

Caracterización molecular de las mutaciones FLT3-ITD en pacientes colombianos con leucemia mieloide aguda

Angélica María Jiménez-Mejía,¹ Carlos Muskus,² José Domingo Torres,³ Francisco Cuéllar-Ambrossi,⁴ Mauricio Camargo-Guerrero,⁵ Gonzalo Vásquez-Palacio¹

RESUMEN

Antecedentes: en pacientes con leucemia mieloide aguda la mutación en el gen *FLT3* tiene una frecuencia de 15 a 30%, con implicaciones pronósticas. En Colombia se desconocen la frecuencia y tipo de mutaciones en este gen.

Objetivo: determinar la frecuencia de las mutaciones del gen *FLT3* en población colombiana con leucemia mieloide aguda.

Material y método: estudio descriptivo, de corte transversal, efectuado con base en la evaluación de pacientes con diagnóstico reciente de leucemia mieloide aguda remitidos de diferentes centros de salud del país a la Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Mediante el *QIAamp DNA Blood Mini Kit* y PCR se extrajo ADN a partir de muestras de sangre periférica o médula ósea; se amplificaron los dominios yuxtamembrana y tirosina cinasa del gen *FLT3*. Para determinar las mutaciones todos los productos se secuenciaron.

Resultados: se analizaron las muestras de 31 pacientes con leucemia mieloide aguda y se encontraron 3/31 pacientes con la mutación *FLT3-ITD*. En el dominio tirosina cinasa de *FLT3* no se encontró la mutación.

Conclusiones: este es el primer estudio efectuado en Colombia que determina la frecuencia de las mutaciones en el gen *FLT3*. En nuestra población la mutación *FLT3-ITD* es más baja (9.7%) que la informada en la bibliografía. Esta mutación se relaciona con recuentos altos de leucocitos en sangre periférica ($p=0.023$). Para determinar el significado clínico de estas mutaciones en la población colombiana se plantea la necesidad de efectuar en nuestro país estudios metacéntricos.

Palabras clave: leucemia mieloide aguda, Fms Like tyrosine Kinase (*FLT3*), PCR

ABSTRACT

Background: In the past years, several studies detected high frequencies (15-30%) of mutations in the *FLT3* gene in AML cases, which has prognosis implications. In Colombia, the frequency and type of mutations in *FLT3* in AML cases is still unknown.

Objective: The aim of this study was to determine the frequency and type of mutations in the *FLT3* gene that might be involved in the leukomogenesis in a cohort of Colombian AML patients.

Methodology: Descriptive and cohort study made in Colombia genomic DNA was isolated from mononucleated cells of AML patients peripheral blood or bone marrow using *QIAamp DNA Blood Mini Kit*. Mutations in juxtamembrane and tyrosine kinase domains of *FLT3* gene were sequenced.

Results: Thirty-one AML patients were included in the present study. We found 3/31 with *FLT3* ITD mutation. The patients with the mutation *FLT3* ITD showed higher white blood counts.

Conclusions: This is the first study in Colombia that has been undertaken to determine mutations in *FLT3* gene in our population. The frequencies of mutations in *FLT3* ITD gene were lower (9.7%) than those informed in the literature. Besides, the presence of *FLT3* ITD was associated with higher leukocyte counts in peripheral blood ($p=0.023$). The results of the present study entail the necessity of multicenter studies in our country to determine the clinical significance of these mutations in the Colombian population.

Key words: Acute myeloid leukemia, FMS Like Tyrosine Kinase (*FLT3*), PCR

¹ Unidad de Genética Médica. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

² Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET, Sede de Investigaciones Universitarias.

³ Profesor Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

⁴ Hematologías de Adultos, IPS Universitaria.

⁵ Genética de poblaciones, Regeneración y Cáncer, Sede de Investigaciones Universitarias. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Colombia.

Correspondencia: Dr. Gonzalo Vasquez Palacio
Unidad de Genética Médica
Facultad de Medicina
Universidad de Antioquia

Teléfono: (574)2196930 Fax:(574)2196932
Carrera 51 D # 62-29 Medellín, Colombia
gvasquezp@gmail.com

Recibido: octubre 2013
Aceptado: noviembre 2013

Este artículo debe citarse como: Jiménez-Mejía AM, Muskus C, Domingo-Torres J, Cuéllar-Ambrossi F, Camargo-Guerrero M, Vásquez-Palacio G. Caracterización molecular de las mutaciones *FLT3-ITD* en pacientes colombianos con leucemia mieloide aguda. Rev Hematol Mex 2013;14:166-172.

www.nietoeditores.com.mx

La leucemia mieloide aguda es una neoplasia agresiva, clonal, mieloide, con detención de la maduración de la mielopoyesis y acumulación de mieloblastos en la médula ósea o en la sangre periférica, o en ambos. La tasa de supervivencia a largo plazo es de 25-70% en pacientes menores de 60 años y sólo 10-15% en los de edad más avanzada.¹ En la actualidad, los cambios citogenéticos y moleculares se han establecido como marcadores pronóstico y de respuesta a la quimioterapia de inducción y para predecir la tasa de recaída, supervivencia libre de enfermedad y general.²

En las actuales guías de práctica clínica en oncología para pacientes con leucemia mieloide aguda se reconocen tres grupos de riesgo citogenético: favorable, intermedio y de alto riesgo. El grupo de riesgo favorable incluye: t(8;21), t(15;17), inv(16) y t(16;16) con tasas de remisión completa mayores de 90%, y supervivencia general de 60%. Para consolidar la remisión completa, en este grupo de pacientes se aconseja la administración de dosis altas de citarabina. El grupo de alto riesgo comprende la coexistencia de: inv(3), t(3;3), t(6;9), t(6;11), t(11;19), del(5q), -5, -7 o cariotipos complejos. Estos tienen un alto índice de resistencia al tratamiento de inducción de remisión, con elevada probabilidad de recaída y, en consecuencia, baja supervivencia libre de enfermedad y supervivencia general de apenas 5-15%; por esto, para intentar mejorar su pronóstico se sugiere la consolidación con trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas. El 45% de los pacientes adultos con leucemia mieloide aguda tiene cariotipo normal y se consideran de riesgo intermedio. Puesto que en estos pacientes los desenlaces y resultados del tratamiento son muy heterogéneos se sugiere incluir marcadores moleculares que complementen la información citogenética.³

Las mutaciones dentro del gen *FMS-like tyrosine kinase 3* (*FLT3*) representan una de las alteraciones genéticas más frecuentes en pacientes con leucemia mieloide aguda. El *FLT3* pertenece a la familia de receptores tirosina cinasa (RTK) clase III, que incluye FMS, c-KIT, y PDGFR α y β .⁴ La unión de su ligando *FLT3-ligand* (FL) induce un cambio conformacional, homodimerización y activación subsecuente de vías de señalización intracelular. La estimulación de los progenitores hematopoyéticos por el FL, sin ningún otro factor de crecimiento, induce la diferenciación monocítica, mientras que en presencia del factor de células madre y la interleucina 3 (IL-3), el FL produce

proliferación y mantenimiento de las células progenitoras CD34⁺/CD38⁻.⁴

El gen *FLT3* (*Fms-like tyrosine kinase 3*) contiene 24 exones, se localiza en el cromosoma 13q12 y en humanos codifica una proteína de 993 aminoácidos que se expresa en las células progenitoras hematopoyéticas e interviene en su proliferación y diferenciación. La proteína *FLT3* está compuesta por una región extracelular con cinco dominios, semejantes a las inmunoglobulinas, una secuencia transmembrana y una porción intracelular conformada por un segmento yuxtamembrana (JM) seguido de un dominio tirosina cinasa (TKD). También se ha encontrado en la placenta, las gónadas, el cerebro y otros órganos linfo-hematopoyéticos, como el hígado, el bazo y el timo.⁵

En leucemia mieloide aguda se han identificado dos clases mayores de mutaciones activadoras de *FLT3*: duplicaciones en tándem interno (ITDs) y mutaciones puntuales del dominio tirosina cinasa (TKD). Las ITDs en el dominio JM de *FLT3* se detectan en el 15%-35%⁶ de pacientes con leucemia mieloide aguda y resulta de la duplicación de un fragmento dentro de la región del dominio JM codificado por los exones 14 y 15 de *FLT3*, que puede variar entre 3-400 pb y siempre ocurre en múltiplos de tres por lo que se mantiene dentro del marco de lectura.⁶

Las mutaciones en duplicaciones en tándem interno activan en forma constitutiva a *FLT3*, lo que promueve diferentes vías de transducción y señalización, como: fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)/AKT, MAPK/ERK y (JAK2)STAT5. Además, entre 5 y 10% de pacientes con leucemia mieloide aguda exhiben mutaciones puntuales dentro del dominio tirosina cinasa. En la mayoría de los casos estas mutaciones resultan de la sustitución de tirosina por ácido aspártico en el codón 835 (D835Y).⁷

Aunque existen algunas discrepancias, la mayoría de los estudios publicados hasta la fecha coincide en otorgar un papel pronóstico adverso para las mutaciones en *FLT3-ITD*. La peor evolución de los pacientes con mutaciones de *FLT3* estaría determinada por mayor riesgo de recaída (RR) y menor supervivencia libre de enfermedad. La interpretación de los resultados de los distintos trabajos en este sentido es compleja. En general, casi todos orientan hacia menor supervivencia libre de enfermedad, libre de evento (SLEV) y un riesgo relativo mayor.⁸

La leucemia mieloide aguda es una causa importante de mortalidad en el panorama general del cáncer en el mundo

y en nuestro país.^{9,10} Debido a esto, la investigación se ha centrado en la detección de las alteraciones genéticas que repercuten en su pronóstico y tratamiento. A la fecha no existen publicaciones nacionales que den cuenta de la situación con respecto a las mutaciones del gen *FLT3*; por eso el objetivo de este trabajo fue: determinar la frecuencia de estas mutaciones en población colombiana con leucemia mieloide aguda.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio descriptivo, de corte transversal, en el que se evaluaron pacientes con diagnóstico reciente de leucemia mieloide aguda remitidos de diferentes centros de salud del país a la Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia entre junio 2007 y noviembre 2009. Las características clínicas y de laboratorio (edad, sexo, subtipo, Hgb, RGBs y recuento de plaquetas) se consignaron en el momento de la toma de la muestra y, con base en los hallazgos citogenéticos se clasificó el riesgo en favorable, intermedio y alto. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado, aprobado previamente por los comités de bioética de cada institución.

El ADN se aisló a partir de médula ósea o sangre periférica mediante *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen®). Se amplificaron los exones 14 y 15 del gen *FLT3* de acuerdo con el protocolo de Kiyoi y Naoe.¹¹ La reacción se efectuó en un volumen final de 25 µL, con 2 µL de ADN genómico (1 µg), 1 µM de los cebadores 14F 5'-CAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' y 15R 5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC-3', 12.5 µL para la de Ampli Taq Gold® PCR Master Mix 2X (Applied Biosystem) y el volumen de reacción se completó con agua desionizada. La amplificación se realizó con un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante nueve minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto y 72°C durante dos minutos, terminando con un ciclo final de extensión de 72°C por espacio de 10 minutos.

Posteriormente se amplificó el exón 20 del gen *FLT3* con cebadores 20F 5'-CCGCCAGGAACGTGCCTTG-3' y 20R5-GCAGCCTCACATTGCCCC-3' con una concentración final de cada cebador de 1 µM y en las mismas condiciones de amplificación anteriores, excepto que la temperatura de alineamiento de los cebadores se efectuó a 60°C durante 30 segundos. Los productos de la ampli-

ficación se corrieron en gel de agarosa al 2% a 80 Voltios durante 70 minutos, teñidos con SYBR Safe (Invitrogen®) y visualizados en un fotodocumentador Chemidoc (BioRad) y uso del programa *Quantity One*®. Los productos de la amplificación del exón 14 y 15 del gen *FLT3* debían generar una banda de 329 pb para el alelo normal y una banda de mayor tamaño correspondiente a la duplicación interna en tándem (ITD). Para el exón 20 del gen *FLT3* que codifica para el dominio tirosina cinasa se espera una banda de 114 pb.

Los productos amplificados se purificaron del gel con el equipo PureLink® Quick Gel Extraction (Invitrogen®) y se secuenciaron en Macrogen, Corea. En dos casos en los que se observaron los dos productos amplificados para los exones 14 y 15, se purificó una banda a partir del gel y se clonó en un vector empleando el sistema TA Cloning®. Se secuenciaron varias clonas de cada amplificado. Los resultados de las secuencias se editaron en el programa Chromas Lite® y se hizo análisis de homología con *Blast*. Las variaciones en las secuencias se determinaron por alineamiento múltiple utilizando el programa ClustalW2.

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se empleó el programa *Statistical Package for the Social Sciences for Windows software* (SPSS) versión 17.0. Para evaluar las variables y sus asociaciones se utilizó la prueba de normalidad Shapiro Wilk, la prueba de la t de Student, de Mann-Whitney y χ^2 . En los análisis estadísticos se consideró un nivel de significación con $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

De los 31 pacientes con leucemia mieloide aguda estudiados 19 (61.3%) eran mujeres y 12 (38.7%) hombres; cinco (16.13%) eran menores de 15 años. La edad promedio fue de 44 años (límites: 4-96 años). Al realizar la comparación de los promedios de leucocitos en sangre periférica, se encontró que los pacientes con la mutación *FLT3-ITD* tenían un recuento más alto que quienes no tenían la mutación ($p=0.023$). Las características clínicas, grupos de riesgo citogenético y la mutación *FLT3-ITD* de los pacientes estudiados se indican en el Cuadro 1. La distribución de los pacientes con leucemia mieloide aguda y las alteraciones cromosómicas recurrentes se ilustran en la Figura 1.

Cuadro 1. Características demográficas y de laboratorio de pacientes con leucemia mieloide aguda; presencia o ausencia de mutación *FLT3-ITD*

Característica	No.
Sexo	
Masculino	12
Femenino	19
Edad	
60 años o menos	21
Mayor a 60 años	10
Media, en años	45,2
Rango, en años	(4-96)
Recuento de glóbulos blancos	
10 X 10 ⁹ /L o más	18
Menos de 10 X 10 ⁹ /L	13
Media	47508
Rango	(1300-130400)
Plaquetas	
Menos de 100 X 10 ⁹ /L	23
Al menos 100 X 10 ⁹ /L pero menos de 450 X 10 ⁹ /L	7
450 X 10 ⁹ /L o más	1
Media	78258,06
Rango	(6000-482000)
Clasificación del riesgo	
Favorable	3
Intermedio	15
Alto	5
Sin resultado	8
Mutación FLT3-ITD	
Positivo	3
Negativo	28

De la cohorte de estudio conformada por 31 pacientes, sólo 3 (9.7%) tuvieron mutaciones en el dominio yuxtamembrana *FLT3* con los subtipos FAB M1, M2 y M5, respectivamente. En el análisis de los productos de amplificación obtenidos por PCR (Figura 2) se observó que en los tres casos *FLT3/ITD(+)* tenían dos bandas: una de 366pb correspondiente al alelo *wild-type* y otra adicional de mayor peso molecular, correspondiente a las duplicaciones en tandem (ITD); similar a la encontrada por Gaich P.¹³

Con respecto a otras variables estudiadas, la edad media de estos pacientes fue de 46 años, el recuento medio de leucocitos de 105.700/mm³, de blastos 43.7% y de plaquetas de 58.700/mm³. En los 31 pacientes analizados no se encontró ninguna de las mutaciones puntuales descritas en otros estudios para este dominio. Además, todos los

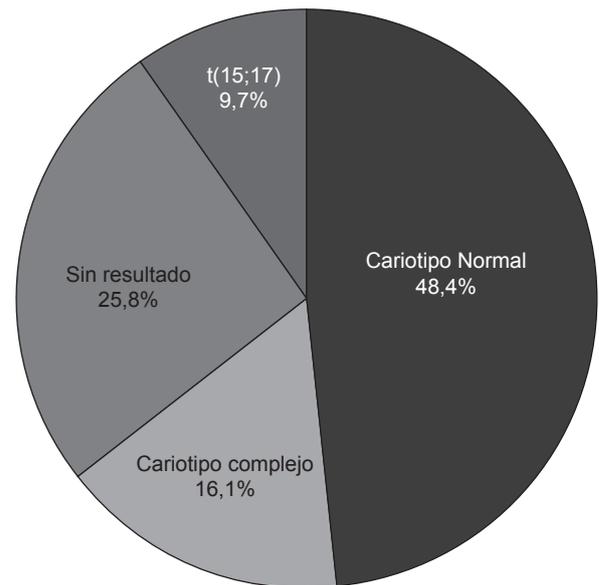


Figura.1 Distribución de pacientes con leucemia mieloide aguda según la alteración cromosómica recurrente

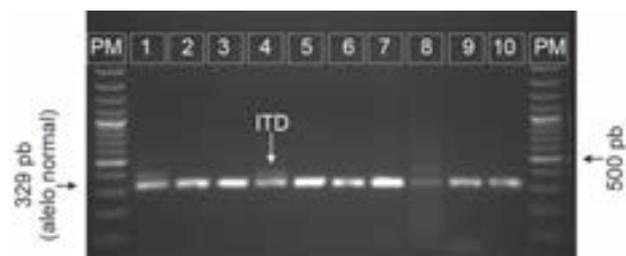


Figura 2. Gel de agarosa de productos de RT-PCR para mutaciones *FLT3*. Se observan los productos de amplificación para la mutación *FLT3* en tres pacientes (carriles 1, 4 y 8). Las bandas inferiores de 366pb corresponden al alelo normal *wt*, y las superiores a las ITD. Los carriles 2, 3, 5, 6, 7, 9 y 10 corresponden a los productos de PCR de individuos con leucemia mieloide aguda sin la inserción de nucleótidos. Las muestras se corrieron en gel de agarosa al 2% y se colorearon con Sybr safe. En el Carril 1: Marcador de peso molecular (PM)

pacientes tuvieron alelos normales para el exón 20 del gen *FLT3*. En el análisis de una de las colonias clonadas y secuenciadas por ambas cadenas, correspondientes al paciente 31, se halló un cambio de nucleótidos de una timina por una citosina (Figura 3).

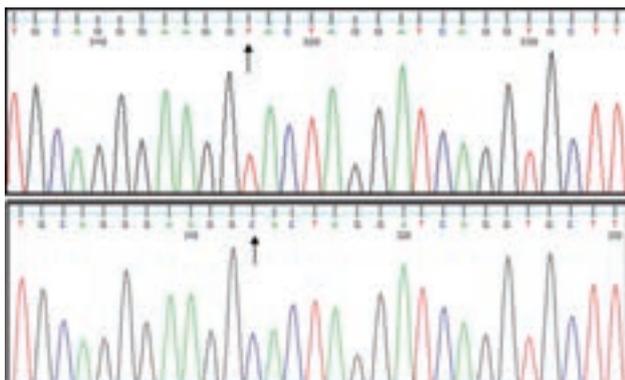


Figura 3. Cromatograma del exón 15 del gen FLT3. En el cromatograma del panel izquierdo se observa la secuencia de un individuo normal, en el panel derecho se aprecia el cromatograma del paciente 31 un cambio de una timina por citosina, c. 66.608T>C p.V615A. Secuencia de referencia utilizada NG_007066.

DISCUSIÓN

En este estudio se analizaron 31 pacientes con leucemia mieloide aguda de novo y se encontró que la prevalencia para la mutación FLT3-ITD fue de 9.4%, menor a la informada en la bibliografía: 15-35%.⁶ En Latinoamérica son pocas las publicaciones al respecto: en México Ruiz-Arguelles y colaboradores¹² encontraron una prevalencia de 13%, Gaich y su grupo¹³ en Argentina, de 16.7% y Lucena y colaboradores,¹⁴ en Brasil, de 23.6%. En Europa Gorin y su grupo¹⁵ informaron una prevalencia de 27.7% y Nazha y su grupo¹⁶ en Estados Unidos de 17.3%. Estas mutaciones se producen debido a diferencias en el número de duplicaciones (3-400 pb) que se originan en inestabilidad genética subyacente y cuya presencia parece incidir en el pronóstico adverso de FLT3-ITD en leucemia mieloide aguda,¹³ aunque en este estudio no se pudo determinar el tipo de repetición. Los pacientes con esta mutación fallecieron durante el transcurso de la investigación.

La baja prevalencia encontrada en nuestro estudio, comparada con las anteriores, podría explicarse por distintas razones: 1. Al alto rango de variación del alelo normal o al bajo porcentaje de mutaciones FLT3-ITD. 2. Diferencias en el tamaño de las poblaciones estudiadas. 3. En este estudio se incluyeron pacientes con leucemia mieloide aguda independiente del resultado del cariotipo. En otras investigaciones¹⁷ sólo se seleccionaron pacientes con cariotipo normal, que se clasifica como un subgrupo con alta incidencia de mutaciones moleculares. 4. Dife-

rencias en las metodologías utilizadas para detectar esta mutación.¹⁸ En este trabajo, y en el mexicano y argentino, se empleó electroforesis de gel de agarosa, mientras que en otros se utilizó electroforesis capilar y HRM (High Resolution Melting) que pueden ofrecer mayor sensibilidad. Por último, otros factores, que en la actualidad aún están en discusión plantean posibles diferencias con respecto a la raza y etnicidad.¹⁹

En el presente estudio se encontró asociación entre el hallazgo de la mutación FLT3-ITD y el recuento elevado de leucocitos, en comparación con los pacientes libres de mutación ($p=0.023$), lo que concuerda con lo informado en la bibliografía.²⁰ Con respecto a la caracterización citogenética, dos de los tres pacientes con mutaciones FLT3-ITD tenían cariotipo normal (subtipos FAB M1, M2) y otro cariotipo complejo (subtipo FAB M5). Otro hallazgo importante en este trabajo fue la mutación puntual adicional en uno de los pacientes con FLT3-ITD en el que se observó un cambio de timina por citosina, 30712T>C p.V615A. Esta mutación sólo se ha informado en la base de datos COSMIC en pacientes con cáncer de ovario y se desconocen sus implicaciones en pacientes con leucemia mieloide aguda. Estudios previos han informado mutaciones puntuales en ITD y en el dominio tirosina cinasa TKD, que pueden afectar el marco de lectura o ser mutaciones sin sentido. Al respecto, Mills y su grupo,²¹ en un estudio de 235 casos de leucemia mieloide aguda identificaron mutaciones puntuales ITD en los codones 835/836/839 en 13.6% (35 muestras). Gianfelici y su grupo publicaron, en 2011, una revisión en la que informaron varias mutaciones puntuales en dominio yuxtamembrana del FLT3: Y591C, F594L, F590G, Y591D, V579A, V592A, S574G, E598G, K567I, V579Q, F594I.²² Estudios recientes se han enfocado en identificar mutaciones puntuales en el dominio JM en pacientes con leucemia mieloide aguda y establecer su valor pronóstico. En este estudio no se hizo seguimiento de los pacientes, por lo que no se pudo corroborar el pronóstico adverso que confiere esta mutación en lo que respecta al mayor riesgo relativo, menor supervivencia libre de enfermedad y menor supervivencia general. En nuestra población estudiada no se detectaron mutaciones puntuales del gen FLT3 en el dominio TKD.

Entre las limitaciones en la realización de este estudio pueden considerarse: el bajo número de pacientes reclutado que impidió analizar, apropiadamente, las variables estu-

diadas y, por tanto, emitir conclusiones definitivas, sobre todo las relacionadas con la constitución del cariotipo y estratificación, grupo de riesgo y tipo de mutación.

CONCLUSIONES

En este estudio se encontró que la frecuencia de la mutación *FLT3 ITD* (9.4%) en los pacientes con leucemia mieloide aguda fue más baja que la reportada en la bibliografía (20-35%) y no se halló en ningún caso la mutación *FLT3 TK*. Además, se confirmó que la mutación *FLT3 ITD* se asocia con recuentos altos de leucocitos en pacientes con leucemia mieloide aguda y que no hay diferencia significativa en el número de plaquetas y porcentaje de blastos entre los individuos con la mutación y negativos para *FLT3 ITD*. Debido a la baja frecuencia de la mutación *FLT3 ITD* en este estudio, no se pudo determinar la relación de ésta con la clasificación *FAB*. Además, se plantea la necesidad de estudiar otros genes involucrados en la patología molecular de la leucemia mieloide aguda, como *CEBPA*, *EVII*, *BAALC*, *KIT*, *MLL* y valorar la importancia de estos genes en nuestros pacientes. Por último, es prioritaria la realización de estudios multicéntricos con el fin de confirmar la frecuencia de mutaciones en *FLT3* y evaluar este gen en el algoritmo diagnóstico de los pacientes con leucemia mieloide aguda en nuestro país, con el propósito de brindarles un tratamiento adecuado, oportuno e incrementar la supervivencia.

Entre las recomendaciones para la elaboración de trabajos futuros donde se evalúe la mutación *FLT3 ITD* se encuentran: utilizar métodos más sensibles de separación de productos amplificados, como gel de poliacrilamida, detección de mutaciones HRM (High Resolution Melting) y secuenciamiento de nueva generación, de tal manera que se puedan obtener resultados concluyentes acerca de la inserción de nucleótidos. Asimismo, realizar investigaciones para el estudio de estos genes en muestras poblacionales más grandes, que sea representativa para la extrapolación de resultados.

Agradecimientos

A los pacientes, médicos hematólogos e instituciones que colaboraron con la ejecución del proyecto. Al joven investigador Juan David Vélez Aguirre, estudiante de Medicina de la Universidad de Antioquia, por su colabo-

ración durante el proyecto. Este trabajo de investigación fue financiado por la Universidad de Antioquia. Proyecto CODI - CPT-0703.

REFERENCIAS

1. Vardiman JW, Matutes E, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Tefferi A, et al. Therapy related myeloid neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: IARC, 2008;127-129.
2. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012;366:1079-1089.
3. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters C, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom. Research Council trials. *Blood* 2010;116:354-365.
4. Takahashi S. Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. *J Hematol Oncol* 2011;4:13.
5. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1911-1918.
6. Hatzimichael E, Georgiou G, Benetatos L, Briasoulis E. (Review Article) Gene mutations and molecularly targeted therapies in acute myeloid leukemia. *Am J Blood Res* 2013;3:29-51.
7. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, et al. Cooperating gene mutation in acute myeloid leukemia: a review of literature. *Leukemia* 2008;22:915-931.
8. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, et al. 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;100:59-66.
9. GLOBOCAN 2008 (IARC) Section of cancer information (26762013)
10. Instituto Nacional de Cancerología. Anuario estadístico 2008, Santafé de Bogotá, Colombia.
11. Kiyoi H, Naoe T. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Methods in Molecular Medicine, Myeloid Leukemia. Methods and Protocols* 2006;125:189-197.
12. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Alarcón-Urdaneta C, Lutz-Presno J, Ruiz-Delgado GJ. Primary FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) mutations in Mexican mestizo patients with de novo acute myelogenous leukemia. Presentado como cartel en XXXIV World Congress-ISH / LIII Congreso Nacional - AMEH, Cancún, abril de 2012. Citado en: Cuervo-Sierra J, Jaime-Pérez JC, Gómez-Almaguer D. Mutaciones del módulo FLT3 en leucemia aguda mieloblástica. *Rev Hematol Mex* 2012;13:177-184.
13. Gaich Pamela B, Sastre Darío A, Rodríguez CM. Prevalencia de mutaciones flt3 en leucemias mieloblásticas agudas. www.cobico.com.ar/...dad-cientifica/publicaciones.

14. Lucena-Araujo AR, Souza DL, Morato de Oliveira F, Benicio MT, Figueiredo-Pontes LL, Santana-Lemos BA, et al. Results of FLT3 mutation screening and correlations with immunophenotyping in 169 Brazilian patients with acute myeloid leukemia. *Annals of Hematology* 2010;89:225-228.
15. Gorin NC, Labopin M, Meloni G, Pigneux A, Esteve J, Mohty M. Impact of FLT3 ITD/NPM1 mutation status in adult patients with acute myelocytic leukemia autografted in first remission. *Haematologica* 2013;98:e12.
16. Nazha A, Cortés J, Faderl S, Pierce S, Daver N, Kadia T, et al. Activating internal tandem duplication mutations of the fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3-ITD) at complete response and relapse in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2012;97(8):1242-1245.
17. Ghanem H, Tank N, Tabbara IA. Prognostic implications of genetic aberrations in acute myelogenous leukemia with normal cytogenetics. *Am J Hematol* 2012;87:69-77.
18. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel M, Platzecker U, 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;99:4326-4335.
19. Goldschmidt N, Cohen SB, Gatt ME, Safrai M, Rund D. Influence of ethnicity and improved outcome of acute myeloid leukaemia: two decades of follow-up of Israeli patient cohort. *Hematol Oncol* 2013 Sep. Published online.
20. Daver N, Strati P, Jabbour E, Kadia T, Luthra R, Wang S, et al. FLT3 mutations in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *American Journal of Hematology* 2013;88:56-59.
21. Mills KI, Gilkes AF, Walsh V, Sweeney M, Gale R. Rapid and sensitive detection of internal tandem duplication and activating loop mutations of FLT3. *British Journal of Haematology* 2005;130:203-208.
22. Gianfelici V, Diverio D, Breccia M, Buffolino S, Derme V, Di Lascio A, et al. A novel point mutation within the juxtamembrane domain of the flt3 gene in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2011;90:845-846.