

Mutación *FLT3-ITD* y su relación con variables hematológicas y clínicas en individuos con Leucemia Mieloide Aguda

FLT3-ITD mutation and its relationship with hematological and clinical variables in individuals with Acute Myeloid Leukemia

A mutação *FLT3-ITD* e sua relação com variáveis hematológicas e clínicas em indivíduos com leucemia mielóide aguda

Fanny Calderón Calle
fvikicalderon@hotmail.com
ORCID: 0000-0003-2076-9776

Carem Francelys Prieto Fuenmayor
carem.prieto@ucacue.edu.ec
ORCID: 0000-0002-7752-932X

Universidad Católica de Cuenca, Cuenca-Ecuador

Recibido 20 de noviembre 2020 | Arbitrado y aceptado 9 de diciembre 2020 | Publicado en 04 de enero 2021

RESUMEN

Introducción. La Leucemia Mieloide Aguda es la neoplasia hematológica más común, caracterizada por una proliferación incontrolada de células madre hematopoyéticas. La mutación *FLT3/ITD* se presenta en aproximadamente el 30% de todos los pacientes con esta patología, se asocia con mayor riesgo de recaída y menor supervivencia. El *FLT3-ITD* puede usarse como un factor pronóstico de la gravedad de esta patología, importante para predecir los resultados clínicos en pacientes con LMA. **Objetivo.** El objetivo de este estudio fue relacionar la mutación *FLT3/ITD* con variables hematológicas y clínicas en pacientes diagnosticados con Leucemia Mieloide Aguda atendidos en la Sociedad de Lucha contra el Cáncer (SOLCA) de la ciudad de Cuenca, periodo 2013 –2020. **Métodos.** Se obtuvieron los datos a partir de registros secundarios registrados una base de datos del hospital, el universo de la muestra lo constituyeron 63 pacientes, diagnosticados con LMA, se les analizó la mutación *FLT3/ITD* por PCR Convencional. **Resultados.** Se encontró la presencia de la mutación en un 9.5% y una asociación significativamente estadística con alteraciones hematológicas relacionados con niveles de hemoglobina anormal ($p=0,037$) y ratio 6,63 y LDH elevada en 1,21 veces ($p=0,024$); recuento elevado de leucocitos y blastos ($p=0,031$). Los individuos portadores de la mutación se presentó con mayor incidencia en el sexo masculino y grupo etario adulto mediano (45-64 años). **Conclusiones.** La literatura internacional afirma que la mutación *FLT3/ITD* en un importante marcador pronóstico; debido a su baja frecuencia, no se pudo determinar una relación estadísticamente significativa con otras variables clínicas en este estudio.

Palabras clave: Duplicación Interna en Tándem; Leucemia Mieloide Aguda; Lactato Deshidrogenasa; Tirosina quinasa

ABSTRACT

Introduction. Acute Myeloid Leukemia is the most common hematological neoplasm, characterized by an uncontrolled proliferation of hematopoietic stem cells. The *FLT3 / ITD* mutation occurs in approximately 30% of all patients with this pathology, it is associated with a higher risk of relapse and lower survival. *FLT3-ITD* can be used as a poor prognostic factor, important for predicting clinical outcomes in patients with AML. **Objective.** The objective of this study was to characterize the *FLT3 / ITD* mutation and its relationship with hematological and clinical variables in patients diagnosed with Acute Myeloid Leukemia treated at SOLCA in the city of Cuenca, period 2013-2020. **Methods.** Data were obtained from secondary records in a hospital database, the universe of the sample was made up of 63 patients, diagnosed with AML, and the *FLT3 / ITD* mutation was analyzed by Conventional PCR. **Results.** The presence of the mutation was found in 9.5% and a statistically significant association with hematological alterations related to abnormal hemoglobin levels ($p = 0.037$) and ratio 6.63 and LDH elevated in 1.21 times ($p = 0.024$); Elevated leukocyte and blast count ($p = 0.031$). Individuals carrying the mutation had a higher incidence in males and in the middle adult age group (45-64 years). **Conclusions.** The international literature affirms that the *FLT3 / ITD* mutation is an important prognostic marker; Due to its low frequency, it was not possible to determine a statistically significant relationship with other clinical variables in our study, for which it is suggested to expand the universe of the sample.

Key words: Internal Tandem Duplication; Leukemia Myeloid Acute; Lactate dehydrogenase; Tyrosine kinase

FC: Licenciada en Laboratorio Clínico. Experiencia en el área de biología molecular con aplicación en el diagnóstico Oncohematológico y diagnóstico molecular de enfermedades virales e infecciosas. Universidad Católica de Cuenca, Ecuador.

CP: Licenciada en Bioanálisis. Magister Scientiarum en Metabolismo Humano. Doctora en Ciencias de la Salud. Docente universitaria en el área de biología celular y molecular y bioquímica, con amplia experiencia en investigación en biología molecular. Universidad Católica de Cuenca, Ecuador.

FC: Licenciada en Laboratorio Clínico. Experiencia en el área de biología molecular con aplicación en el diagnóstico Oncohematológico y diagnóstico molecular de enfermedades virales e infecciosas. Universidad Católica de Cuenca, Ecuador.

CP: Licenciada en Bioanálisis. Magister Scientiarum en Metabolismo Humano. Doctora en Ciencias de la Salud. Docente universitaria en el área de biología celular y molecular y bioquímica, con amplia experiencia en investigación en biología molecular. Universidad Católica de Cuenca, Ecuador.

RESUMO

Introdução. A Leucemia Mielóide Aguda é a malignidade hematológica mais comum, caracterizada pela proliferação descontrolada de células-tronco hematopoiéticas. A mutação *FLT3/ITD* está presente em aproximadamente 30% de todos os pacientes com esta patologia, e está associada a um maior risco de recaída e menor sobrevida. O *FLT3-ITD* pode ser usado como um fator prognóstico para a gravidade desta patologia, importante para prever os resultados clínicos em pacientes com LMA. **Objetivo.** O objetivo deste estudo foi relacionar a mutação *FLT3/ITD* com variáveis hematológicas e clínicas em pacientes diagnosticados com leucemia mielóide aguda tratados na Sociedade de Luta contra o Câncer (SOLCA) na cidade de Cuenca, período 2013 - 2020. **Métodos.** Os dados foram obtidos de registros secundários registrados em um banco de dados hospitalar, o universo da amostra consistiu de 63 pacientes diagnosticados com AML, eles foram analisados para a mutação *FLT3/ITD* por PCR convencional. **Resultados.** A presença da mutação foi encontrada em 9,5% e uma associação estatística significativa com alterações hematológicas relacionadas a níveis anormais de hemoglobina ($p=0,037$) e relação 6,63 e LDH elevada em 1,21 vezes ($p=0,024$); contagem elevada de leucócitos e explosões ($p=0,031$). Os indivíduos portadores da mutação ocorreram com maior incidência no sexo masculino e na faixa etária média adulta (45-64 anos). **Conclusões.** A literatura internacional afirma que a mutação *FLT3/ITD* em um marcador prognóstico importante; devido a sua baixa frequência, uma relação estatisticamente significativa com outras variáveis clínicas não pôde ser determinada neste estudo.

Palavras-chave: Duplicação Tandem interna; Leucemia mielóide aguda; Desidrogenase láctica; Tirosina quinase

INTRODUCCIÓN

Las Leucemias Mieloides Agudas (LMA) son un grupo de trastornos hematológicos malignos de progresión rápida. Representan entre el 15 y el 20% de las leucemias agudas en niños y el 80% en adultos (1). Les cataloga como un conjunto de enfermedades fenotípica y genéticamente heterogéneas, originadas por la acumulación de mutaciones en una célula madre hematopoyética; la duplicación interna en tándem en el gen de la tirosina quinasa 3 similar a FMS (*FLT3/ITD*), es una de las mutaciones de gran importancia para su estudio (2).

FLT3 pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa (TK) de clase III; es un receptor de membrana, con un dominio TK, que regula la diferenciación y la proliferación celular (3), está localizado en el cromosoma 13q12, y comprende 24 exones que varían en su tamaño desde 83 pb hasta 562 pb, y abarcan 100 kb aproximadamente (1). Las mutaciones en

el gen *FLT3* son las más frecuentes en LMA y dentro de ellas las duplicaciones internas en tándem (*FLT3-ITD*) en el dominio yuxtamembrana (4). Las mutaciones *FLT3 / ITD* se agrupan en exones (11 al 15) del gen *FLT3*. Estas mutaciones normalmente consisten en una secuencia insertada en el marco análogo al fragmento de la proteína entre los aminoácidos de la proteína FLT3 (5,6). Esta alteración de la secuencia nucleotídica se relaciona con mayores tasas de recaída y disminución de supervivencia, con una prevalencia entre 20% y 27%. *FLT3/ITD* es especialmente frecuente en pacientes con cariotipo normal y con anomalía cromosómica de la t (15,17,(4,7,8).

En pacientes con LMA, se asocia con un alto porcentaje de células blásticas, mayor riesgo de recaída por remisión completa y supervivencia menor (9,10). Estudios de correlación detallan que la mutación *FLT3/ITD* se observa en pacientes masculinos preponderantemente con recuentos de

leucocitos altos y lactato deshidrogenasa (LDH) elevados. También se correlaciona en pacientes con FAB M1 y M4 (11,12).

Debido a la importancia que tiene el diagnóstico de la mutación *FLT3/ITD* en pacientes con LMA es importante obtener este dato ya que los pacientes que presentan la mutación tienen un pronóstico desfavorable, con una mayor tasa de recaída y una supervivencia general inferior en comparación con los pacientes con LMA sin esta mutación (13).

Actualmente en Ecuador, no existen estudios que relacionen la incidencia del gen *FLT3* con LMA. El diagnóstico oportuno, permitirá un manejo adecuado de pacientes con LMA ya que este tipo de leucemias, tienen un comportamiento agresivo que puede provocar la muerte a corto plazo. Un tratamiento acertado mejora la sobrevida del paciente, permitiéndole a su vez una mejor calidad de vida.

El presente estudio tuvo como objetivo relacionar la mutación *FLT3/ITD* con variables hematológicas y clínicas en pacientes diagnosticados con Leucemia Mieloide Aguda atendidos en la Sociedad de Lucha contra el Cáncer (SOLCA) de la ciudad de Cuenca en Ecuador, periodo 2013 –2020.

MATERIALES Y MÉTODOS

El universo del estudio estuvo conformado por los registros de los pacientes diagnosticados con LMA en SOLCA en la ciudad de Cuenca en Ecuador, durante el periodo 2013-2020, de los cuales para la muestra del estudio se usaron un total de 63 registros pacientes aislados los cuales constituyen la totalidad de la muestra. Para este estudio se incluyeron los individuos que fueron diagnosticados con LMA e individuos a los

que se realizó la detección molecular *FLT3/ITD* y se excluyeron los individuos que fueron diagnosticados con LMA pero que tuvieron una concentración de ARN menor de 10 ng/ μ y un radio de pureza menor a 2.

En cuanto a los métodos, técnicas e instrumentos de investigación o recolección de datos, los datos sociodemográficos y de interés médico clínico fueron obtenidos a partir de registros secundarios en una base de datos del hospital, donde se tuvo acceso previa aprobación del Comité Científico de la institución.

En relación a la extracción del ARN se realizó a partir de sangre periférica o médula ósea utilizando el protocolo indicado con el reactivo de TRIzol LS Reagent (ambión), con modificaciones del Laboratorio de Biología Molecular SOLCA-Cuenca.

En un tubo de centrifuga de 1.5 ml se agregó 1ml de TRIzol, se añadió 200 μ de sangre periférica o médula ósea, aplicando vortex por 15 sg, añadiendo 200 μ de cloroformo, se aplicó vortex por 15 sg, centrifugando a 10000 rev por 10 min a 4°C.

En un tubo de centrifuga de 1.5 ml se adicionó 600ul de isopropanol y se agregó el sobrenadante del tubo centrifugado, se mezcló por inversión, llevando a centrifugación a 10000 rev por 10 min a 4°C y desechando el sobrenadante del tubo.

Se Agregó 1 ml de ethanol al 70% al botón de precipitado, aplicando vortex suavemente, llevando a centrifugación a 10.000 rev por 10 min a 4°C, se desechó el sobrenadante, se incubó 10 min a 37°C para secar, se agregaron 50 μ de agua grado molecular para rehidratar el botón de precipitado, incubando la muestra a

56°C por 5 min y guardando la muestra en un congelador a - 30°C para su conservación.

La técnica de cuantificación del ARN total se realizó mediante espectrofotometría a 260 -280 nm, para esto se utilizó un espectrofotómetro GeneQuant pro, en el que se introdujeron 12 µ de cada una de las muestras, determinando la concentración en ng/ µ y el radio de pureza de cada una de las muestras. Las muestras reunieron los requisitos de pureza y concentración.

Para la amplificación del cDNA el volumen total de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para cada una de las muestras se utilizó, agua grado molecular 1 µ, Random Primer 2 µ, (Invitrogen) y ARN 7.5 µ, y se llevó al termociclador 10 min a 65 C.

Posteriormente se preparó una mezcla para la PCR en donde se utilizó, buffer 5x 4 µ (Invitrogen), DTT 0.1 M 2 µ (Invitrogen) y DNTP's 10 mM (Invitrogen) 2 µ, RNAout 0.5 µ (Invitrogen). Se agregó a cada tubo 8.5 µ de la mezcla, y 1 µ de Superscrit III (Invitrogen). Cada uno de los tubos de reacción contenía 12.5 µ de la mezcla y 7.5 µ de muestra de ARN.

Cada reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo 9700 de Applied Biosystems, el programa de termociclado empezó con una hibridación a 65°C por 10 min, seguido por el protocolo de amplificación 1 ciclo de 60 min a 37 C, 1 ciclo de 5 min a 99 C y 5°C por 5 min.

Para la amplificación del Gen *FLT3/ITD* por PCR punto final se utilizó,

agua grado molecular 35 µ (Invitrogen), Buffer 10 x Tipo II 5 µ (Applied Biosystems), MgCl₂ 25 Mm 10.5 µ (Applied Biosystems), DNTPS 10 Mm 3 µ (Applied Biosystems), PRIMER FW 3 µ (Invitrogen), PRIMER RW 3 µ (Invitrogen), AmpliTaq Gold 250U (5U/ µ) 0.5 µ (Applied Biosystems). Cada uno de los tubos contenía un volumen final 47 µ de la mezcla más 3 µ del cDNA.

La secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de *FLT3/ITD* fue:

FLT3 FW 5' CAA GTA CAA AAA GCA ATT TAG G 3'

FLT3 RW 5' GCT GTC TGC TTT TTC TTT CAG 3'

Cada reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo 9700 Applied Biosystems, el programa de termociclado empezó con una incubación a 94 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55,5 °C y 1 min a 72 °C. Además, un ciclo final de extensión a 72 °C por 5 min.

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2%, al cual se adicionó 10 µ de bromuro de etidio. Al producto amplificado se le agregó 3 µ de azul de bromofenol. Se realizó una corrida constante de 120V por 45 min. Los resultados fueron visualizados utilizando un transiluminador UV, utilizando un equipo de foto documentación, observándose la banda amplificada del control interno a 265 pb y una banda a 360 pb correspondiente al *FLT3* mutado.(Ver Figura 1).

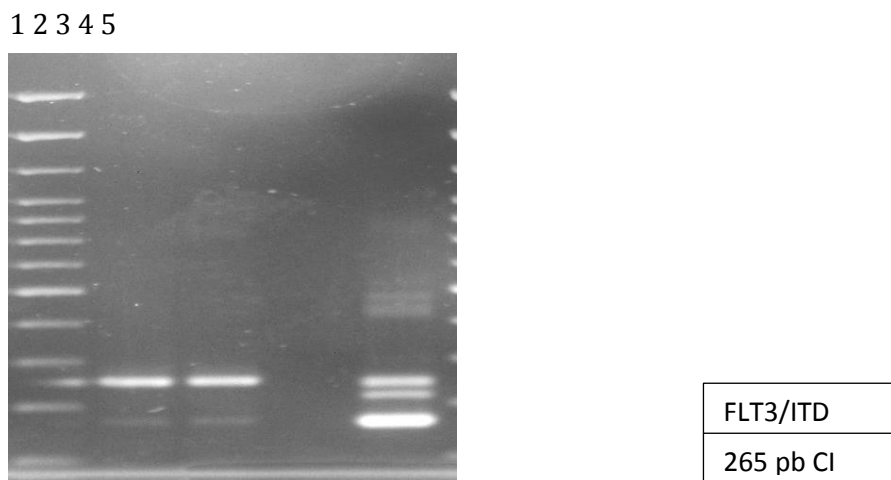


Figura 1. Gel de agarosa, donde se observa los productos de amplificación por RT-PCR para la mutación *FLT3/ITD* en 2 pacientes (carriles 2,3); control negativo (carril 4); control positivo *FLT3/ITD* (carril 5). La banda inferior corresponde al gen normal y la banda superior al gen *FLT3* mutado. Las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio; en el carril 1 se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb.

Para el procesamiento, resumen y presentación de la información (Tablas, Gráficos y Técnicas de análisis estadístico) se generó una base de datos en el programa SPSS 15, las variables cualitativas se exponen en tablas de frecuencia y porcentajes, para conocer la normalidad de las variables se utilizó la prueba de Kolmogórov-Smirnov, se aplicó para las variables que resulten normales, se utilizaron medidas de tendencia central media para variables no normales la mediana y el rango intercuartil. Se realizaron las frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación y para realizar contrastes entre grupos por variables se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. Para verificar la asociación entre la presencia de la mutación y la alteración de las variables de estudio se utilizó ODD ratio, intervalo de confianza de 95%, un valor será estadísticamente significativo cuando la p sea menor a 0.05.

El procedimiento de investigación siguió las normas éticas para la

investigación con seres humanos, establecidas en la declaración de Helsinki, específicamente en sus adendum Declaración de Taiwan del año 2016, Declaración de la Asociación Médica Mundial (AMM), sobre las consideraciones éticas de las bases de datos de salud y biobancos. Se contó con la aprobación de la Comisión Científica del Instituto del Cáncer de la ciudad de Cuenca para la utilización de los datos para la investigación. El uso de los datos derivará en beneficio total de la sociedad como fue planteado en la justificación de la investigación. Se protegerá la dignidad, autonomía, privacidad y confidencialidad de los participantes en la investigación en todo momento. Los datos serán resguardados siendo usados exclusivamente por el investigador para los fines declarados en esta investigación. Los resultados presentados serán totalmente anónimos y los datos estarán codificados, de modo que se asegure la privacidad del paciente. Los

pacientes podrán retirar sus datos cuando lo deseen.

RESULTADOS

La muestra total constituyó el registro de 63 pacientes diagnosticados con LMA, los cuales cumplieron con los criterios de inclusión establecidos para este estudio. De estos, 27 corresponden a pacientes de sexo femenino que representa el 42,9%, 36 pacientes son de sexo masculino que corresponde a 57,1 %. En el grupo etario, el 9,7% (6) corresponde a pacientes que se encuentran en el rango de 0 a 9 años, 10

pacientes (16,1%) se encontraban en el rango de edad entre 10 a 19 años, dentro del rango de edad catalogada como adulto joven (20 a 44 años) también otros 19 pacientes que corresponde al 30,6 %, el 24,2 % (15) se encuentran dentro del rango de 45 a 64 años, por último encontramos 12 pacientes (19,4 %) mayores a 64 años. La mayoría de pacientes con la mutación *FLT3/ITD* fueron del sexo masculino (4/ 66,7%). Dentro del grupo etario correspondiente a adulto mediano encontramos 3 pacientes (50,0 %), 2 pacientes (33,3%) corresponden al grupo de adultos mayores (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Variables sociodemográficas en pacientes diagnosticados con LMA evaluados según sexo, grupo etario y diagnóstico de la mutación *FLT3/ITD* atendidos en SOLCA de la ciudad de Cuenca periodo 2013–2019.

Variables sociodemográficas	MUTACIÓN <i>FLT3/ITD</i>						
	TODOS		NEGATIVO		POSITIVO		
	n	%	n	%	n	%	
SEXO	Femenino	27	42,9	25	43,9	2	33,3
	Masculino	36	57,1	32	56,1	4	66,7
	Niñez 0-9	6	9,7	6	10,7	0	0,0
Grupo etario	Adolescente 10-19	10	16,1	10	17,9	0	0,0
	Adulto joven 20-44	19	30,6	18	32,1	1	16,7
	Adulto mediano 45-64	15	24,2	12	21,4	3	50,0
	Adulto mayor >64	12	19,4	10	17,9	2	33,3

Edad mediana (rango intercuartílico): Todos= 35 (21,5); Negativo= 34(21,5); Positivo= 56 (11,5).

La presencia de la mutación *FLT3/ITD*, se encontró en 6 pacientes positivos que corresponde al 9,5 %, 57 pacientes resultaron negativos (90,5%). (Ver Tabla 2).

Tabla 2. Presencia de la Mutación *FLT3/ITD* en pacientes con LMA

Diagnóstico de la Mutación <i>FLT3/ITD</i>	n	%
Negativo	57	90,5
Positivo	6	9,5
Total	63	100,0

El subtipo morfológico más frecuente fue la LMA M0 con un 20,6% (13), le sigue LMA M1 con el 17,5 % (11) LMA M2 15,9% (10), LMA M3 con el 12,7%(8), LMA M4 con el 11,1% (7), LMA M5 con el 9,5%.

También se muestran los resultados de pacientes con mutación *FLT3/ITD*, la LMA M4 representa el 33,3% (2) LMA M5 con un 33%, LMA M0 y LMA M3 con el 16,7% cada uno. (Ver Tabla 3).

Tabla 3. Subtipo morfológico según el diagnóstico de la mutación *FLT3/ITD* en pacientes atendidos en SOLCA de la ciudad de Cuenca periodo 2013-2019.

SUBTIPO MORFOLOGICO	TODOS		MUTACIÓN <i>FLT3/ITD</i> NEGATIVO		POSITIVO	
	n	%	n	%	n	%
LMA M0	13	20,6	12	21,1	1	16,7
LMA M1	11	17,5	11	19,3	0	0,0
LMA M2	10	15,9	10	17,5	0	0,0
LMA M4	7	11,1	5	8,8	2	33,3
LMA M3	8	12,7	7	12,3	1	16,7
LMA M5	6	9,5	4	7,0	2	33,%
LMA	6	9,5	6	10,5	0	0,0
LMA M6	1	1,6	1	1,8	0	0,0
LMA M7	1	1,6	1	1,8	0	0,0

En las características hematológicas de los pacientes con LMA se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de blastos entre los pacientes positivos y negativos para *FLT3/ITD*, presentándose valores superiores en

porcentaje de blastos en pacientes con la mutación con significación estadística. En lo que respecta a la cantidad de glóbulos blancos se presentan cifras anormales en los pacientes portadores de la mutación. (Ver Tabla 4).

Tabla 4. Características hematológicas de los pacientes diagnosticados con LMA objetos de estudio, según el diagnóstico de la mutación *FLT3/ITD* atendidos en SOLCA de la ciudad de Cuenca periodo.

VARIABLES HEMATOLÓGICAS	Todos Mediana (RI)	Mutación <i>flt3</i>		p.
		Negativo Mediana (ri)	Positivo Mediana (ri)	
Glóbulos blancos (CELS/MM3)	8400 (22150)	8400 (13315)	41900 (56150)	0,140
Hemoglobina (MG/DL)	8,60 (2,20)	8,50 (1)	10,05 (3)	0,140
PLAQUETAS (CELS/MM3)	45000 (96000)	45000 (44500)	58500 (63500)	0,623
LDH (U/L)	351 (578)	314 (291)	662 (547)	0,121
%BLASTOS	61,54 (58,64)	59,72 (29)	89,43 (5)	0,031

RI: Rango Intercuartilico

En las variables clínicas, se apreció que un 58,7% de los individuos recayó y 38,1% falleció; con respecto a los individuos negativos para la mutación *FLT3/ITD* el 57,9% recayeron y fallecieron

el 35,1% y de los pacientes que portaban la mutación la mayoría recayó (66,7%) y al igual que los individuos que fallecieron (66,7%). (Ver Tabla 5).

Tabla 5. Variables clínicas de los individuos estudiados: supervivencia, remisión, muerte.

Variables clínicas	MUTACIÓN <i>FLT3/ITD</i>						
	TODOS		NEGATIVO		POSITIVO		
	n	%	n	%	n	%	
Condición	Recaída	37	58,7	33	57,9	4	66,7
	Remisión	13	20,6	13	22,8	0	0,0
	Inicio	11	17,5	9	15,8	2	33,3
	Refractaria	2	3,2	2	3,5	0	0,0
Est actual	Fallece	24	38,1	20	35,1	4	66,7
	Vivo	19	30,2	18	31,6	1	16,7
	Sin dato	20	31,7	19	33,3	1	16,7

Se estudió la asociación entre las variables sexo, grupo etario, subtipo morfológico, glóbulos blancos, hemoglobina, plaquetas, LDH, remisión y muerte con la mutación *FLT3/ITD* encontrándose una asociación estadísticamente significativa en relación a la hemoglobina ya que los pacientes con *FLT3/ITD* tienen valores anormales de la

misma demostrándose que los portadores de esta mutación tienen 6,63 más posibilidades de tener anomalías en los niveles de hemoglobina (IC.1,00- 47,91, p. 0,037). También se encontró la LDH se encontraba elevada en 1,21 veces con mayor frecuencia en los portadores de la mutación, (=p 0,024) en pacientes positivos para la mutación con respecto a

los negativos para mutación. En todas las demás variables evaluadas no se encontró asociación estadísticamente significativa con la mutación determinada en el presente estudio (Ver Tabla 6).

Tabla 6. Asociación de la presencia de la mutación *FLT3-ITD* con las características sociodemográficas, hematológicas y clínicas en pacientes objetos de estudio.

VARIABLES		TODOS		MUTACIÓN <i>FLT3/ITD</i>				p-OR. IC
				NEGATIVO		POSITIVO		
		n	%	n	%	n	%	
Sexo	Femenino	27	42,9	25	43,9	2	33,3	0,620 1,56
	Masculino	36	57,1	32	56,1	4	66,7	0,23- 9,23
Grupo etario	Niñez 0-9	6	9,7	6	10,7	0	0,0	
	Adolescente 10-19	10	16,1	10	17,9	0	0,0	
	Adulto joven 20-44	19	30,6	18	32,1	1	16,7	0,33 ---
	Adulto mediano 45-64	15	24,2	12	21,4	3	50,0	-----
Subtipo morfológico	Adulto mayor >64	12	19,4	10	17,9	2	33,3	
	Lma m0	13	20,6	12	21,1	1	16,7	
	Lma m1	11	17,5	11	19,3	0	0,0	
	Lma m2	10	15,9	10	17,5	0	0,0	
	Lma m4	7	11,1	5	8,8	2	33,3	0,26
	Lma m3	8	12,7	7	12,3	1	16,7	---
	Lma 5	6	9,5	4	7,0	2	33,3	-----
	Lma	6	9,5	6	10,5	0	0,0	
Glóbulos blancos	Lma m6	1	1,6	1	1,8	0	0,0	
	Lma 7	1	1,6	1	1,8	0	0,0	
Hemoglobina	Normal	7	11,1	5	8,8	2	33,3	0,15 ---
	Anormal	56	88,9	52	91,2	4	66,7	-----
Plaquetas	Normal	6	9,5	4	7,0	2	33,3	0,037 6,63
	Anormal	57	90,5	53	93,0	4	66,7	1,00- 47,91
Plaquetas	Normal	10	15,9	8	14,0	2	33,3	0,219 0,33
	Anormal	53	84,1	49	86,0	4	66,7	0,05- 2,09

VARIABLES		TODOS		MUTACIÓN <i>FLT3/ITD</i>				p. OR. IC
				NEGATIVO		POSITIVO		
		n	%	n	%	n	%	
Ldh	Normal	26	43,3	26	48,1	0	0,0	0,024 1,21 1,04- 1,42
	Elevado	34	56,7	28	51,9	6	100,0	
	Recaída	37	58,7	33	57,9	4	66,7	
Condición	Remisión	13	20,6	13	22,8	0	0,0	0,456
	Inicio	11	17,5	9	15,8	2	33,3	-----
	Refractaria	2	3,2	2	3,5	0	0,0	
Estado actual	Fallece	24	38,1	20	35,1	4	66,7	0,317
	Vivo	19	30,2	18	31,6	1	16,7	-----
	Sin dato	20	31,7	19	33,3	1	16,7	---

DISCUSIÓN

Las LMA representan entre 15 y el 20% de las leucemias agudas en niños y el 80% en adulto, la duplicación interna en tándem en el gen de la tirosina quinasa 3 *FLT3/ITD*, es una de las mutaciones de gran importancia para su estudio (1). Ya que esta alteración se relaciona con mayores tasas de recaída y disminución de supervivencia, con una prevalencia entre 20% y 27%. *FLT3/ITD* es frecuente en pacientes con cariotipo normal y con anormalidad cromosómica de la t (15,17) (4,7,8). Las LMA se asocian también con un alto porcentaje de células blásticas. Estudios de correlación detallan que la mutación *FLT3/ITD* se observa en pacientes masculinos preponderantemente con recuentos de leucocitos altos y LDH elevados, también se correlaciona en pacientes con FAB M1 y M4 (11,12).

En el presente estudio se encontró en un total de 63 pacientes una frecuencia de 6 casos positivos que representa el 9.5% para la mutación *FLT3/ITD*, en relación a la reportado a nivel mundial de *FLT3-ITD* en adultos con LMA que va desde el 15 al 35% (14–16).

Jiménez et al (17). realizaron un estudio en 31 pacientes con LMA de novo en el cual reportan una prevalencia para *FLT3-ITD* de 9.4%, estos datos concuerdan con este estudio ya que las muestras estudiadas son similares. En México Ruiz-Arguelles et al (18), encontraron una prevalencia de 13%, Gaich et al (19). en Argentina señalan una incidencia del 16.7%, Lucena et al (20). en Brasil, reportaron un 23.6%. En Europa Gorin et al (21). informaron una prevalencia de 27.7% y Nazha et al (22). en Estados Unidos de 17.3%. En Pakistan Ishsaq et al (5). encontraron la incidencia de ésta mutación en 4 (13,3%) en LMA y en 1 (4%) en ALL en un total de 55 pacientes.

En 2015 Yanus et al (9) en un estudio con pacientes de LMA revelaron mutaciones dentro del dominio JM en el 13% (7/54), seis de ellos eran *FLT3-ITD*. Pajuela (11). Realizó la detección cualitativa de la mutación *FLT3/ITD* en un total de 389 pacientes, la cual fue detectada en 95 pacientes (24%). Mahmood et al. (12). encontraron una frecuencia de la mutación *FLT3-ITD* del 18,5%. Elyamany G et al (23). han informado de una frecuencia del 14,4% en los pacientes con LMA de Arabia Saudita. Se encontraron mutaciones *FLT3-ITD* en el 19,2% de los pacientes con LMA en Tailandia por Kumsaen P et al. (12).

Al comparar estas investigaciones con los resultados que se obtuvieron en este estudio, destaca que la presencia de la mutación *FLT3/ITD*, es menor debido principalmente a la limitante de muestras con la que se trabajó en este estudio (63 pacientes). En un estudio realizado en Costa Rica entre 14 pacientes pediátricos con LMA encontraron una prevalencia del 14,3% para *FLT3* mutado. En una población argentina pediátrica, Alonso et al (24). estudiaron a 92 pacientes con LMA y hallaron mutación *FLT3* en 15,2% de pacientes, de estos, el 9,8% tenía *ITD*. En este estudio, los niños con mutaciones *FLT3* representaron solo el 7,1% y todos tenían *FLT3/ITD*(10).en comparación con el presente estudio no se obtuvo resultados positivos de mutaciones en pacientes pediátricos, debido a que en la muestra de estudio, había 6 niños.

Así mismo al estudiar la presencia de la mutación *FLT3/ITD* y su relación con el sexo y edad, se encontró que el 66,7% de pacientes son de sexo masculino, prevalencia similar a la reportada en la literatura, además el grupo etario de mayor frecuencia fue el de adulto mediano

(45-64 años). Estudios realizados por Ishfaq et al. (5), indican que la mutación se presenta con mayor frecuencia en hombres que en mujeres y es más prevalente en pacientes de edad avanzada, este último dato difiere del estudio presente en donde el grupo etario más prevalente es el adulto mediano. Derek et al. informaron que la mutación *FLT3* se detectó en el 27,5% de los pacientes de 55 años, similar a lo informado por Cuervo-Sierra, 29% de la población de 60 años datos que son similares a este estudio (10).

Según las características hematológicas de los pacientes objetos de estudio, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de blastos, teniendo valores superiores los portadores de la mutación con un valor estadístico, ($=p$ 0,031). Jiménez et al. (17). encontraron asociación entre el hallazgo de la mutación *FLT3-ITD* y el recuento elevado de leucocitos, en comparación con los pacientes libres de mutación ($p=0.023$). Esta investigación concuerda con la realizada por Burnatt et al (14) que indican que el recuento total de Glóbulos Blancos fue mayor para los pacientes que tenían la mutación *FLT3-ITD* y en el grupo pediátrico, también se observó una asociación significativa entre leucocitos elevados y la presencia de la mutación *FLT3-ITD*. Fröhling et al informaron de mayores recuentos de leucocitos y porcentajes de blastocitos en pacientes positivos para *FLT3-ITD* (23,25). Por otro lado, Yanus et al. (9) informaron de una leucocitosis significativamente mayor en los pacientes con *FLT3-ITD* y en comparación con pacientes con *FLT3* de tipo silvestre. Se ha indicado que la mutación *FLT3-ITD* suscita la activación constitutiva del receptor *FLT3*, lo que conduce a la estimulación celular

independiente del ligando y la consiguiente proliferación incontrolada de blastos leucémicos (25).

Al analizar los subtipos morfológicos, se encontró que el subtipo más frecuente es LMA M0, además, este grupo fue negativo para la mutación *FLT3/ITD*.

En los casos con *FLT3* mutados predominaron dos subtipos morfológicos LMA M4 con un 33,3% y LMA M5 con un 33%. Jiménez et al. (17) en un estudio realizado en 31 pacientes reportó que 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). En otra investigación, se indicó asociación de *FLT3-ITD*, con los subtipos FAB M1 y M4 ($p=0.011$) (11). Isfaq et al. (5) en su estudio informa que estas mutaciones se encuentran con mayor frecuencia en los subtipos M4 y M2 de LMA.

Este estudio también arrojó datos importantes referente a variables clínicas como la recaída y fallecimiento, con respecto a los individuos negativos para la mutación *FLT3/ITD* el 57,9% recayeron y fallecieron el 35,1% y los individuos que portaban la mutación la mayoría recayó (66,7%) al igual que los individuos que fallecieron (66,7%). En el año 2017 Burnatt et al (14). en un estudio realizado en Brasil, encontró asociación entre la presencia de la mutación *FLT3-ITD* y un mal resultado (muerte o recaída) en pacientes adultos. Sin embargo, el grupo pediátrico de LMA mostró una tendencia de asociación entre *FLT3-ITD* y muerte, lo que lo caracteriza como un indicador de mal pronóstico. en esta investigación no se encontró la mutación debido al bajo número de pacientes pediátricos.

Tao et al. (26) encontraron que la LMA con *FLT3-ITD* tiende a afectar a pacientes mayores con mayor frecuencia en el recuentos de glóbulos blancos, menor duración de la remisión y mayores tasas de recaída en comparación con los pacientes que no presentan la mutación.

Entre los hallazgos de este estudio, se encontró una asociación estadísticamente significativa en los valores de la hemoglobina, en pacientes con la mutación *FLT3/ITD* aumenta ($= p 0,037$) y un ratio 6,63 lo cual indica que el paciente tiene la posibilidad de tener 6,63 veces más elevada la hemoglobina con respecto a un paciente que no tienen la mutación. Trabajos similares indican que no encontraron correlación entre nivel de hemoglobina con *FLT3* mutado en comparación con *FLT3* silvestre (9) Zhang et al. (27) en su investigación concluye que no encontraron diferencias significativas en los recuentos de plaquetas y hemoglobina en pacientes de los grupos estudiados, lo que sugiere que otras mutaciones simultánea y *FLT3-ITD* contribuyen a un aumento de glóbulos blancos y células progenitoras mieloides.

También se encontró la LDH elevada en 1,21 veces, ($= p 0,024$) en pacientes que tienen la mutación con respecto a los que no tienen la mutación. En todas las demás variables evaluadas no se encontró asociación estadísticamente significativa con la mutación en el presente estudio. Al revisar la literatura, existen reportes en pacientes con Leucemias Aguda (LA), en los cuales se indica que un aumento de la actividad de la LDH se considera un factor de mal pronóstico (28). Un estudio con pacientes adultos de AL mostró una asociación entre la presencia de mutaciones del gen *FLT3* y el aumento del

nivel de LDH (29). Sin embargo, esta misma observación no se encontró en otro estudio (30). Burnatt (14) reporta que en el grupo de estudio (adultos y niños) los pacientes con mutaciones del gen *FLT3* mostraron un aumento mayor de LDH. El incremento de la LDH está relacionada con lisis celular continua, así como, con proliferación anormal de clonas celulares siendo muy útil para confirmar invasión metastásica de neoplasias refractarias a tratamiento y como factor pronóstico adverso en LLA (31), aunque no se ha encontrado evidencia científica en individuos con LMA.

CONCLUSIONES

En este estudio se analizaron 63 pacientes con Leucemia Mieloide Aguda y se encontró que la presencia de la mutación *FLT3/ITD* fue de 9,5% menor a la informada en la bibliografía. Además, se asoció un incremento en recuento de leucocitos, LDH y hemoglobina anormal en individuos portadores de la mutación.

En el presente estudio no se encontró una relación estadísticamente significativa con la clasificación FAB y otras variables clínicas: remisión, recaída y muerte. Esto puede deberse al reducido número de pacientes incluidos en el estudio y a las características de la población.

Para trabajos futuros es importante ampliar el número de pacientes de estudio, así como, apoyarse en métodos más sensibles como la secuenciación de nueva generación, que incrementaría las posibilidades de encontrar la relación entre estas variables

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Muñoz D, Prada J, Castillo E. El Papel de *FLT3* como Biomarcador en Leucemia Mieloide Aguda. Arch Med [Internet]. 2018;14(1). Disponible en: <https://www.archivosdemedicina.com/abstract/el-papel-de-flt3-como-biomarcador-en-leucemia-mieloide-aguda-22311.html>
2. Lagunas F, Pérez V, Cortéz C. *FLT3*, *NPM1* y *C/EBPβ*; as prognosis markers in patients with acute myeloid leukemia. Rev Hematol. 2015;16(2):152-67.
3. Amor A, Hernández L. La biología molecular en el diagnóstico de la leucemia mieloide aguda. Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter [Internet]. 2019;35(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0864-02892019000300002&lng=es&nrm=iso&lng=es
4. González E, Grille S, Vales V, Boada M, Zanella L, Leal D, et al. Estudio del ratio de *FLT3-ITD* como factor pronóstico en leucemias agudas mieloides: primeros casos estudiados en Uruguay. Rev Médica Urug. 2016;32(3):145-51.
5. Ishfaq M, Malik A, Faiz M, Sheikh I, Asif, Khan M, et al. Molecular Characterization of *FLT3* Mutations in Acute Leukemia Patients. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(9):4581-5.
6. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Alpermann T, Kern W. Diversity of the juxtamembrane and *TKD1* mutations (exons 13-15) in the *FLT3* gene with regards to mutant load, sequence, length, localization, and correlation with biological data. Genes Chromosomes Cancer. 2012;51(10):910-24.
7. Lagunas F. Leucemia mieloide aguda. Una perspectiva de los mecanismos moleculares del cáncer. Gac Mex Oncol. 2016;15(3):150-7.

8. Leyto F. Acute myeloid leukemia. *Rev Hematol.* 2018;19(1):24-40.
9. Yunus N, Johan M, Al H, Husin A, Hussein A, Hassan R. Characterisation and Clinical Significance of FLT3-ITD and non-ITD in Acute Myeloid Leukaemia Patients in Kelantan, Northeast Peninsular Malaysia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(12):4869-72.
10. Cuervo J, Jaime J, Martínez R, García R, Sánchez M, Gómez D, et al. Prevalence and Clinical Significance of FLT3 Mutation Status in Acute Myeloid Leukemia Patients: A Multicenter Study. *Arch Med Res.* 2016;47(3):172-9.
11. Gámez P, Carlos J. FLT3 y NPM1 como marcadores moleculares en la leucemia mieloblástica aguda. Utilidad pronóstica y diagnóstica. 2015; Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=75806>
12. Mahmood R, Altaf C, Malik H, Khan S. Clinico-Haematologic association and prognostic relevance of NPM1 and FLT3-ITD mutations in acute Myeloid Leukaemia. *Pak J Med Sci.* 2019;35(1):23-8.
13. Cuervo J, Jaime J, Gómez D. FLT3 domain mutations in acute myelogenous leukemia. *Rev Hematol.* 2012;13(4):177-84.
14. Burnatt G, Licínio M, Gaspar P, Ferreira A, Reis M, Moraes 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 [Internet].* 2017 [citado 12 de mayo de 2020];53(2). Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502017000200617
15. Gallogly M, Lazarus H, Cooper B. Midostaurin: a novel therapeutic agent for patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia and systemic mastocytosis. *Ther Adv Hematol.* 2017;8(9):245-61.
16. Abbas H, Alfayez M, Kadia T, Ravandi-Kashani F, Daver N. Midostaurin In Acute Myeloid Leukemia: An Evidence-Based Review And Patient Selection. *Cancer Manag Res.* 2019;11:8817-28.
17. Jiménez A, Muskus C, Torres J, Cuéllar, Camargo, Vásquez G. Molecular characterization of FLT3-ITD mutations in Colombian patients with acute myelogenous leukemia. *Rev Hematol.* 2013;14(4):166-72.
18. Ruiz-Argüelles G, Garcés-Eisele, Alarcón- Urdaneta C, Lutz-Presno J, Ruiz-Delgado G. 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;13:177-84.
19. Gaich P, Sastre D, Rodríguez C. Prevalencia de mutaciones f3 en leucemias mieloblásticas agudas [Internet]. 2011. Disponible en: https://cobico.com.ar/wp-content/archivos/PREVALENCIA-DE-MUTACIONES-FLT3-EN-LMA_Correccion.pdf
20. Lucena-Araujo A, Souza D, de Oliveira F, Benicio M, Figueiredo-Ponte Ls. Results of FLT3 mutation screening and correlations with immunophenotyping in 169 Brazilian patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2010;89(2):225-8.
21. Gorin N, Labopin M, Meloni G, Esteve J, Mohamad M. Impact of FLT3 ITD/NPM1 mutation status in adult patients with acute myelocytic leukemia autografted in first remission. *Haematologica.* 2013;98(2):e12-4.

22. Nazha A, Cortes J, Faderl S, Pierce S, Daver N. 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):1242-5.
23. Elyamany G, Awad M, Fadalla K, Albalawi M, Al Shahrani M, Al Abdulaaly A. Frequency and Prognostic Relevance of *FLT3* Mutations in Saudi Acute Myeloid Leukemia Patients. *Adv Hematol*. 2014;1-7.
24. Alonso C, Longo P, Medina A, Gallego M, Scopinaro M. Nuevos blancos terapéuticos en leucemia aguda pediátrica: caracterización de las mutaciones del gen *FLT3*. *Med Infant*. 2007;116-23.
25. Rezaei N, Arandi N, Valibeigi B, Haghpanah S, Khansalar M, Ramzi M. *FMS*-Like Tyrosine Kinase 3 (*FLT3*) and Nucleophosmin 1 (*NPM1*) in Iranian Adult Acute Myeloid Leukemia Patients with Normal Karyotypes: Mutation Status and Clinical and Laboratory Characteristics. *Turk J Hematol*. 2017;34(4):300-6.
26. Tao S, Wang C, Chen Y, Deng Y, Song, Shi Y, et al. Prognosis and outcome of patients with acute myeloid leukemia based on *FLT3-ITD* mutation with or without additional abnormal cytogenetics. *Oncol Lett*. 2019;18(6):6766-74.
27. Zhang Q Z, Wu X, Caa J, Gao F, Huang K. Association between increased mutation rates in *DNMT3A* and *FLT3-ITD* and poor prognosis of patients with acute myeloid leukemia. *Exp Ther Med*. 2019;18(4):3117-24.
28. Varma N, Varma S. Proliferative indices, cytogenetics, immunophenotype and other prognostic parameters in myelodysplastic syndromes. *Indian J Pathol Microbiol*. 2008; 51(1):97.
29. Peng H, Zhang H, Gong F, Shen F, Zhang Y. *Fms*-like Tyrosine Kinase (*FLT*) 3 and *FLT3* Internal Tandem Duplication in Different Types of Adult Leukemia: Analysis of 147 Patients. *Croat Med J*. 2008;49(5):650-9.
30. Karabacak B, Erbey F, Bayram I, Yilmaz S, Acipayam C. *Fms*-like tyrosine kinase 3 mutations in childhood acute leukemias and their association with prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010; 11(4):923-7.
31. Moya S, Pio D. Parámetros bioquímicos enzimáticos (*ALT*, *AST*, *ALP*, γ -*GT*, *LDH*) en niños con leucemia linfoblástica aguda antes del tratamiento antineoplásico. *Horiz Méd Lima*. 2015; 15(4):52-8.

Conflicto de intereses. Los autores declaran que no existe conflicto de intereses para la publicación del presente artículo.

Financiamiento. Autofinanciamiento

Agradecimiento. No declaran