ITD: 23/82 (28%) Pérdida del alelo normal: 8/23 (35%)	menor SLE (0.03) sin diferencias en la SG menor SLE (0.0017) menor SG (0.0014) sin diferencias en la RC	Factor independiente de mal pronóstico para la SLE y SG
Noguera <i>et al.</i> ³²	90	Adultos con M3	ITD: 33/90 (37%) D835: 7/90 (8%)	sin diferencias en la RC sin diferencias en la SLE sin diferencias en la SLR	NR
Meshinchi <i>et al.</i> ⁴⁷	91	LMA en niños	ITD: 15/91 (17%)	menor RC (0.005) menor SG (0.02) menor SLEv (0.002)	Factor independiente de mal pronóstico para la SG
Kainz <i>et al.</i> ⁵⁰	100	LMA en adultos	ITD: 26/100 (26%)	sin diferencias en la RC menor SG (<0.003) menor SLE (<0.02) sin diferencias en la RR	Factor independiente de mal pronóstico para la SG si se excluyen los casos con t(15;17)
Abu-Duhier <i>et al.</i> ⁶⁴	106	LMA en adultos	ITD: 14/106 (13%)	menor SG (0.0002)	NR

Shih <i>et al.</i> ⁵³	107	Adultos con M3	ITD: 22/107 (21%) D835: 20/107 (19%)	sin diferencias en la RC sin diferencias en la SG sin diferencias en la SLEv	NR
Stirewalt <i>et al.</i> ⁴⁸	140	LMA en ancianos >55 years	ITD: 47/140 (34%)	Sin diferencias en la RC Sin diferencias en la SLR Sin diferencias en la SG	La ITD no es un factor independiente de mal pronóstico para la SG y la SLR.
Boissel <i>et al.</i> ⁵⁴	159	LMA en adultos (No M3) <65 years	ITD: 40/159 (25%)	sin diferencias en la RC sin diferencias en la SLR sin diferencias en la SG	La ITD no es un factor independiente de mal pronóstico para la SG y la SLR
Moreno <i>et al.</i> ⁵⁵	166	LMA en adultos (No M3)	ITD: 28/166 (17%) D835: 16/166 (10%)	sin diferencias en la RC menor SLE (0.04) sin diferencias en la SLEv	NR
Kiyoi <i>et al.</i> ⁵⁸	201	LMA en adultos (No M3)	ITD: 46/201 (23%)	menor RC (0.005) menor SG (0.002) menor SLE (0.006)	Factor independiente de mal pronóstico solo en la SG de pacientes jóvenes (<60 años).
Yamamoto <i>et al.</i> ⁵⁴	201	LMA en adultos (No M3)	ITD: 46/201 (23%) D835: 8/201 (4%)	menor SG (0.004) menor SLE (0.023) sin diferencias en la SG Todos recayeron	NR
Fröhling <i>et al.</i> ⁵⁷	224	LMA en adultos- Citogenética normal. <60 años	ITD: 71/224 (32%) D835: 32/224 (14%)	menor SG (0.0004) menor duración de la remisión (0.03)	Factor independiente de mal pronóstico para la duración de la remisión y la SG
Zwaan <i>et al.</i> ⁵⁹	234	LMA en niños	ITD: 27/234 (11.5%)	menor RC (0.01) menor SG (0.037) menor SLE (0.09) menor SLEv (0.0046)	Factor independiente de mal pronóstico para la RR y la SLEv. Un elevado cociente entre número de copias mutadas vs no mutadas es factor pronóstico independiente.
Kottaridis <i>et al.</i> ⁴⁹	792	Adult <i>de novo</i> AML <60 years	ITD: 210/792 (27%)	menor RC (0.05) mayor RR (<0.001) menor SLE (<0.001) menor SG (<0.001) menor SLEv (<0.001)	Factor independiente de mal pronóstico para la RR, SLE, SG, y SFEv
Schnittger <i>et al.</i> ¹⁰	871	Adult <i>de novo</i> AML	ITD: 213/871 (25%)	sin diferencias en la RC sin diferencias en la OG menor SLEv (0.0072) sin diferencias en la SLE	La ITD no es un factor independiente de mal pronóstico para la SG, SLEv y SLE
Thiede <i>et al.</i> ¹²	979	LMA en adultos	ITD: 200/979 (20%) D835: 75/979 (8%)	sin diferencias en la RC menor SLE (0.03) mayor RR (0.008) menor SG (0.015)	ITD/ D835 no son factores independientes de mal pronóstico para la SG y SLE . Un elevado cociente entre número de copias mutadas vs no mutadas si es factor pronóstico independiente.
Chillón MC, Fernández C <i>et al.</i> ⁵⁸	113	LMA en adultos (No M3)	ITD+D835: 25/113 (22%)	sin diferencias en la RC sin diferencias en la SG sin diferencias en la SLE	NR
	60	M3	ITD+D835: 16/60 (27%)	sin diferencias en la RC sin diferencias en la SG sin diferencias en la SLE	

RC: remisión completa; **SG:** supervivencia global; **SLE:** supervivencia libre de enfermedad; **RR:** tasa de recaída; **SLEv:** supervivencia libre de eventos; **SLR:** supervivencia libre de recaída; **NR:** no realizado; **NS:** no significativo.

En cuanto al empleo de estas mutaciones para el estudio de Enfermedad Mínima Residual (EMR), estudios iniciales indicaron que la ITD podía ser empleada con éxito como marcador tumoral mediante el análisis de PCR cuantitativa en tiempo real ⁶⁶. Sin embargo, un trabajo reciente que analiza muestras pareadas del diagnóstico y de la recaída en 44 pacientes con LMA *de novo*, comprueba que numerosos casos en los que no estaba mutado el gen *FLT3* en el diagnóstico adquirieron la mutación en la recaída, o bien, casos que estaban mutados inicialmente no presentaban mutación en la recaída ³³. En este estudio además se describe un paciente que presentaba una ITD en *FLT3* en el diagnóstico que después recayó con otra ITD completamente distinta, la cual no hubiera sido detectada mediante el empleo de los cebadores específicos del diagnóstico, constituyendo por tanto un resultado falso negativo. Además, otro reciente trabajo que analiza también muestras pareadas del diagnóstico y de la recaída en 108 pacientes con LMA ⁶⁷, confirma estos hallazgos mostrando además que la incidencia de mutaciones es mayor en la recaída (media \pm DS: 40.5% \pm 4.8% vs 17.9% \pm 3.6%, $p < 0,001$). Por lo tanto, esta mutación es un marcador inestable que debe ser utilizado con cautela en la detección de EMR.

HIPÓTESIS de TRABAJO y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS de TRABAJO

La actividad desregulada de los receptores tirosina kinasa está implicada en la patogénesis molecular del cáncer, incluyendo las leucemias. Formas mutantes de KIT, ABL y PDGF-R conducen a la activación constitutiva del receptor y han sido identificados como causantes de hemopatías malignas específicas^{69, 70}.

Recientemente, a esta lista de receptores se sumó FLT3 perteneciente a la clase III de la familia de RTK. FLT3 cumple un papel importante en la diferenciación y proliferación de las células progenitoras de la médula ósea^{7, 8}.

En la actualidad, el gen *FLT3* es el más frecuentemente mutado en la LMA. Las dos mutaciones más características son la duplicación interna en tándem (ITD) en el exón 14 y mutaciones puntuales en el residuo aspartato 835 (D835). En ambos casos el resultado es un receptor con actividad catalítica constitutiva pudiendo contribuir a la progresión leucémica⁹.

La presencia de dichas alteraciones se han relacionado con características morfológicas de las LMA, siendo su mayor incidencia en la LPA. Por el contrario su posible correlación con otras alteraciones moleculares frecuentes en las LMA como la t(8;21), la inv (16) o alteraciones en 11q23 es menos conocida. En cuanto a la implicación de la ITD en el pronóstico existen datos contradictorios. La mayoría de los estudios clínicos han relacionado la presencia de esta mutación con características clínico-biológicas asociadas a mal pronóstico. Por el contrario, solo una minoría ha demostrado que su presencia se correlaciona de forma independiente con supervivencia global disminuída y además otros grupos, algunos con un número importante de pacientes, no han demostrado en estudios multivariantes que su presencia se asocia de forma independiente a mal pronóstico. Respecto de la D835 todavía no se ha podido conocer claramente su significado clínico dado a su baja frecuencia.

Teniendo en cuenta estos antecedentes los objetivos planteados son los siguientes:

2. OBJETIVOS

- Investigar la incidencia y distribución de las alteraciones moleculares ITD y D835 del gen *FLT3* en la LMA.
- Conocer la correlación de dichas mutaciones con las características clínico-biológicas en el momento del diagnóstico y con las alteraciones cromosómicas t(15;17), t(8;21) e inv (16).
- Evaluar el significado pronóstico de las alteraciones en el gen *FLT3* en la LMA .

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Pacientes

Se estudiaron un total de 173 LMAs “de novo” remitidas a la Unidad de Biología Molecular del Hospital Clínico Universitario de Salamanca (España). El diagnóstico de las LMA se estableció mediante estudios morfológicos y citoquímicos convencionales de acuerdo con los criterios de la clasificación FAB⁷¹. Así, la distribución morfológica de estos pacientes según dicha clasificación fue la siguiente: 9 MO, 23 M1, 33 M2, 51 M3, 18 M3v, 18 M4, 17 M5, 3 M6, 1 M7. Todas las muestras fueron analizadas retrospectivamente para la presencia de las mutaciones ITD y D835, respectivamente. En todos los pacientes también se estudió la presencia de los transcritos de fusión PML/RAR α , AML/ETO y CBF β /MYH11 correspondientes a las traslocaciones t(15;17), t(8;21) e inv(16), respectivamente.

Al diagnóstico, se recogieron los siguientes datos clínicos-biológicos: edad, sexo, leucocitos, plaquetas y hemoglobina (Hb) así como la LDH sérica y porcentaje de blastos en médula ósea (MO) y sangre periférica (SP).

En los pacientes que recibieron tratamiento con intención curativa se recogieron datos referentes al grado de respuesta así como el tiempo de supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en aquellos que alcanzaron remisión completa (RC). Para la valoración de la existencia de remisión completa hematológica se utilizaron los criterios de Cheson *et al*⁷²: reducción de las células leucémicas en MO a niveles inferiores al 5% con restauración de la función medular, normalización de las cifras en SP y retorno al estado general normal del paciente.

Para el estudio de supervivencia solo se tuvieron en cuenta los pacientes tratados con intención curativa según el Protocolo del Grupo Español PETHEMA para el tratamiento de las LMAs (AML-95 ó APL-96-99)^{73, 74}.

3.2. Preparación de muestras

Las muestras tumorales de SP, previamente desplaquetizadas mediante centrifugación, y de MO fueron sometidas a un choque hipotónico con cloruro amónico (0.155M NH₄Cl; 10mM HKCO₃; 0.1mM EDTA-Na pH 7.4) para lisar los hematíes durante 20 minutos a 4°C. El botón celular se recuperó posteriormente por centrifugación a 1500 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Los leucocitos así obtenidos se lavaron en una solución salina de Hanks' (GibcoBRL, Life Technologies) para eliminar restos celulares y cationes divalentes (Ca²⁺ y Mg²⁺) evitando así la actividad de las nucleasas, y posteriormente se precipitaron mediante centrifugación a 1500 r.p.m. durante 5 minutos.

3.3. Extracción de ARN total

El ARN total de las células se extrajo empleando una modificación del método de Chomiczynski, P. & Sacchi, N. (1987), utilizando una solución de fenol e isotiocinato de guanidino: TRIpure (Roche Diagnostics Corporation, USA). Los leucocitos obtenidos, a una concentración estimada de 5×10⁶ células/ml, se resuspendieron en 1ml de TRIpure hasta su completa homogenización. Posteriormente, el agregado de cloroformo (200µl) seguido de centrifugación durante 20 minutos a 12000 rpm, produjo la separación de dos fases. La fase acuosa sobrenadante contiene el ARN en solución. Tras la recuperación de la fase acuosa, el ARN se precipitó con isopropanol frío (500 µl) y se conservó a -20°C hasta el momento de su uso. Entonces, el ARN precipitado se aisló mediante centrifugación durante 20 minutos a 12000 r.p.m. a 4°C y posterior decantación del isopropanol. Tras un lavado final con etanol al 70% se dejó evaporar el etanol residual y el ARN se disolvió en agua bidestilada (ddH₂O).

La concentración del ARN obtenido se determinó mediante espectrofotometría. Tras medir su absorbancia a 260 nm en un contador automático de ADN/ARN (GeneQuant, Amersham Pharmacia Biotech, Europe GmbH) el cálculo se hizo siguiendo la fórmula:

$$\mu\text{g de ARN/ml} = \text{D.O.}_{260} \times \text{factor de dilución} \times 40$$

donde 40 es un factor de corrección introducido ya que una unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es el valor de absorbancia que tienen 40 µg de ARN.

Para comprobar el estado del ARN obtenido se realizó una electroforesis de 2 µg del ARN desnaturalizado con formaldehído en un minigel de agarosa al 1%. Si el ARN está íntegro se obtendrán dos bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S, respectivamente.

3.4. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La síntesis de ADNc se llevó a cabo según el protocolo propuesto en el proyecto europeo "BIOMED-1 Concerted Action" ⁷⁵. Para la reacción de transcripción inversa se empleó 1 µg de ARN total en un volumen final de 20 µl, utilizando como cebadores hexanucleótidos al azar (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y como transcriptasa inversa la enzima SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (GibcoBRL, Life Technologies).

El ARN disuelto en ddH₂O se incubó durante 10 minutos a 70°C para su desnaturalización. Posteriormente, se añadió la mezcla de reacción: tampón de transcripción inversa (20mM Tris HCl 50mM KCl, pH 8.3), 5mM MgCl₂, 10mM DTT, hexanucleótidos al azar (5µM de concentración final), inhibidor de ARNasas (20 U) (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1mM dNTPs (Promega Corporation, Madison, WI) y transcriptasa inversa (200 U). La reacción se mantuvo durante 10 minutos a temperatura ambiente (hibridación de los cebadores), después se incubó durante 45 minutos a 42°C (síntesis del ADNc), seguido de 3 minutos a 99°C (desnaturalización de la enzima) y 2 minutos a 4°C. Al producto de reacción se le añadió 30 µl de agua llevándolo a un volumen final de 50 µl. El ADNc se conservó a -20°C hasta su utilización.

Como control de calidad de la síntesis de ADNc se llevó a cabo la amplificación del gen Abelson (ABL), que se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos y se excluyeron del estudio todos aquellos ADNc que no amplificaron este gen. La

amplificación del gen ABL se realizó a partir de 5 µl de ADNc, con los cebadores sentido 5'GGCCAGTAGCATCTGACTTTG^{3'} y antisentido 5'ATGGTACCAGGAGTGTTTCTCC^{3'} según el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos seguida de 35 ciclos de PCR: 94°C durante 30 segundos (desnaturalización), 65°C durante 1 minuto (hibridación de los cebadores), 72°C durante 1 minuto (extensión de la cadena). Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa (Nusieve® 3:1, BMA, Rockland, ME, USA) al 2% con tampón TBE (0.17M Trizma base, 0.17M ácido bórico, 0.5M EDTA pH 4.8) utilizando el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (GibcoBRL, Life Technologies). Los geles teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) fueron visualizados con luz ultravioleta. El tamaño del fragmento correspondiente al gen ABL es de 300 pb.

3.5. Detección de mutaciones en el gen *FLT3*

El análisis de la presencia de la ITD se realizó mediante PCR cualitativa utilizando los cebadores R5 y R6 (tabla 2; figura 6) que cubren los dominios transmembrana y juxtamembrana de *FLT3*³². Un producto de 366pb corresponderá al alelo normal mientras que la presencia de la ITD generará un producto de ≥ 400 pb¹⁰.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados para la detección de las mutaciones ITD y D835.

cebadores	secuencia (5' - 3')	referencia
R5	TGTCGAGCAGTACTCTAAACA	Nakao <i>et al.</i> Leukemia 1996 ³²
R6	ATCCTAGTACCTTCCCAAATC	
17F	CCGCCAGGAACGTGCTTG	Yamamoto <i>et al.</i> Blood 2001 ³⁴
17RC	GCAGACGGGCATTGCCCC	Moreno <i>et al.</i> Haematologica 2003 ⁵⁵

La mutación puntual D835 se detectó mediante PCR cualitativa con los cebadores 17F y 17RC (tabla 2; figura 6) mediante amplificación del exón 20 del segundo dominio tirosina kinasa^{34, 55} y posterior digestión enzimática con EcoRV. La mutación puntual

elimina un sitio de restricción reconocido por la enzima por un cambio en la secuencia GATATC de los codones 835 y 836, resultando en un producto no digerido de 114pb correspondiente al alelo mutado mientras que dos productos de 68 y 46pb, respectivamente, corresponderán al alelo normal.

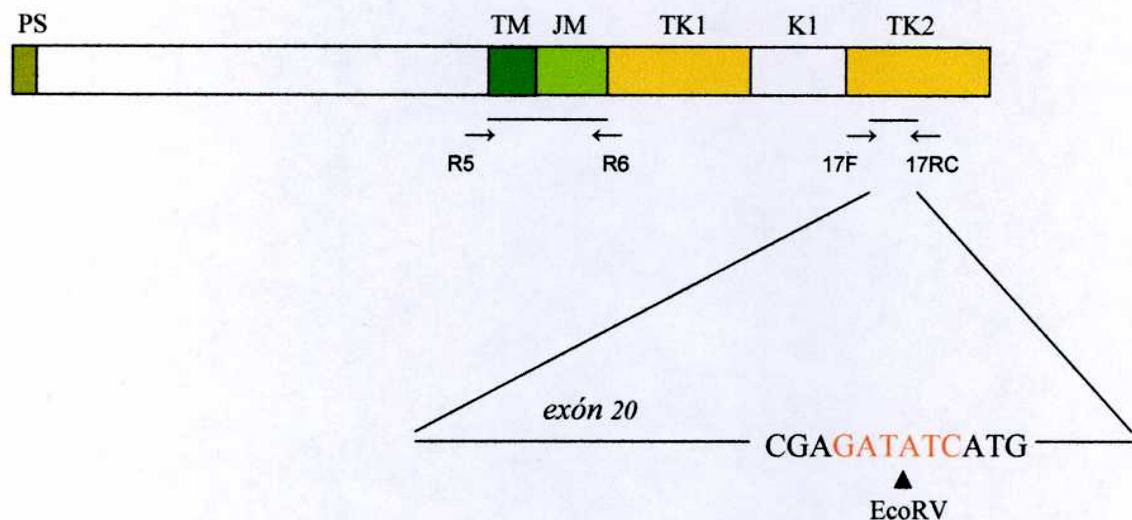


Figura 6. Representación esquemática del ADNc del gen *FLT3* con la posición de los cebadores utilizados en la reacción de PCR para detectar la ITD y la D835. PS (péptido señal), TM (dominio transmembrana), JM (dominio juxtamembrana), TK (dominio tirosina kinasa), K (dominio de unión de kinasas).

El protocolo de reacción de la PCR cualitativa fue el mismo para ambas mutaciones. Se emplearon 5 μ l de ADNc (0,1 μ g) en un volumen final de 50 μ l utilizando como mezcla de reacción tampón de PCR 1X, 0,6 μ M de cada cebador, 200 μ M de dNTP, (1,25 U) AmpliTaq Gold polimerasa (Applied Biosystems, USA), 2 mM de Cl₂Mg y agua para completar el volumen final de reacción. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial durante 10 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturalización), 1 minuto a 55°C (hibridación de los cebadores) y 1 minuto a 72°C (extensión de la cadena). Finalmente una extensión a 72°C durante 7 minutos. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador automático GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Posteriormente, para la detección de la mutación D835, los productos de PCR fueron sometidos a digestión enzimática con EcoRV a 37°C toda una noche según el siguiente protocolo: 22 µl de producto de PCR, 2,5 µl de SuRe/Cut Buffer B (Roche Diagnostics Corporation, USA) y 0,5 µl (5 U) de EcoRV (Roche Diagnostics Corporation, USA).

Los resultados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Nusieve® 3:1, BMA, Rockland, ME, USA) al 1,5% ó 3% (para la ITD y D835, respectivamente) con tampón TBE (0.17M Trizma base, 0.17M ácido bórico, 0.5M EDTA pH 4.8), utilizando el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (GibcoBRL, Life Technologies). Los geles teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) fueron visualizados con luz ultravioleta.

3.6. Detección de los transcritos de fusión PML/RAR α , AML/ETO y CBF β /MYH11.

La presencia de los transcritos de fusión PML/RAR α , AML/ETO y CBF β /MYH11 correspondientes a las traslocaciones t(15;17), t(8;21) e inv(16) respectivamente, fue analizada mediante RT-PCR cualitativa utilizando los cebadores, protocolos y criterios del proyecto europeo “BIOMED-1 Concerted Action”⁷⁵.

En la tabla 3 se muestra el protocolo común de PCR resultado de la estandarización del proyecto europeo “BIOMED-1 Concerted Action” y que se ha utilizado para la detección de las alteraciones cromosómicas t(15;17), t(8;21) e inv (16). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador automático GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Los resultados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Nusieve® 3:1, BMA, Rockland, ME, USA) al 2% con tampón TBE (0.17M Trizma base, 0.17M ácido bórico, 0.5M EDTA pH 4.8), utilizando el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (GibcoBRL, Life Technologies). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y visualizados con luz ultravioleta.

Tabla 3. Protocolo estandarizado de PCR.

<p>1. PCR sencilla o primera ronda de una PCR “nested”</p> <ul style="list-style-type: none"> • Volumen final: 50 μl • 5 μl de ADNc (0,1 μg) • cebadores: 400 nM de concentración final • dNTP: 200 μM de concentración final • tampón de PCR: 20mM Tris HCl, 50mM KCl, pH 8.3 • MgCl₂: 1.5-2.5mM (depende de cada transcrito) • enzima AmpliTaq Gold polimerasa (Perkin Elmer, Applied Biosystems): 1U
<p>2. Programa de PCR: temperaturas, tiempos y ciclos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • desnaturalización inicial: 95°C durante 10 minutos • 35 ciclos de PCR: <ul style="list-style-type: none"> 94°C durante 30 segundos (desnaturalización) 65°C durante 1 minuto (hibridación de los cebadores) 72°C durante 1 minuto (extensión de la cadena) No necesita extensión final.
<p>3. Segunda ronda de una “nested”:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2,5 μl del producto de la primera PCR • mismo volumen final, reactivos y programa que para la primera PCR

Como controles positivos se utilizaron líneas celulares que contienen específicamente cada una de las translocaciones cromosómicas estudiadas. En el presente trabajo se emplearon las siguientes líneas: NB4 (transcrito *PML-RAR α* tipo bcr1), ME-1 (transcrito *CBF β -MYH11* tipo A) y KASUMI-1 (transcrito *AML1-ETO*). Además, se

utilizaron células de pacientes al diagnóstico que eran positivos para el resto de transcritos en los casos de t(15;17) (transcrito tipo bcr-2 y bcr-3) e inv(16) (transcrito tipo D y C). Como controles negativos comunes se utilizaron células tanto de la línea celular HL60, con morfología M2 sin t(15;17) pero con un bloqueo en la diferenciación en el estadio de promielocito ⁷⁶, como de donantes sanos.

3.7. Análisis estadístico

Los datos fueron introducidos en la base de datos Filemaker Pro 4.1 y posteriormente analizados mediante el programa estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

La asociación entre las variables cualitativas se estudió mediante el test Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher cuando estaban indicadas. Las diferentes características clínicas y biológicas fueron consideradas individualmente para estudiar su correlación con las mutaciones ITD y D835, respectivamente.

Las probabilidades de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE) se estimaron de acuerdo con el método de Kaplan-Meier (Kaplan & Meier, 1958). La SG se valoró a partir del momento del diagnóstico hasta el fallecimiento del enfermo o la fecha del último seguimiento, y la SLE se calculó desde la fecha de la remisión completa hasta la fecha de la recaída o muerte.

Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando se observaron valores de p inferiores a 0.05

RESULTADOS

4.1. Detección de los transcritos de fusión

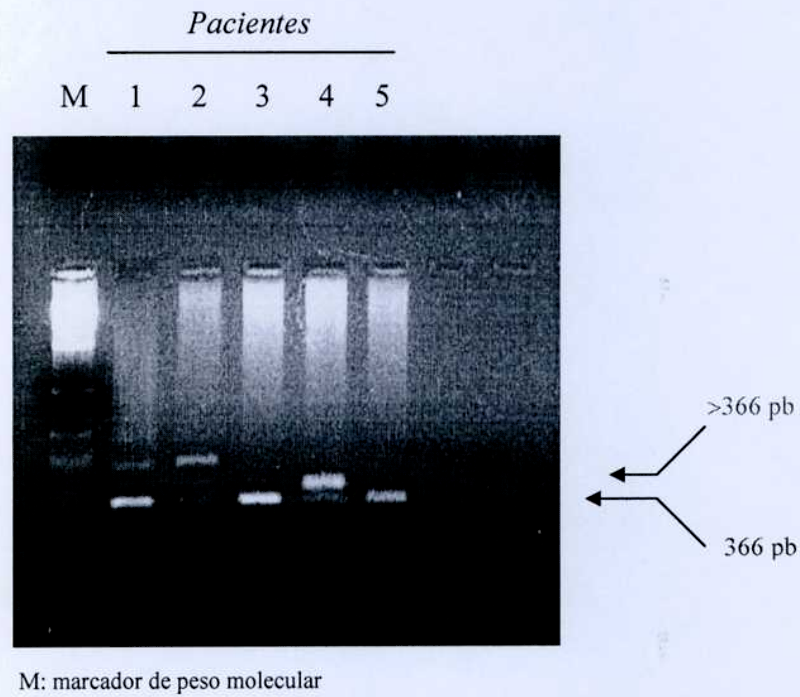
De los 173 pacientes incluidos en el presente estudio, 60 presentaban la traslocación t(15;17), 7 la inv(16) y 2 la t(8;21), en tanto que en el resto de los pacientes (n=104) no se detectó ninguna de dichas alteraciones moleculares.

4.2. Detección de mutaciones en el gen *FLT3*

La ITD fue detectada en 34 de los 173 (20%) pacientes estudiados (figura 7). La frecuencia de la ITD varió significativamente entre los subgrupos moleculares ($p < 0,05$): de los 60 pacientes con t(15;17), 15 (25%) presentaban la ITD (8 con morfología M3 clásica y 7 con morfología M3 variante). En contraste, la ITD estuvo ausente en los pacientes con t(8;21) ó inv(16). En los 104 pacientes que no presentaban ninguna de las traslocaciones antes mencionadas, 19 (18%) fueron positivos para la ITD. Por otro lado, solo en uno de los 173 pacientes (0,6%) la mutación afectó ambos alelos.

La mutación D835 pudo ser estudiada en 135 de los 173 pacientes (para el resto de los 38 pacientes no hubo muestra suficiente para el estudio de esta mutación) y solo en 7 casos (5%) se detectó la mutación (figura 8). Además uno fue positivo para la t(15;17) con morfología M3 variante mientras que los 6 restantes no presentaron ninguno de los transcritos de fusión analizados. Por otro lado, ninguno de los pacientes estudiados portó ambas mutaciones: ITD y D835.

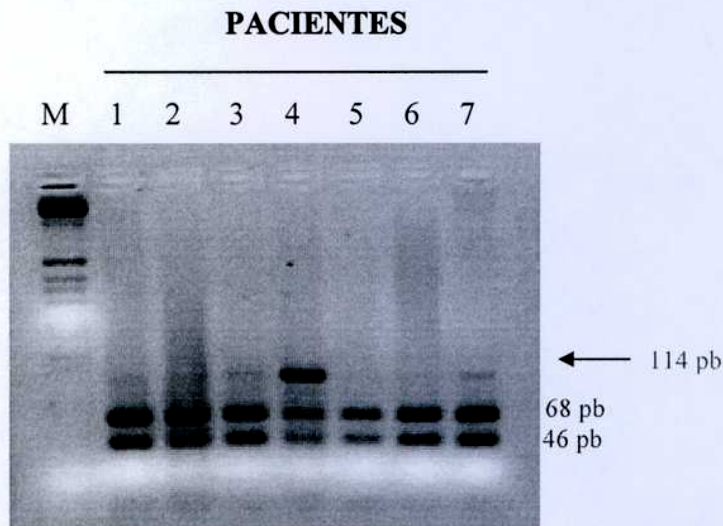
Figura 7: Detección de la ITD. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos en pacientes mutados y normales.



Los pacientes normales presentan una única banda de 366 pb (pacientes 3 y 5) correspondiente al alelo normal.

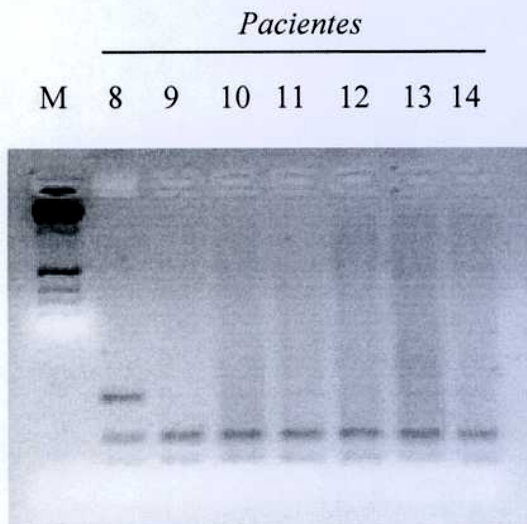
Los pacientes con ITD presentan dos bandas: una de 366 pb del alelo normal y otra de mayor tamaño correspondiente al alelo mutado (pacientes 1, 2 y 4).

Figura 8: Detección de la mutación D835.



M: marcador de peso molecular

Electroforesis en gel de agarosa en la que se observan los diferentes fragmentos obtenidos tras la digestión con EcoRV (68 pb y 46 pb) correspondientes al alelo normal. El fragmento no digerido de 114pb corresponde al alelo mutado.



Los pacientes mutados presentan los tres fragmentos (pacientes 3, 4, 7 y 8).

Tabla 4: Características clínico-biológicas al diagnóstico de los pacientes con LMA según el estado de *FLT3* y la presencia o ausencia de la t(15;17).

Características	No-LPA/t(15;17) negativo n=113			LPA/t(15;17) positivo n=60		
	<i>FLT3</i> NO MUTADO n=88	<i>FLT3</i> Mutado n=25	P	<i>FLT3</i> NO MUTADO n=44	<i>FLT3</i> Mutado n=16	P
Edad (MEDIA ± DS)	59±20	60±18	NS	46±21	34±12	0.008
Sexo masculino (%)	54	48	NS	73	69	NS
Leucocitos (×10⁹/L)	28±50	66±55	0.003	9.6±18	42±51	0.023
Blastos en MO (%)	67±21	81±13	0.0001	79±16	86±11	NS
Blastos en SP (%)	40±30	63±30	0.001	36±32	74±22	0.0001
LDH (U/L)	895±762	1346±747	0.018	674±380	964±384	0.023
Plaquetas (×10⁹/L)	70±61	65±62	NS	40±40	20±12	0.005
Hemoglobina (g/dL)	8.9±2.4	9.6±2.5	NS	8.7±2.3	9.0±2.3	NS
Subtipo según FAB						
M0	9 (10%)	0				
M1	15 (16%)	8 (32%)				
M2	23 (25%)	10 (40%)				
M3c	4 (4%)	0		39 (89%)	8 (50%)	
M3v	4 (4%)	1(4%)	NS	5 (11%)	8 (50%)	0.001
M4	17 (19%)	1(4%)				
M5	12 (13%)	5(20%)				
M6	3 (3%)	0				
M7	1 (1%)	0				
Isoformas-PML-RARA						
Bcr1				31	4	
Bcr2				4	1	
Bcr3				9	11	0.002

MO: médula ósea; SP: sangre periférica; LDH: lactato deshidrogenasa; LPA: Leucemia Promielocítica Aguda; NS: no significativo.

4.3. Estado de *FLT3* y características leucémicas

Dado las diferentes características clínicas y pronósticas existentes entre los pacientes que portan la t(15;17) de los que no la poseen, los casos fueron analizados separadamente a fin de evaluar la evolución clínica del paciente en relación a la presencia de las mutaciones en *FLT3*: pacientes con LPA y t(15;17) (n=60) y pacientes con LMA diferente a LPA sin t(15;17) (n=113).

El análisis estadístico demostró que en los pacientes estudiados la mutación D835 no confirió características distintas o un curso clínico más agresivo respecto de la ITD, coincidiendo con lo descrito en otros estudios^{40, 51}. Por esta razón los 7 casos positivos para D835 fueron incluidos para su análisis con los casos que resultaron positivos para la ITD.

En los casos de LMA no LPA, la presencia de ITD/D835 se correlacionó con una mayor leucocitosis (p=0,003), alto porcentaje de blastos en médula ósea (p=0,0001) y sangre periférica (p=0,001) y altos niveles de LDH sérica (p=0,018). Por el contrario, no tuvo correlación con la edad, hemoglobina, número de plaquetas o morfología según clasificación FAB (Tabla 4).

En los casos de LPA las mutaciones en el gen *FLT3* se correlacionaron con pacientes jóvenes (p=0,008), elevada leucocitosis (p=0,023), elevado porcentaje de blastos en sangre periférica (p=0,0001), altos niveles de LDH (p=0,023), trombopenia (p=0,005) y morfología M3 variante (61,5% vs 17%, p=0,001). Las mutaciones en *FLT3* también se correlacionaron con la isoforma corta del gen de fusión PML-RAR α (bcr3) (bcr3: 69%; bcr1: 25%; bcr2: 6%, p=0,002) (tabla 4).

La relación entre la presencia o ausencia de ITD/D835 y la evolución clínica del paciente se muestra en la Tabla 5. En el grupo de las LMA no LPA la tasa de RC fue ligeramente menor en aquellos pacientes con mutaciones en el gen *FLT3* (50% vs 68%), aunque este hallazgo no fue estadísticamente significativo. Además, analizando la SG y la SLE con un seguimiento de 5 años, la evolución de los pacientes con o sin mutación fue similar (SG: 19% vs 16%, SLE: 36% vs 29%, p>0,05 para ambos) (figuras 9 a y b).

Del mismo modo, en los pacientes con LPA, las mutaciones en FLT3 no se asociaron a peor pronóstico y las tasas de RC (88% vs 72%, $p>0,05$), SG (65% vs 53% a los 5 años, $p>0,05$) y SLE (79% vs 68% a los cinco años, $p>0,05$) fue similar entre los pacientes con o sin mutaciones en FLT3, respectivamente (figuras 10a y b). Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando se observaron valores de p inferiores a 0.05

Tabla 5. Evolución clínica de los pacientes con LMA conforme al estado de FLT3.

Características	t(15;17) negativo n=113			t(15;17) positivo n=60		
	FLT3 No Mutado n=88	FLT3 Mutado n=25	P	FLT3 No Mutado n=44	FLT3 Mutado n=16	P
Tasa de RC (%)	50/73 (68%)	11/22 (50%)	NS	31/43 (72%)	14/16 (88%)	NS
Fracaso terapéutico	13.7%	31.8%	NS	4.7%	0%	NS
Muertes precoces	17.8%	18.2%	NS	23.3%	12.5%	NS
SG a los 5 años	16%	19%		53%	65%	
mediana (años)	0.9	0.46	NS	NR	NR	NS
muertes	59	15		17	5	
SLE a los 5 años	29%	36%		68%	79%	
mediana (años)	1.4	3.4	NS	NR	NR	NS
Recaidas	27	6		7	3	

RC: remisión completa; SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de enfermedad; NS: no significativo; NR: sin recaída.

4.4 Resultados del análisis de supervivencia con el método Kaplan-Meier conforme al estado de *FLT3*.

Figura 9a. SG de los pacientes con LMA no-LPA/ t(15;17) negativos.

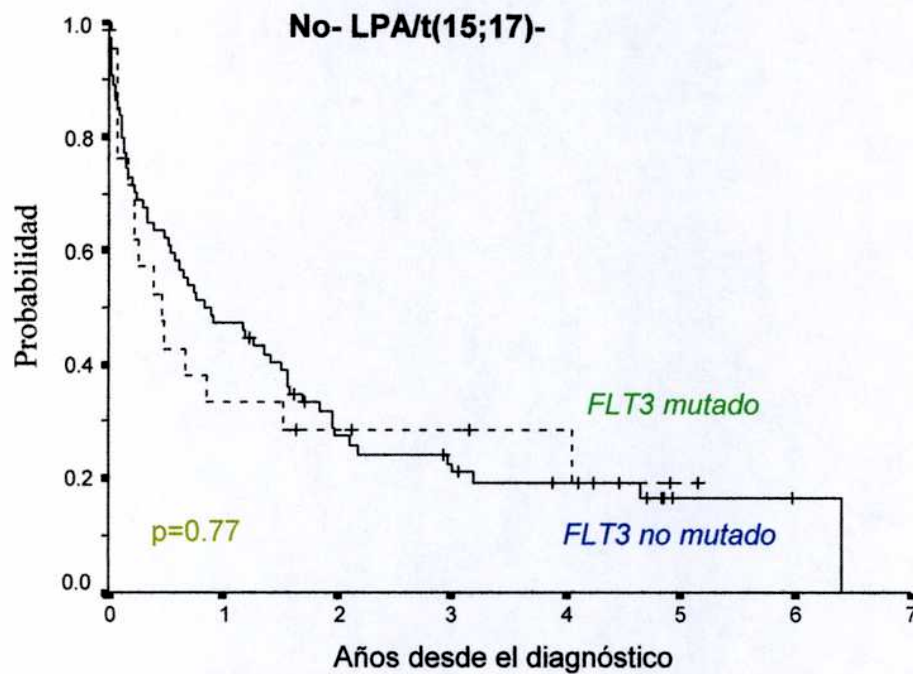


Figura 9 b. SLE de los pacientes con LMA no-LPA/ t(15;17) negativos que alcanzaron RC.

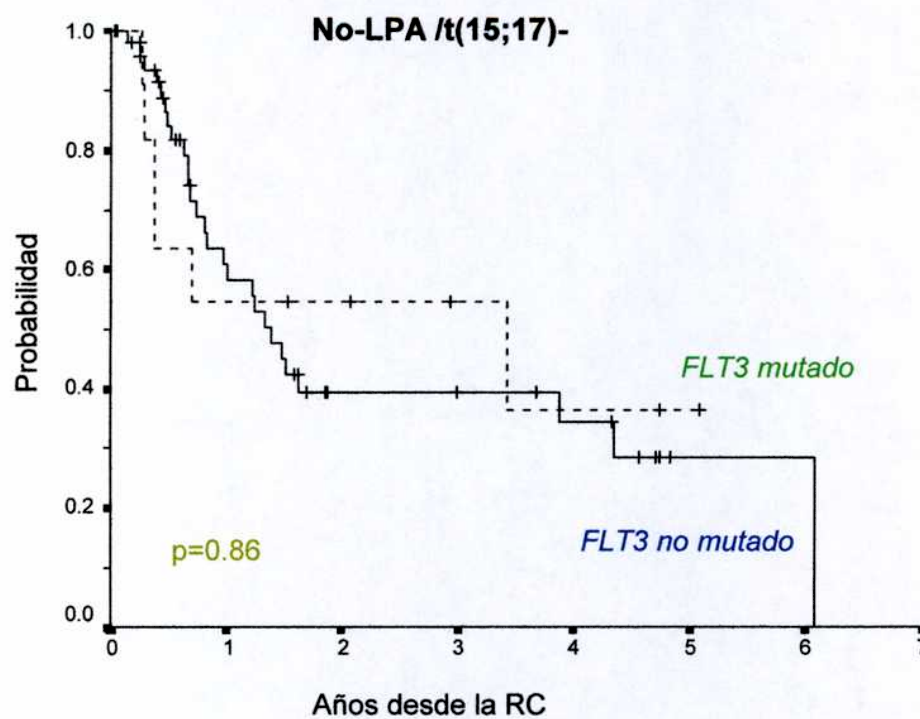


Figura 10a. SG de los pacientes con LPA y t(15;17).

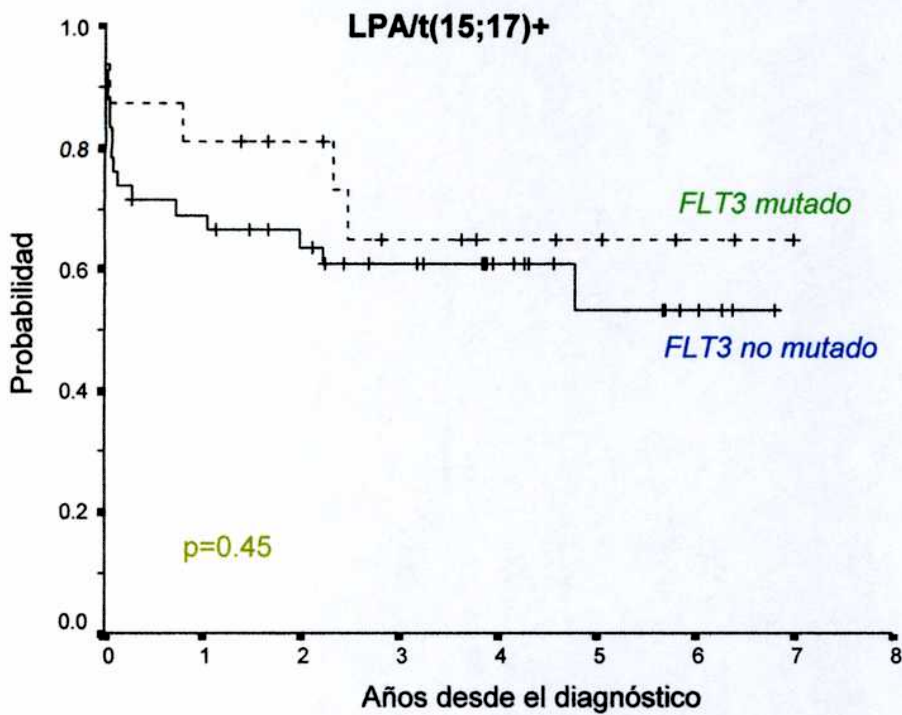
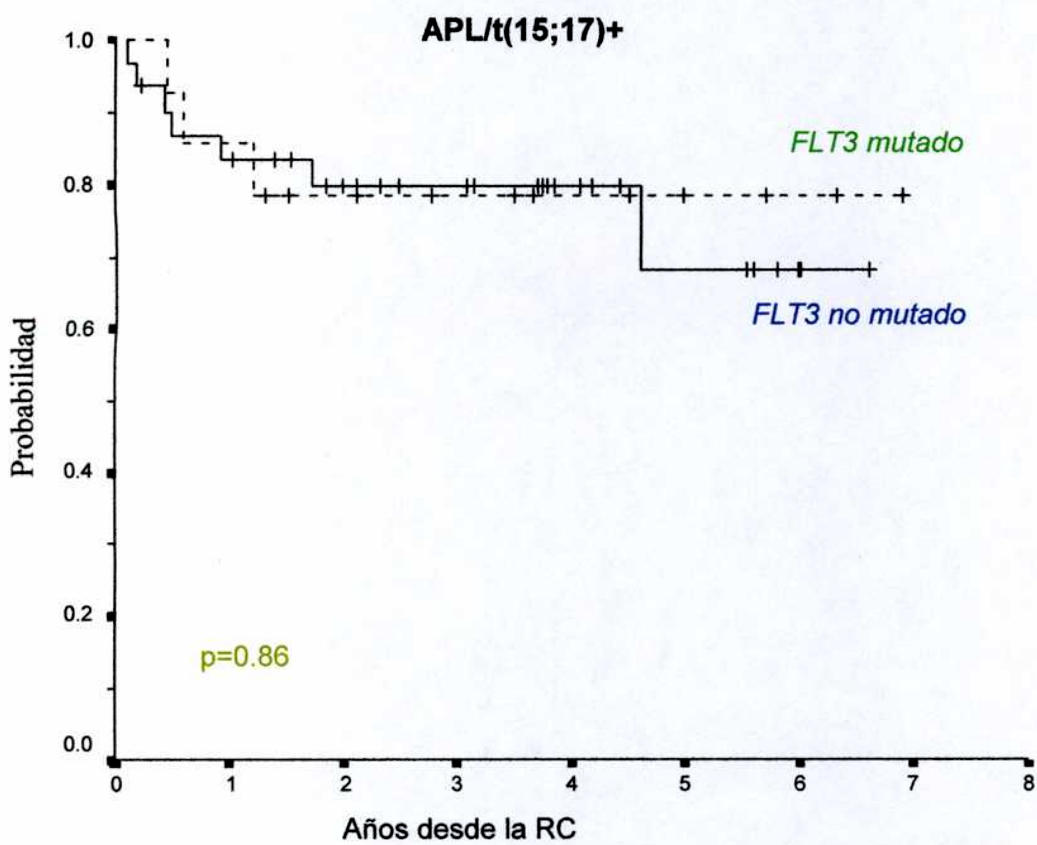


Figura 10b. SLE de los pacientes con LPA y t(15;17) que alcanzaron RC.



DISCUSIÓN

La incidencia de las mutaciones ITD y D835 en el gen *FLT3* observada en nuestro estudio (20 y 5% respectivamente) es similar a la encontrada en estudios previos en pacientes adultos con LMA (tabla 1-Introducción). Por otro lado, al igual que en la mayoría de los casos publicados, en ninguno de los pacientes estudiados se detectó ambas mutaciones.

Interesantemente, la frecuencia de la ITD fue significativamente diferente entre los subgrupos moleculares de las LMA, siendo más frecuente (25%) en los pacientes con t(15;17) y morfología M3 variante (61,5%: 8/13). Esta asociación entre la ITD y el tipo de morfología en las LPA también ha sido encontrada con una incidencia similar por otros grupos investigadores^{10, 52} si bien su efecto biológico todavía permanece sin dilucidar.

En los pacientes negativos para las alteraciones cromosómicas estudiadas, la frecuencia de las mutaciones en *FLT3* fue del 24%. En contraste, en ninguno de los pacientes con t(8;21) ó inv(16) se detectó la ITD o la mutación puntual D835. Una baja incidencia en estos subgrupos moleculares también ha sido descrita por otros grupos^{10,54}

En cuanto a las implicaciones biológicas de las mutaciones en el gen *FLT3*, al igual que la mayoría de los trabajos publicados, confirmamos la asociación de tales mutaciones con variables con importancia como factor pronóstico adverso en las LMA: leucocitosis, elevado porcentaje de blastos en médula ósea (solo en casos no M3) y sangre periférica además de niveles de LDH incrementado (tabla 4). Sin embargo, no encontramos asociación entre las mutaciones en *FLT3* con menor supervivencia global ó supervivencia libre de enfermedad (tabla 5). La Tabla 1 (Introducción) resume 19 diferentes estudios (incluido el presente) en los cuales se estudió el valor pronóstico de las alteraciones en *FLT3*. Varios estudios demuestran que la ITD confiere peor pronóstico en pacientes adultos con LMA, principalmente en los menores de 60 años^{9, 12, 49, 57, 58}. Resultados similares se obtuvieron en estudios con niños en los cuales la ITD se asocia con baja tasas de RC y menor supervivencia^{47, 59, 60, 61}. Sin embargo, existen datos discordantes respecto al valor de las mutaciones ITD/D835 como factor pronóstico independiente. En este sentido, si bien 7 de los 11 estudios en los que se realizaron análisis multivariante la presencia de la ITD fue un factor independiente de

mal pronóstico, los cuatro restantes, dentro de los cuales se encuentran los de mayor número de casos estudiados ^{10, 12}, mostraron que este parámetro carece de valor pronóstico negativo independiente. Así, el estudio que incluye un mayor número de LMA de nuevo diagnóstico (n: 871) no encontró diferencias significativas en la tasa de RC y SG en aquellos pacientes con alteraciones en *FLT3* que fueron incluidos dentro del grupo de pacientes de riesgo intermedio ¹⁰. Por otra parte, dentro de las series que demuestran un valor independiente, una de ellas incluye un elevado número de LPA (159 de 854) con ITD positiva (36% de las mismas) ⁴⁹. Esto contradice los resultados obtenidos por otros grupos quienes no encontraron significado pronóstico a la ITD en pacientes con LPA, puesto que este tipo de leucemia se asocia con larga supervivencia ^{50, 52, 53}. Además, en pacientes de edad avanzada (> 60 años), no se encontró asociación entre mutaciones en el gen *FLT3* y peor evolución clínica puesto que la tasa de RC y supervivencia no se vieron afectadas ^{48, 62}. De cualquier forma, un reciente estudio aporta una posible explicación para estos resultados aparentemente contradictorios. Thiede y colaboradores ¹² encontraron que la presencia de la ITD no es un factor pronóstico independiente, pero, por el contrario, cuando cuantifican el número de alelos mutados en pacientes con ITD observan que una relación alta entre alelos mutados y no mutados sí es factor pronóstico en el análisis multivariante. Así pues, la cuantificación en lugar de la detección cualitativa de las alteraciones en *FLT3* podrían tener mayor significado pronóstico.

En resumen, los estudios realizados muestran datos discordantes respecto de las implicaciones en el pronóstico de las mutaciones en *FLT3* y por lo tanto todavía no se ha podido conocer claramente el significado clínico de la mutación ITD y menos aún el de la D835 dado a su baja frecuencia. Algunas de las discrepancias existentes podrían ser en parte explicadas por la diferencia en los esquemas de tratamiento utilizados o por la diversidad biológica de las leucemias incluidas en los estudios realizados ⁷⁷. En este sentido, es interesante la aportación de un estudio que será publicado en *Blood* que indica la existencia de heterogeneidad en la expresión de determinados genes incluso dentro de las LMA ITD positivas. Así la sobre- expresión del gen *RUNX3* y la infra- expresión del gen *ATRX* se asocia a un curso clínico desfavorable y su ratio permite separar tres grupos pronósticos significativamente diferentes. Este trabajo muestra pues, la heterogeneidad pronóstica de las LMA ITD positivas y explicaría, al menos en parte, los resultados contradictorios existentes.

CONCLUSIONES

- La incidencia de las mutaciones ITD y D835 en el gen *FLT3* observada en nuestro estudio, 20% y 5% respectivamente, es similar a la encontrada en estudios previos.
- La frecuencia de la ITD fue significativamente diferente entre los subgrupos moleculares de las LMA, siendo mayor en los pacientes con t(15;17) y morfología M3 variante (61,5% de los casos) frente al 20% de la serie global.
- En los pacientes que carecían de traslocaciones cromosómicas recurrentes, la frecuencia de la mutación en *FLT3* fue alta (24%) en contraste con los pacientes portadores de la t(8;21) ó la inv(16), en los cuales no se detectó la ITD o la mutación puntual D835.
- La presencia de mutaciones en el gen *FLT3* se asoció de forma significativa con características clínico-biológicas de mal pronóstico.
- La presencia de mutaciones en *FLT3* no supuso un factor pronóstico desfavorable en nuestros pacientes.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ABL	gen Abelson
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
ARN	Acido ribonucleico
DTK2	Segundo dominio tirosina kinasa
D835	Mutación puntual en el codón 835 (sust del ac aspártico por tirosina)
FLT3-L	Ligando de FLT3
ITD	Duplicación interna en tándem
JM	Dominio jxtamembrana
LDH	Lactato deshidrogenasa
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LPA	Leucemia promielocítica aguda
MO	Médula ósea
RTK	Receptor tirosina kinasa
RC	Remisión completa
SMD	Síndrome mielodisplásico
SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SP	Sangre periférica

Referencias

1. Rosnet O, Marchetti S, de Lapeyriere O, Birnbaum D. *Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family.* Oncogene 1991; **6**:1641.
2. Mathews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR. *A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations.* Cell 1991; **65**:1143.
3. Rosnet O, Mattei MG, Marchetto S, Birnbaum D. *Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene.* Genomics 1991; **9**:380.
4. Rosnet O et al. *Close physical linkage of the FLT1 and FLT3 genes on chromosome 13 in man and chromosome 5 in mouse.* Oncogene 1993; **8**:173.
5. Agnes F, Shamon B, Dina C, Rosnet O, Birnbaum D, Galibert F. *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.
6. Rosnet O, Birnbaum D. *Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases.* Crit Rev Oncog 1993; **4**:595.
7. Small D, Levenstein M, Kin E, Carrow C, Amin S, Lockwell P, Civin C. *STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells.* Proc Natl Acad Sci USA 1994; **91**:459.
8. Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ, Tonnellet C, Toiron Y, Birnbaum D. *Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells.* Blood 1993; **82**:1110.
9. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrozek K, Vardiman JW, George SL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD, Caligiuri MA. *Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study.* Cancer Research 2001; **61**: 7233.
10. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Loffler H, Sauerland CM, Serve H, Buchner T, Haferlach T, Hiddemann W. *Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease.* Blood 2002; **100**: 59.
11. Yokota S, et al. *Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines.* Leukemia 1997; **11**:1605.
12. Thiede C, et al. *Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis.* Blood 2002; **99**:4326.
13. Yamamoto Y, et al. *Activating mutation D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies.* Blood 2001; **97**:2434.
14. Brasel K, Escobar S, Anderberg R, de Vries P, Gruss HJ, Lyman SD. *Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells.* Leukemia 1995; **9**:1212.

15. Turner AM, Lin NL, Issarachai S, Lyman SD, Broudy VC. *FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells.* Blood 1996; **88**:3383.
16. Lyman SD, Jacobsen SE. *c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities.* Blood 1998; **91**:1101.
17. Rosnet O, Buhning HJ, Marchetto S. *Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells.* Leukemia 1996; **10**:238.
18. Drexler HG. *Expresión of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leudemic cells.* Leukemia 1996; **10**:588.
19. Gabbianelli M, et al. *Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors.* Blood 1995; **86**:1661.
20. Rusten LS, Lyman SD, Veiby O, Jacobsem SE. *The FLT ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro.* Blood 1996; **87**:1317.
21. Shah AJ, Smogorzewska EM, Hannum C, Crooks GM. *Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+CD38+ cells and maintains progenitor cells in vitro.* Blood 1996; **87**: 3563.
22. Ray RJ, Paige CJ, Furlonger C, Lyman SD, Rottapel R. *Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7.* Eur. J. Immunol. 1996; **26**: 1504
23. Lyman SD, James L, Vanden Bos T. *Molecular cloning of a ligand for the flt3/flt2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells.* Cell 1993; **75**:1157.
24. Hannum C, Culpepper J, Campbell D, et al. *Ligand for FLT3/FLT2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs.* Nature 1994; **368**:643.
25. Rasko JE, Metcalf D, Rossner MT, Nicola NA. *The flt3/flt2 ligand: receptor distribution and action on murine haemopoietic cell survival and proliferation.* Leukemia 1995; **9**:2058.
26. Sonoda Y, Kimura T, SakabeH, et al. *Human FLT3 ligand acts on myeloid as web as multipotential progenitors derived from purified CD34+ blood progenitors expressing different levels of c-kit protein.* Eur J Haematol 1997; **58**:257.
27. Piacibello W, Fubini L, Sanavio F, et al. *Effects of human FLT3 ligand on myeloid leukemia cell growth: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors.* Blood 1995; **86**:4105.
28. Gonfloni S, Weijland A, Surperti-Furga G. *Crosstalk between the catalytic and regulatory domains allows bi-directional regulation of Src.* Nature Struct. Biol. 2000; **7**:281.
29. Lyman SD, et al. *Plasma/serum levels of flt3 ligand are low in normal individuals and highly elevated in patients with Fanconi anemia and acquired aplastic anemia.* Blood 1995; **86**:4091.
30. Lyman SD. *Biology of flt3 ligand and receptor.* Int J Hematol 1995; **62**:63.
31. Stirewalt DL and Radich JP. *The role of FLT3 in haematopoietic malignancies.* Nature Reviews Cancer 2003; **3**:650.
32. Nakao M, et al. *Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia.* Leukemia 1996; **10**:1911.

33. Kottaridis PD, Rosemary EG, Gale SE, et al. *Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors.* Blood 2002; **100**:2393.
34. Yamamoto Y, et al. *Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies.* Blood 2001; **97**:2434.
35. Spiekermann K, et al. *A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia.* Blood 2002; **100**:3423.
36. Kiyoi H, Ohno R, VedeR, Saito H, Naoe T. *Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain.* Oncogene 2002; **21**:2555.
37. Tse KF, Mukherjee G, Small D. *Constitutive activation of Flt3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation.* Leukemia 2000; **14**:1766.
38. Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, et al. *Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product.* Leukemia 1998; **12**:1333.
39. Lisovsky M, Estrov Z, et al. *Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax.* Blood 1996; **88**:3987.
40. Abu-Duhier FM, et al. *Identification of a novel FLT3 Asp835 mutation in adult acute myeloid leukaemia.* Br J Haematol 2001; **113**:983.
41. Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito h, Naoe T. *Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the Juxtamembrane domain.* Oncogene 2002; **21**:2555.
42. Gille H, et al. *A repressor séquence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase activation and endothelial cell migration.* EMBO J 2000; **19**:4064.
43. Morley GM, Uden M, Gullick WJ, Dibb NJ. *Cell specific transformation by c-fms activating loop mutations is attributable to constitutive receptor degradation.* Oncogene 1999; **18**:3076.
44. Moriyama Y, et al. *Role of aspartic acid 814 in the function and expresión of c-kit receptor tyrosine kinase.* J. Biol. Chem. 1996; **271**:3347.
45. Horiike S, et al. *Tandem duplications of the FLT3 recptor gene are associated with leukemic trasnformation of myelodysplasia.* Leukemia 1997; **11**:1442.
46. Birg F, Courcoul M, Rosnet O, et al. *Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages.* Blood 1992; **80**:2584.
47. Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, et al. *Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia.* Blood 2001; **97**:89.
48. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, et al. *FLT3, RAS and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia.* Blood 2001; **97**:3589.
49. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. *The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients*

- from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; **98**: 1752.
50. Kainz B, Heintel D, Marculescu R, Schwarzinger I, Sperr W, Le T, Weltermann A, Fonatsch C, Haas OA, Mannhalter C, Lechner K, Jaeger U. *Variable prognostic value of FLT3 internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv(16)*. *The Hematology Journal* 2002; **3**: 283.
 51. Sheikhha MH, Awan A, Tobal K, Liu Yin JA: *Prognostic significance of FLT3 ITD and D835 mutations in AML patients*. *The Hematology Journal* 2003;**4**: 41.
 52. Noguera NI, Breccia M, Divona M, Diverio D, Costa V, De Santis S, Avvisati G, Pinazzi MB, Petti MC, Mandelli F, Lo CF. *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.
 53. Shih LY, Kuo MC, Liang DC, Huang CF, Lin TL, Wu JH, Wang PN, Dunn P, Lai CL. *Internal tandem duplication and Asp835 mutations of the FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) gene in acute promyelocytic leukemia*. *Cancer* 2003; **98**: 1206.
 54. Boissel N, Cayuela JM, Preudhomme C, Thomas X, Grardel N, Fund X, Tigaud I, Raffoux E, Rousselot P, Sigaux F, Degos L, Castaigne S, Fenaux P, Dombret H. *Prognostic significance of FLT3 internal tandem repeat in patients with de novo acute myeloid leukemia treated with reinforced courses of chemotherapy*. *Leukemia* 2002; **16**: 1699.
 55. Moreno I, Martin G, Bolufer P, Barragan E, Rueda E, Roman J, Fernandez P, Leon P, Mena A, Cervera J, Torres A, Sanz MA. *Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia*. *Haematologica* 2003; **88**: 19.
 56. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll Aj *et al*. *Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study*. *Cancer Research* 2001; **61**: 7233.
 57. Frohling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, Dohner K. *Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm*. *Blood* 2002; **100**: 4372.
 58. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, Ueda R. *Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia*. *Blood* 1999; **93**: 3074.
 59. Zwaan CM, Meshinchi S, Radich JP, Veerman AJ, Huismans DR, Munske L, Podleschny M, Hahlen K, Pieters R, Zimmermann M, Reinhardt D, Harbott J, Creutzig U, Kaspers GJ, Griesinger F. *FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance*. *Blood* 2003; **102**: 2387.
 60. Iwai T *et al*. *Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan*. *Leukemia* 1999; **13**: 38.

61. Kondo M, Horibe K, Takahashi Y, Matsumoto K, Fukuda M, Inaba J *et al*. Prognostic value of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myelogenous leukemia: *Med Pediatr Oncol* 1999; **33**: 525.
62. Gilliland G, Griffin JD. *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia*. *Blood* 2002; **100**: 1532.
63. Rombouts WJ, Blokland I, Lowenberg B, Ploemacher RE. *Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene*. *Leukemia* 2000; **14**: 675.
64. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Rees DC, Vandenberghe EA, Winship PR, Reilly JT. *FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group*. *British Journal of Haematology* 2000; **111**: 190.
65. Haferlach T, Schoch C, Schnittger S, Kern W, Loffler H, Hiddemann W. *Distinct genetic patterns can be identified in acute monoblastic and acute monocytic leukaemia (FAB AML M5a and M5b): a study of 124 patients*. *Br J Haematol* 2002; **118**: 426.
66. Stirewalt DL, Willman CL, Radich JP. *Quantitative, real-time polymerase chain reactions for FLT3 internal tandem duplications are highly sensitive and specific*. *Leuk Res* 2001; **25**: 1085.
67. Shih LY, Huang CF, Wu JH *et al*. *Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse*. *Blood* 2002; **100**: 2397.
68. Chillón MC, Fernández C, García-Sanz R, Belanzategui A, Ramos F, Fernández-Calvo J, González M, San Miguel JF. *FLT3-activating mutations are associated with poor prognostic features in AML at diagnosis but they are not an independent prognostic factor*. *The Hematology Journal* 2004; **5**:239.
69. Blume-Jensen P, Hunter T. *Oncogenic kinase signaling*. *Nature* 2001; **411**:355
70. Reilly JT. *Class III receptor tyrosine kinase signaling: role in leukaemogenesis*. *Br J Haematol* 2002; **116**: 744.
71. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. *Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group*. *Ann. Intern. Med.* 1985; **103**: 620.
72. Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, Schiffer CA, Bennett JM, Bloomfield CD *et al*. *Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia*. *J. Clin. Oncol.* 1990; **8**: 813.
73. San Miguel JF, Vidriales B, Lopez-Berges C, Diaz Mediavilla J, Gutierrez N, Cañizo C *et al*. *Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease (MRD) in AML identifies different patient risk-groups and may contribute to post-induction treatment stratification*. *Blood* 2001; **98**: 1746.
74. Sanz MA, Martín G, Rayón C, Esteve J, González M, Díaz-Mediavilla J *et al*. *A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high antileukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed PML/RAR α -positive acute promyelocytic leukemia*. *Blood* 1999; **94**: 3015.
75. van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G *et al*. *Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease*. *Leukemia* 1999; **13**: 1901.

76. Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ. *Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980; **77**:2936.
77. Stirewalt DL and Radich JP. *The role of FLT3 in haematopoietic malignancies.* Nature Reviews Cancer 2003; **3**:650.