

doi.org/10.24245/rev\_hematol.v24i3.6896

## Detección de FLT3-ITD y su papel en el diagnóstico de pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda

### Detection of FLT3-ITD and its role in the diagnosis of pediatric patients with acute myeloid leukemia.

Elizabeth Candy Ramírez Martínez,<sup>1</sup> Víctor Manuel Ortiz Gálvez,<sup>1</sup> Dinora Virginia Aguilar Escobar,<sup>2</sup> María de Lourdes Vega Vega,<sup>3</sup> Sergio Antonio Garay Sánchez<sup>1</sup>

#### Resumen

**OBJETIVO:** Implementar en el laboratorio la detección de FLT3-ITD en pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Estudio retrospectivo efectuado de 2016 a 2020, en el que detallamos la técnica de PCR seguida de electroforesis capilar, mostrando la estrategia de validación del ensayo y nuestra experiencia en el uso de esta técnica en 14 muestras de médula ósea de pacientes pediátricos.

**RESULTADOS:** La técnica de PCR seguida de electroforesis capilar es un método confiable, robusto y preciso, que alcanza sensibilidad de un radio alélico (AR) de  $0.01 \pm 0.001$ . Observamos incidencia de la mutación FLT3-ITD del 14.3% que además presentaron la  $t(15;17)(q22;q12)$ .

**CONCLUSIONES:** Esta técnica puede ser reproducible en otros centros de diagnóstico molecular ayudando al médico en la estratificación del riesgo, seguimiento, tratamiento y pronóstico del paciente con leucemia mieloide aguda.

**PALABRAS CLAVE:** Leucemia mieloblástica aguda; pronóstico; recaída; pediatría; Latinoamérica.

#### Abstract

**OBJECTIVE:** To implement the detection of FLT3-ITD in pediatric patients with acute myeloid leukemia.

**MATERIALS AND METHODS:** A retrospective study performed from 2016 to 2020 in which we detail the PCR technique followed by capillary electrophoresis; showing the validation strategy of the trial and our experience in the use of this technique in 14 bone marrow samples of pediatric patients.

**RESULTS:** We showed that it is an accuracy, robust and precise method, detecting a sensitivity of the test of an allelic ratio (AR) of  $0.01 \pm 0.001$ . We observed an incidence of the mutation FLT3-ITD of 14.3% with acute myeloid leukemia that also had  $t(15;17)(q22; q12)$ .

**CONCLUSIONS:** This technique can be reproduced in other molecular diagnostic centers, helping the doctor in the risk stratification, monitoring, treatment and prognosis of the patient with acute myeloid leukemia.

**KEYWORDS:** Acute myeloid leukemia; Prognosis; Relapse; Pediatrics; Latin America.

<sup>1</sup> Departamento de Genética Molecular.

<sup>2</sup> Subdirección de Diagnóstico y Banco de Sangre.

<sup>3</sup> Dirección General.

Hospital Infantil Teletón de Oncología, Santiago de Querétaro, México.

**Recibido:** septiembre 2021

**Aceptado:** agosto 2023

#### Correspondencia

Elizabeth Candy Ramírez Martínez  
elizabeth.ramirez@hospitalteleton.org.mx

#### Este artículo debe citarse como:

Ramírez-Martínez EC, Ortiz-Gálvez VM, Aguilar-Escobar DV, Vega-Vega ML, Garay-Sánchez SA. Detección de FLT3-ITD y su papel en el diagnóstico de pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda. Hematol Mex 2023; 24 (3): 136-144.

## ANTECEDENTES

La mutación de FLT3-ITD (por sus siglas en inglés de FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication) es una de las alteraciones más comunes en leucemia mieloide aguda, ocurre aproximadamente en el 20 al 30% de los pacientes con este tipo de leucemia<sup>1,2,3</sup> (el 35% de adultos<sup>4</sup> y 12% de niños<sup>5,6</sup>). Se ha demostrado que la mutación FLT3-ITD (FLT3-ITD+) se asocia con mal pronóstico,<sup>2,3</sup> ya que existe aumento en el riesgo de recaída,<sup>1,2,4,7</sup> una recuperación clínica menor, menores tasas de curación<sup>2</sup> y disminución de la supervivencia libre de enfermedad,<sup>1</sup> supervivencia libre de evento<sup>1,8</sup> y supervivencia global,<sup>1,4,5</sup> por lo que la última actualización de la WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (2017) reconoce a FLT3-ITD como una de las mutaciones que son de significación pronóstica en leucemia mieloide aguda.<sup>9</sup> En específico se sabe que la población pediátrica tiene disminución de la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.<sup>10</sup>

La investigación acerca de la importancia de la FLT3-ITD+ en el pronóstico ha avanzado considerablemente, demostrando que no solo es importante determinar la presencia de FLT3-ITD+, sino que además es fundamental determinar la relación entre el alelo mutado y el alelo normal (radio alélico, AR) reflejando la pérdida completa o parcial del alelo normal (FLT3/wt).<sup>5,8,10,11</sup>

Además, conocer la existencia de la mutación FLT3-ITD puede beneficiar al paciente en el seguimiento postratamiento como marcador de enfermedad mínima residual (EMR) o para la administración de medicamentos donde uno de los blancos sea FLT3 (por ejemplo, quizartinib, midostaurin, lestaurtinib, sorafenib, ponatinib, sunitinib, crenolanib y gilteritinib<sup>2</sup>).

A pesar de que en México se ha reportado una prevalencia del 12 al 22% de FLT3-ITD+ en

pacientes con leucemia mieloide aguda (pediátricos y adultos),<sup>4,5</sup> la detección aún no se realiza rutinariamente en México.<sup>5</sup> El objetivo del estudio fue implementar la detección de la mutación FLT3-ITD como prueba diagnóstica mediante la validación cualitativa y cuantitativa para diagnóstico y seguimiento clínico a partir de los patrones de referencia del *College of American Pathologists* para enfermedad molecular. En este artículo detallamos la estrategia de validación del ensayo y nuestra experiencia en el uso de esta técnica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Proceso

*Muestras:* Para la validación se utilizaron muestras de sangre periférica de personas sanas y ADN del control de calidad externo del CAP, mientras que para determinar la sensibilidad se utilizó ADN de una muestra de médula ósea (MO) FLT3-ITD+. Después de la validación se utilizaron muestras de médula ósea de 14 pacientes pediátricos (menores de 18 años) con leucemia mieloide aguda. Todas las muestras se obtuvieron después de firmar el consentimiento informado de acuerdo con la declaración de Helsinki.

*Extracción de ADN:* El ADN se extrajo de las muestras de sangre periférica y médula ósea con el estuche QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemania) de acuerdo con las instrucciones de uso del proveedor.

*Reacción en cadena de la polimerasa:* Se seleccionaron los iniciadores para ITD publicados por Murphy y colaboradores en 2006<sup>1</sup> amplificando el exón 11 forward 5'-6-FAMG-CAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' y el exón 12 reverse 5'-HEX-CTTTCAGCATTGACGG-CAACC-3' (Integrated DNA Technologies, Estados Unidos) a una concentración de 1 mM por reacción. Se utilizó el kit de PCR AmpliTaq

Gold™ DNA Polymerase with Buffer I (Applied Biosystems, Estados Unidos). El volumen final de cada reacción fue de 50 µL, que corresponden a 10 mL de ADN al 0.1 ng/mL más 40 mL de una mezcla de: 0.5 mL de polimerasa 125 U (Ampli-Taq Gold DNA Polymerase, ThermoFisher, Estados Unidos), 5 µL de PCR Gold Buffer sin MgCl<sup>2</sup> 1x, 2 µL de MgCl 50 mM, 4 µL dNTP's (dNTP Mix, ThermoFisher, Estados Unidos) 10 mM, 1 µL de cada primer y 26.5 µL de agua libre de DNAsas y RNAsas. Las temperaturas de ciclado fueron: 95°C por 9 minutos, seguidos de 35 ciclos de 93°C por 30s, 56°C por un minuto y 72°C por 2 minutos con una extensión final a 72°C por 7 minutos.

*Análisis de fragmentos:* Se inyectaron 8.5 µL de Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, Estados Unidos) más 0.5 µL de GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard (Applied Biosystems, Estados Unidos) y 1 µL de amplificado de cada muestra por pozo. Las muestras se examinaron en el analizador genético (Genetic Analyzer 3500 de Applied Biosystems/HITACHI, Estados Unidos) usando el programa STR-TIME inyección.

Los resultados se analizaron en el programa Gene Mapper 5 con el método de análisis HID Method GM 4.1.

*Radio alélico de FLT3-ITD (AR):* Se calculó en las muestras positivas dividiendo la altura bajo la curva del alelo mutado entre el alelo normal (FLT3-ITD/FLT3-wt).<sup>3,11</sup>

*Diseño y síntesis de controles positivos:* El diseño de los controles positivos de ADN de la mutación ITD del gen de FLT3 en los exones 12 y 13 y del gen normal (FLT3-WT) se realizó in silico con plataformas de análisis bioinformático (GeneBank/Blast) para formar gBlocks® Gene Fragments (FLT3 de 329 nucleótidos ID.19314873/138693488 y FLT de 366 nucleótidos ID.19314872/138693487) usando los iniciadores como base para elegir los nucleótidos

intermedios en la secuencia base para posteriormente ser sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, Estados Unidos) a 500 ng y reconstituídos para obtener una concentración de 0.1 ng/mL para la PCR. La secuencia de los controles se muestra en el **Cuadro 1**.

### Estandarización del proceso

*Veracidad:* Se analizaron 9 muestras de sangre periférica negativas y 2 muestras positivas FLT3-ITD del control de calidad externo del CAP, una muestra de ADN del control positivo sintético mutado y una muestra de ADN del control positivo sintético normal analizándose el resultado cualitativo.

*Precisión:* Se procesaron por duplicado 10 muestras de pacientes sanos (sangre periférica), 5 muestras de ADN del control positivo sintético mutado y 5 muestras de ADN del control positivo sintético normal analizándose el resultado cualitativo y el tamaño de la repetición ITD. El proceso se realizó por duplicado en la misma corrida analítica.

*Reproducibilidad:* Se evaluaron 2 muestras de pacientes sanos (sangre periférica), una muestra de ADN sintético normal y una muestra de ADN sintético mutado durante 5 ensayos en diferentes días de proceso.

*Sensibilidad analítica:* Se realizaron diluciones a 10%, 5%, 1%, 0.8%, 0.6%, 0.4% y 0% entre una muestra de médula ósea negativa a la mutación con una muestra de médula ósea positiva a la mutación (heterocigota con radio alélico de 1.0). Este proceso se realizó por triplicado.

### Análisis de muestras de pacientes

A partir de la implementación de la prueba se analizaron 14 muestras de médula ósea de pacientes pediátricos (menores de 18 años) con leucemia mieloide aguda confirmada por

**Cuadro 1.** Secuencia de los controles sintéticos para FLT3. Se muestra la secuencia de nucleótidos correspondiente al control sintético mutado (362 nt) y al control sintético normal (325 nt)

	Secuencia	Tamaño (nt)
CP sintético mutado	TTTTGCAATTTAGGTATGAAAGCCAGCTACAGATGGTACAGGTGACCGGCTCCTCAGATAACGACTACTGCTACGTAGATTTGAGAGGATATGAGTATGAGTACGTCAACCTTGATGTCAGAGTATGTCATATGATCTCAAATGGGAGTTCCAAGAGAAAATTTAGAGTTGGTAAGAATGGAATGTGCCAAATGTTCTGCAGCATTCTTTCCATTGGAAAATCTTTAAAATGCACGTACTIONACCATTGTCTTTGCAGGGAAGGTACTIONAGGATCAGGTGCTTTTGGAAAAGTATGAACGCAACAGCTTATGGAATTAGCAAAACAGAGTCTCAATCCAGGTTGCCGTCAAATGCTGAAAAGTTTT	362
CP sintético normal	TTTTGCAATTTAGGTATGAAAGCCAGCTACAGATGGTACAGGTGACCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTACAGAGAATATGAATATGATCTCAAATGGGAGTTCCAAGAGAAAATTTAGAGTTGGTAAGAATGGAATGTGCCAAATGTTCTGCAGCATTCTTTCCATTGGAAAATCTTTAAAATGCACGTACTIONACCATTGTCTTTGCAGGGAAGGTACTIONAGGATCAGGTGCTTTTGGAAAAGTATGAACGCAACAGCTTATGGAATTAGCAAAACAGGAGTCTCAATCCAGGTTGCCGTCAAATGCTGAAAAGTTTT	325

inmunofenotipo en el Hospital Infantil Teletón de Oncología en Querétaro, México, de 2016 a 2020. Describimos la incidencia de la mutación y las características genéticas de los pacientes.

## RESULTADOS

### Estandarización del proceso

Para confirmar la concordancia entre el valor obtenido de una serie de resultados y el valor de referencia aceptado (veracidad) se realizaron análisis a muestras del CAP, encontrándose un 100% de asertividad en los resultados. Al estudiar la precisión de los resultados se observó que las muestras examinadas durante la misma corrida analítica mostraron el mismo resultado cualitativo y en cuanto al tamaño del amplificado se observó una desviación estándar (SD) promedio de 0.03 nucleótidos (nt) en pacientes sanos, 0.05 nt en el control sintético normal y 0.03 nt en el control sintético mutado.

Al evaluar la medida de precisión de un método analítico en diferentes ensayos (reproducibilidad) observamos una dispersión mínima del amplificado entre las 5 repeticiones realizadas en: pacientes sanos (325.41 nt, SD 0.39), ADN

sintético normal (325.50 nt, SD:0.20) y ADN sintético mutado (362.03 nt, SD 0.32).

Para determinar la menor concentración o cantidad de FLT-ITD detectable con razonable certeza (sensibilidad) observamos que una dilución de 0.8% de muestra de MO con FLT3-ITD mutado nos permite tener una sensibilidad de AR de  $0.01 \pm 0.001$ . **Cuadro 2**

Análisis de muestras de pacientes. A partir de la implementación de la prueba se han realizado 14 ensayos de detección de FLT3-ITD en MO de pacientes con leucemia mieloide aguda, de los cuales 2 resultaron positivos para

**Cuadro 2.** Sensibilidad de la prueba de detección de FLT3-ITD por electroforesis capilar

ADN normal (%)	ADN mutado (%)	Radio alélico (AR)	SD
90	10	0.082	0.024
95	5	0.035	0.005
99	1	0.019	0.002
99.2	0.8	0.010	0.001
99.4	0.6	0	0
99.6	0.4	0	0
100	0	0	0

la duplicación FLT3-ITD (14.3%) presentando diferentes tamaños de la duplicación y del AR para cada paciente (**Cuadro 3**). Los pacientes que fueron positivos también mostraron la t(15;17) (q24;q21). Los datos clínicos y genéticos al diagnóstico se presentan en el **Cuadro 4**.

**DISCUSIÓN**

Debido a la importancia de la mutación de FLT3-ITD en pacientes con leucemia mieloide aguda y a que su detección no se realiza rutinariamente en México,<sup>5</sup> establecimos la estandarización de la técnica para diagnóstico clínico. Utilizamos el método de electroforesis capilar debido a que tiene mayor sensibilidad que los ensayos de electroforesis en gel de agarosa,<sup>3</sup> permitiendo un dimensionamiento más preciso de las mutaciones ITD y la capacidad para resolver múltiples bandas de tamaños similares que no podrían ser resueltas por geles de agarosa. En nuestros resultados observamos una veracidad, precisión y reproducibilidad del 100%. La sensibilidad de la técnica a una dilución del 0.8% alcanzó un AR de 0.01 con error de medida de 0.001, similar a lo reportado por el grupo de Sakaguchi y colaboradores, que describieron sensibilidad de la prueba con un AR de 0.017 al combinar dos líneas celulares (MV4-11 y NKM-1, 0.2% de ADN mutado),<sup>3</sup> por lo que nuestros resultados tienen concordancia en la sensibilidad del método a pesar de ser diferente matriz biológica.

Asimismo, nuestro límite de sensibilidad alcanzó una dilución del 0.08% que es comparable al

4% que se obtuvo por secuenciación de nueva generación (NGS).<sup>5</sup>

Después, analizamos muestras de médula ósea de pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda y observamos una tasa de FLT3-ITD+ del 14.3% que es similar a lo publicado mundialmente (12-25%)<sup>2</sup> y para la población pediátrica mexicana del 12.5% que fue analizada por NGS.<sup>5</sup> Si bien se ha reportado que la mutación FLT3-ITD es más frecuente en pacientes con cariotipo normal<sup>12</sup> y con la t(15;17)(q22; q12),<sup>9</sup> nuestros pacientes con la mutación en FLT3-ITD mostraron la t(15;17)(q22; q12), el 85.7% restante (FLT3-wt) mostró translocaciones, como la t(9;11)(p22;q23), t(10;11)(p12;q23), inv(16)(p13q22), t(15;17)(q22; q12) y alteraciones en el cariotipo (**Cuadro 4**); es posible que nuestro reducido número de casos no permita observar la incidencia de FLT3-ITD asociadas con otros tipos de alteraciones genéticas que han descrito otros grupos.

Se ha documentado que las mutaciones FLT3-ITD+ ocurren en el 30 al 40% de las leucemias promielocíticas agudas (PML)<sup>11,13,14</sup> y se asocian con leucocitosis<sup>12,15</sup> y morfología microgranular, en nuestro caso equivale al 40% de pacientes con PML. Si bien la translocación t(15;17) (q22;q12) con el transcrito de fusión PML-RARA está asociada con mayor tasa de remisión y mejor pronóstico,<sup>5,11,13,16</sup> el papel de la mutación de FLT3-ITD y la t(15;17) (q22;q12) ha sido controvertido debido a que algunos grupos han reportado un efecto

**Cuadro 3.** Seguimiento de FLT3-ITD en leucemia mieloide aguda

ID paciente	Tamaño del alelo mutado	Tamaño de las repeticiones cortas en tándem	Radio alélico
2	346.6	21.6	0.044
10	376.8	51.8	0.580

**Cuadro 4.** Datos clínicos y genéticos de pacientes con leucemia mieloide aguda (continúa en la siguiente página)

ID	Sexo	Edad (años)	Hb	WBC	Pt 1x10 <sup>3</sup>	Blastos (%)	Blastos por INF (%)	FAB	Cariotipo	Alteración genética por PCR	FLT3-ITD (AR)	Estatus
1	M	< 1	7.5	97,600	51	32,208 (33%)	47.45	M4Eo	46,XY,inv(16)(p13.1;q22)[9]/46,XY[11]	inv(16)(p13;q22)	ND	Vigilancia
2	F	5	8.9	120,400	85	109,564 (91%)	77.21	M3	46,XX,t(15;17)(q24;q21)[20]	t(15;17)(q24;q21)	0.044	HSCT
3	F	2	11.7	29,900	357	12,259 (41%)	57.04	M7	46,XX,t(15;7)(p13;q34;q11.2)[17]/46,XX[3]	ND	ND	Vigilancia
4	M	10	8.4	780	32	23 (3%)	73.40	M3	46,XY,t(15;17)(q24;q21)[13]/46,XY[7]	t(15;17)(q24;q21)	ND	Vigilancia
5	F	6	7.9	75,030	155	66,026 (88%)	80.00	M6b	47,XX,+21c[20]	ND	ND	Vigilancia
6	F	1	9.8	9250	79	462 (5%)	70.16	M5a	42~114,XXXX,X,+1,+1+der(1)t(1;5)(p36;q22),t(1;5)(p36;q22)x2,+2,+2,+3,+3,+5,+5,+5,+5,+6,+6,+6,del(6)(q16),+7,+7,+7,del(7)(q32),+8,+8,+8,+8,+9,t(9;1)(p21;q23)x2,+dr(9),+10,+10,+10,+10,+10,+11,+11,+11,+11,+13,+13,+13,+13,+14,+14,+15,+15,+15,+15,+16,+16,+16,+16,+17,+17,+17,+17,+18,+18,+18,+18,+19,+19,+19,+19,+19+20,+20,+20,+21,+21,+21,+21,+21,+22,+22,+22[cp20]	t(9;11)(p22;q23)	ND	+
7	M	11	9.8	37,560	18	12,019 (32%)	72.37	M1	45,XY,t(2;3)(q33;q21),del(7)(q22),-17[17]/46,XY[3]	ND	ND	+
8	F	14	9.8	1371	17	671 (49%)	72.00	M3	47,XX,+8[11]/47,XX,+18,t(15;17)(q24;q21)[9]	t(15;17)(q24;q21)	ND	En tratamiento
9	M	6	9.4	8420	172	6736 (80%)	82.39	M3	46,XY,t(15;17)(q24;q21)[13]/46,XY[7]	t(15;17)(q24;q21)	ND	+
10	M	14	5.9	2020	5	828 (41%)	57.19	M3	46,XY,t(15;17)(q24;q21)[20]	t(15;17)(q24;q21)	0.58	En tratamiento
11	M	< 1	11.9	9850	52	197 (2%)	72.00	M7	62~91,XY,+X,+Y,+1,+1,+2,+2,+3,+3,+4,+4,+4,+5,+5,+6,+6,+7,+7,+8,+8,+9,+9,+10,+10,+11,+11,+12,+12,+13,+13,+14,+14,+15,+15,+15,+16,+16,+17,+17,+18,+18,+19,+19,+20,+20,+21,+21,+22,+22[cp4]/46,XY[16]	ND	ND	En tratamiento

**Cuadro 4.** Datos clínicos y genéticos de pacientes con leucemia mieloide aguda (continuación)

ID	Sexo	Edad (años)	Hb	WBC	Pt $1 \times 10^3$	Blastos (%)	Blastos por INF (%)	FAB	Cariotipo	Alteración genética por PCR	FLT3-ITD (AR)	Estatus
12	M	2	8.2	5810	6	290 (5%)	59.00	M7	58~76,XY,+X,+X,+Y,+1,+2,+2,+3,+3,+4,+4,+5,+6,+7,+7,+8,+9,+9,+10,+10,+11,+12,+13,+14,+15,+16,+16,+17,+18,+19,+19,+20,+20,+21,+21+22,+22,+mar[cp11]/46,XY[9]	ND	ND	En tratamiento
13	F	<1	10.4	13,060	13	3918 (30%)	97.00	M5	47,XX,+8,ins(10;11)(p12;q23;q23)[9]/47,XX,+8[11]	t(10;11)(p12;q23)	ND	En tratamiento
14	M	14	10.9	65,220	142	55,437 (85%)	89.3	M5b	47,XY,+8,t(9;11)(p21;q23)[20]	t(9;11)(p22;q23)	ND	+

ID: número identificador del paciente; F: femenino; M: masculino; Hb: hemoglobina; WBC: leucocitos; Pt: plaquetas; INF: inmunofenotipo; LA B/M: leucemia linfóide aguda B/leucemia mieloide aguda; HSCT: trasplante de células progenitoras hematopoyéticas; FAB: clasificación francesa-británica-americana; AR: radio alélico; t: defunción; ND: no detectada.

negativo,<sup>13</sup> mientras que otros no encuentran repercusión significativa en la supervivencia y pronóstico.<sup>4,11,16</sup> En específico, un estudio realizado con pacientes pediátricos observó que en presencia de ambas anomalías genéticas (FLT3-ITD y PML-RARA) los pacientes tienen coagulación intravascular diseminada (DIC), hemorragia y un efecto negativo en la supervivencia global (OS a 2 años 44.6 vs 96%,  $p = 0.001$ ) al compararlos con pacientes sin la mutación de FLT3-ITD.<sup>13</sup>

Recientemente en diversas investigaciones del papel de FLT3-ITD+ se remarcó la importancia predictiva del AR; se ha observado que un  $AR \geq 0.4$  en niños y  $\geq 0.5$  adultos se asocian con un efecto adverso en la supervivencia libre de evento y con incremento de respuesta disminuida,<sup>11</sup> además de ser relevante en el pronóstico del paciente durante el periodo de inducción en comparación con pacientes con  $AR < 0.4$  o FLT3/wt,<sup>5,8,10,11</sup> además de que ex vivo se ha asociado un  $AR > 0.5$  con mejor respuesta de la inhibición de FLT3 por gilteritinib (inhibidor de FLT3).<sup>8</sup> Si bien se ha documentado que los adultos muestran mayor probabilidad de tener la FLT3-ITD+4 y además de que el  $AR \geq 0.5$  ocurre más en adultos que en niños (87.5 vs 63.6%),<sup>13</sup> es importante determinar el AR en los pacientes pediátricos, ya que, como observamos en nuestros pacientes, uno de ellos mostró un AR de 0.58 estratificando al paciente como de alto riesgo durante el periodo de inducción y en el pronóstico de recaída.

Diferentes publicaciones remarcaron que la presencia de la mutación FLT3-ITD está relacionada con un alto conteo de leucocitos,<sup>12,15</sup> blastos<sup>6,12,14,15</sup> y hemoglobina (Hb) al diagnóstico;<sup>4,11</sup> en específico, Cuevo-Sierra y colaboradores<sup>12</sup> publicaron que la  $Hb > 9.6$ ,  $WBC > 20 \times 10^9$  son los factores más relevantes para predecir la ocurrencia de la mutación FLT3-ITD, mientras que Souza-Melo y su grupo<sup>16</sup> notaron que el conteo de plaquetas fue

menor en pacientes FLT3-ITD+ al compararlos con pacientes adultos FLT3/wt; sin embargo, nuestros pacientes FLT3-ITD+ no cumplieron en su totalidad con los criterios publicados por esos grupos, es posible que nuestro número reducido de pacientes no nos permita observar lo antes reportado.

Por último, consideramos que hubiera sido enriquecedor haber dado seguimiento a la presencia de FLT3-ITD+ como EMR durante el tratamiento para así evaluar la necesidad de un tratamiento específico contra FLT<sup>3,7</sup> modificarlo en caso de ya estar administrando un inhibidor de FLT3 o, bien, tomar otras decisiones clínicas con base en la persistencia o ausencia de FLT3-ITD+ durante el tratamiento.

## CONCLUSIONES

El ensayo diagnóstico molecular de FLT3-ITD implementado provee un método confiable, robusto y sensible. En esta publicación se plasman los datos para que esta técnica sea reproducible en otros centros oncológicos.

Éste es un proyecto innovador en México debido a lo valioso de conocer la presencia de FLT3-ITD y el radio alélico de la mutación, ya que permite al médico determinar una estratificación del riesgo más precisa, así como a la decisión del tratamiento que puede cambiar el pronóstico del paciente con leucemia mieloide aguda y de esa forma ayudar en aumentar la supervivencia.

## REFERENCIAS

- Murphy KM, Hafez MJ, Smith BD, Cooper LC, Berg KD. Detection of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay. *J Mol Diagnostics* 2003; 5: 96-102. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60458-8.
- Sexauer AN, Tasian SK. Targeting FLT3 signaling in childhood acute myeloid leukemia. *Front Pediatr* 2017; 5: 1-9.
- Sakaguchi M, Nakajima N, Yamaguchi H, Najima Y, et al. The sensitivity of the FLT3-ITD detection method is an important consideration when diagnosing acute myeloid leukemia. *Leuk Res Reports* 2020; 13: 100198. doi: 10.1016/j.lrr.2020.100198.
- Cuervo-Sierra J, Jaime-Pérez JC, Gómez-Almaguer D. Mutaciones del módulo FLT3 en leucemia aguda mieloblástica. *Rev Hematol Mex* 2012; 13: 177-184.
- Molina-Garay C, Carrillo-Sánchez K, Flores-Lagunes LL, Jiménez-Olivares M, et al. Profiling FLT3 mutations in Mexican acute myeloid leukemia pediatric patients: impact on overall survival. *Front Pediatr* 2020; 8.
- Burnatt G, Licinio M, Gaspar P, Schweitzer A, et al. Analysis of the presence of FLT3 gene mutation and association with prognostic factors in adult and pediatric acute leukemia patients. *Braz J Pharm Sci* 2017; 53: 1-11. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902017000216105>.
- Levis MJ, Perl A, Altman JK, Gocke CD, et al. A next-generation sequencing-based assay for minimal residual disease assessment in AML patients with FLT3-ITD mutations. *Blood Adv* 2018; 2: 825-831. doi: 10.1182/bloodadvances.2018015925.
- Cucchi DGJ, Denys B, Kaspers G, Janssen J, et al. RNA-based FLT3-ITD allelic ratio is associated with outcome and ex vivo response to FLT3 inhibitors in pediatric AML. *Blood* 2018; 131: 2485-2489. doi: 10.1182/blood-2017-12-819508.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue 4th, 2017.
- Wu X, Feng X, Zhao X, Ma F, et al. Prognostic significance of FLT3-ITD in pediatric acute myeloid leukemia: a meta-analysis of cohort studies. *Mol Cell Biochem* 2016; 420: 121-128. doi: 10.1007/s11010-016-2775-1.
- Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Kern W, et al. Clinical impact of FLT3 mutation load in acute promyelocytic leukemia with t(15;17)/PML-RARA. *Haematologica* 2011; 96: 1799-1807.
- Cuervo-Sierra J, Jaime-Pérez JC, Martínez-Hernández RA, García-Sepúlveda RD, et al. Prevalence and clinical significance of FLT3 mutation status in acute myeloid leukemia patients in two Latin American countries: A multicenter study. *Arch Med Res* 2016; 47: 172-179. doi: 10.1016/j.arcmed.2016.06.003.
- Rasekh EO, Elsayed GM, Madney Y, El Gammal MM. Prognostic significance of bcr-1 and bcr-3 isoforms of PML-RARA and FLT3-ITD in patients with acute promyelocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2020; 20: 156-167. doi: 10.1016/j.clml.2019.08.006.
- Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, et al. 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: 1752-1759. doi: 10.1182/blood.v98.6.1752.

15. Byun JM, Kim Y, Yoon H, Kim S, et al. Cytogenetic profiles of 2806 patients with acute myeloid leukemia. Retrospective multicenter nationwide study. *Ann Hematol* 2016; 95: 1223-1232. doi: 10.1007/s00277-016-2691-1.
16. Souza-Melo CP, Brant-Campos C, Pimenta-Dutra Á, Aguirre-Neto JC, et al. Correlation between FLT3-ITD status and clinical, cellular and molecular profiles in promyelocytic acute leukemias. *Leuk Res* 2015; 39: 131-137. doi:10.1016/j.leukres.2014.11.010.