

**“PREVALENCIA DE MUTACIONES FLT3 EN  
LEUCEMIAS MIELOBLÁSTICAS AGUDAS”**

*Gaich Pamela B, Sastre Darío A, Rodríguez Cecilia M.*

*Laboratorio de Oncohematología, Hospital Nacional de Clínicas-  
Facultad de Ciencias Médicas- Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.*

*Santa Rosa 1564 - HNC- Córdoba. C.P. 5000*

*Correo electrónico: [pamela.gaich@gmail.com](mailto:pamela.gaich@gmail.com)*

*TEL: 0351-4881346*

## RESUMEN

Las mutaciones en el gen del **receptor FLT3** (*FMS-like tyrosine kinase 3*) presentan alta frecuencia en Leucemias Mieloblásticas Agudas (LMA) y se asocian a pronóstico desfavorable. En este estudio analizamos la prevalencia de mutaciones FLT3 en 36 pacientes adultos con LMA (28 casos “*de novo*” y 8 secundarios a Síndromes Mielodisplásicos). Para la detección de mutaciones FLT3 utilizamos la técnica de **RT-PCR Multiplex**. Del total de pacientes con LMA el 16,7% fueron FLT3/ITD(+). No se observaron mutaciones FLT3/TKD. Todos los casos FLT3/ITD(+) correspondieron al grupo de LMA “*de novo*” (6/28 casos), con una prevalencia del 21,4%, no hubo predominio de sexo, y se observó mayor frecuencia en pacientes >40 años. El 66,7% de los casos FLT3/ITD(+) presentaron compromiso de linaje monocítico (LMA-M4/M5). En conclusión la prevalencia de mutaciones FLT3/ITD en pacientes LMA fue similar a la reportada en la literatura, sin embargo no hemos encontrado mutaciones TKD. Destacamos la relevancia clínica de la detección de alteraciones moleculares en el gen FLT3, ya que de acuerdo a los resultados de estudios clínicos publicados, éstas estarían asociadas a mal pronóstico y podrían representar un importante blanco para el desarrollo de nuevos tratamientos específicos, como los inhibidores de FLT3 recientemente desarrollados.

**PALABRAS CLAVE:** *Fms-like tyrosine kinase (FLT3), FLT3/ITD, FLT3/TKD, Leucemias Mieloblásticas Agudas, RT-PCR, PCR-Multiplex.*

## INTRODUCCIÓN

**FLT3** (*FMS-like tyrosine kinase 3*) (1, 2), también denominado **FLK-2** (*fetal liver kinase-2*) (3) o **STK-1** (*human stem cell kinase-1*) (4), es un receptor de transmembrana perteneciente a la familia de Receptores Tirosina-Quinasa Clase III; también pertenecen a esta familia el Receptor del Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos (c-FMS), el Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGFR-alfa/beta) y c-KIT (CD117, o Receptor-Kit). Estos

receptores se caracterizan por poseer un extremo N-terminal extracelular compuesto por cinco dominios inmunoglobulina-*like* que se unen al ligando, un dominio de transmembrana, un dominio intracelular de juxtamembrana (JM), una región intracelular con dos dominios Tirosina-Quinasa (TKD) interrumpidos por un inserto Quinasa y, una cola intracelular en el extremo C-terminal (5, 6). El gen que codifica para FLT3 se localiza en el cromosoma 13q12 en humanos, abarca 24 exones, con un tamaño de aproximadamente 100 Kb, y codifica para una proteína de 993 aminoácidos (1, 2, 7, 8). Existen dos isoformas del receptor: una asociada a membrana (158-160 KDa) y otra forma citoplasmática (130-143 KDa) (9, 10). FLT3 es expresado principalmente en células madres hematopoyéticas CD34(+) (11) y, su ligando fisiológico (FL) se expresa en células del estroma medular (12). La interacción FL-FLT3 involucra diferentes vías de señalización (MAPK, STAT, PI3K/AKT) que intervienen en la regulación de la diferenciación, proliferación, apoptosis y supervivencia celular (13). Existen evidencias clínicas y experimentales que indican que FLT3 es un proto-oncogén con capacidad de prolongar la supervivencia y aumentar la capacidad proliferativa de blastos leucémicos (11, 14, 15).

Las mutaciones en el gen de FLT3 presentan alta frecuencia en las Leucemias Mieloblásticas Agudas (LMA) y se han identificado dos tipos principales (16-18): **Duplicaciones Internas en Tándem (FLT3/ITD)** en el dominio JM del receptor y **mutaciones puntuales en el sitio de activación del dominio TKD (FLT3/TKD)** (14, 18-21). Las mutaciones **FLT3/ITD** consisten en secuencias duplicadas en tándem, que comprenden de 3 a >400pb, a veces con inserción de nucleótidos adicionales (de 3 a 36pb) en el dominio JM del receptor (exones 14-15) y afectan principalmente los residuos Tirosina Y589, Y591, Y597, Y599 y en menor medida los residuos Acido Aspártico (D593) ó Lisina (K602). Se han reportado también mutaciones puntuales en el dominio JM, aunque su incidencia es baja y el significado clínico es poco claro (13-15, 18, 19). Las mutaciones **FLT3/TKD** consisten en mutaciones puntuales en el residuo D835 del dominio TKD, ubicado en el exón 20, que generan sustitución de Acido aspártico 835 (D835) por residuos Tirosina (Y) e Histidina (H) principalmente y, menos frecuentemente por valina (E),

Glutamato (Q) y Asparragina (N). También se han detectado sustituciones de Isoleucina 836 (I836) por Metionina (M), completa delección de I836, inserción de nucleótidos y cambios más complejos (14, 20, 21). Ambos tipos de mutaciones (FLT3/ITD y FLT3/TKD) promueven la autofosforilación del receptor con la activación constitutiva del mismo y proliferación ligando-independiente (13, 20), aunque existen diferencias biológicas significativas entre ambos tipos de mutaciones, ya que parecen promover la activación de diferentes efectores y diferentes respuestas biológicas (13, 22). La presencia de mutaciones FLT3/ITD es un factor de mal pronóstico en Leucemias Mieloblásticas Agudas (LMA), asociado a progresión clínica y a recaída; mientras que las mutaciones FLT3/TKD no tienen un impacto significativo en el pronóstico de las mismas (13, 14, 19, 23, 24).

El objetivo del presente estudio fue analizar la prevalencia de los distintos tipos de mutaciones en el gen FLT3 en pacientes con LMA atendidos en el Servicio de Oncohematología del Hospital Nacional de Clínicas, UNC.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **PACIENTES**

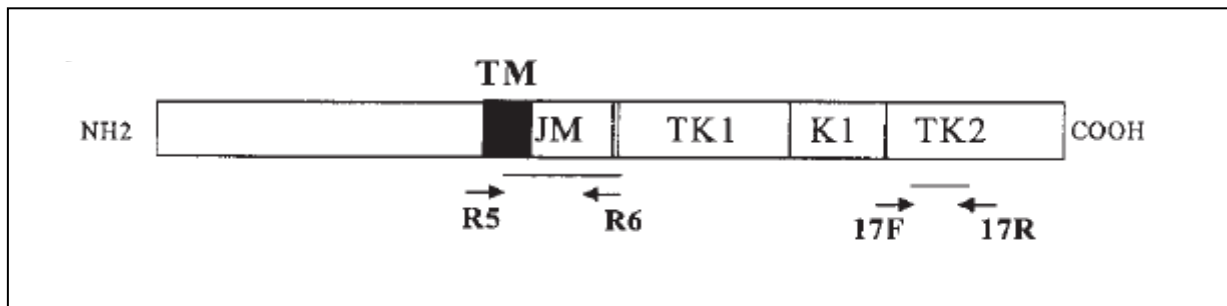
Se analizaron muestras de Sangre Periférica (SP) y/o Médula Ósea (MO) de 36 pacientes adultos: 14 mujeres y 22 hombres, con edades comprendidas entre 20 y 65 años, con diagnóstico de LMA: 28 LMA “*de novo*” (12 mujeres, 16 hombres) y 8 secundarias a Síndromes Mielodisplásicos (SMD) (2 mujeres, 6 hombres), atendidos en el Servicio de Oncohematología del Hospital Nacional de Clínicas -UNC- Córdoba, Argentina. El diagnóstico de LMA fue realizado según criterios morfológicos e inmunofenotípicos. Las mutaciones en FLT3 se analizaron por RT-PCR Multiplex y posterior digestión con enzimas de restricción. Las muestras fueron analizadas dentro de las 24 horas de realizada la extracción.

### ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES FLT3

**El RNA total celular** fue extraído a partir de  $5-10 \times 10^6$  leucocitos de SP y/o MO obtenidos por lisis de Glóbulos Rojos con solución de Cloruro de amonio y utilizando el método de Chomczynsky y Sacchi (modificado) (25). La cantidad y calidad del RNA se evaluó mediante la lectura espectrofotométrica a 260/ 280nm. La obtención del cDNA, se realizó por **Transcripción Reversa (RT)**, mediante incubación de 20uL del RNA total celular (5-15µg) con 21uL de Master Mix, la concentración final de los reactivos en la mezcla de reacción fue: 5mM de buffer Tris (pH=8.3); 75mM de KCl; 3mM de MgCl<sub>2</sub>; 1mM de DTT; 120ug/mL de random primers (Amersham-Pharmacia); 0,2mM de dNTP (Promega);  $1,4 \cdot 10^4$ U/mL de M-MLV transcriptasa reversa (Promega) y 1400U/mL de RNAsin (Promega). La reacción de RT se llevó a cabo a 37°C durante 2hs, seguida del calentamiento del cDNA a 65°C durante 10min y posterior conservación a -20°C. Un control negativo conteniendo todos los reactivos a excepción del RNA fue incorporado en todas las reacciones de retrotranscripción (26, 27). Para la **reacción de PCR**, 2uL de cDNA fueron amplificados en un volumen total de 50uL, la concentración final de los reactivos en la mezcla de reacción fue: 200uM de cada dNTP (Promega), 1x Buffer de PCR (Invitrogen), 1.5U de Taq Polimerasa (Invitrogen) y 30pmol de cada primer (17F, 17R, R5, R6) (Sigma, Genesys). La reacción de PCR se efectuó en un Termociclador MJ Research comenzando con un pre-calentamiento inicial de 5min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30s a 94°C, 45s a 56°C y 30s a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C.

Con el objetivo de analizar los dos tipos de mutaciones: ITD y TDK (D835) en forma simultánea, se aplicó la estrategia de **PCR-Multiplex** para lo cuál se adicionaron cuatro *primers*, cuyas secuencias se describen en la **Tabla I** y la localización de los mismos en la secuencia del cDNA se esquematiza en la **Figura 1** (28).

Tabla I. Secuencia de <i>primers</i> utilizadas en la reacción de PCR		
PRIMER	SECUENCIA	ESPECIFICIDAD
R5	5'-TgTCgAgCAgTACTCTAAACA-3'	Flanquean el dominio de transmembrana y el dominio JM
R6	5'-ATCCTAgTACCTTCCCAAACCTC-3'	
17F	5'-CCgCCAggAACgTgCTTg-3'	Flanquean el dominio TKD
17R	5'- gCAgCCTCACATTgCCCC-3'	



**Figura 1. Representación esquemática del gen FLT3 (13q12) y de la localización de los *primers* utilizados en la reacción de amplificación.** Estructura del cDNA de FLT3 y posición de los *primers* para la RT-PCR Multiplex. TM: dominio transmembrana. JM: dominio juxtamembrana. TK 1 y 2: dominio tirosina quinasa (TKD). K1: dominio de inserción quinasa. Tomado de: Noguera NI, Breccia M, Divona M y col. *Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol. Leukemia* (2002) 16, 2185–2189 (28)

Posteriormente, 10uL de los productos amplificados por PCR fueron **digeridos con la Enzima de Restricción EcoRV** (Promega). La digestión enzimática se llevó a cabo a 37°C durante 2hs, seguida de un calentamiento a 65°C durante 10min y posterior conservación a 4°C (28).

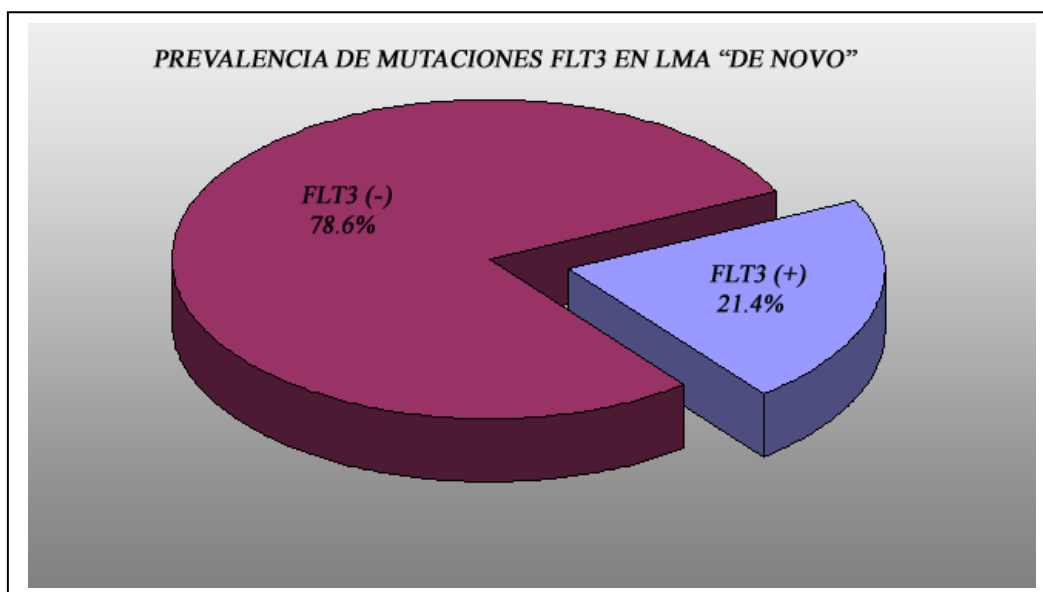
Finalmente, se realizó una **Electroforesis en gel de Agarosa** al 3% y tinción con Bromuro de Etidio para la visualización al UV de los productos digeridos.

La mutación FLT3/TKD (D835) elimina el sitio de restricción para la enzima EcoRV, por lo cual no se produce la digestión del DNA en estos casos, por el contrario aquellos pacientes sin la mutación conservan el sitio de restricción permitiendo de este modo la digestión del DNA. En todos los casos se incluyeron controles positivos y negativos.

## RESULTADOS

### Mutaciones FLT3 en pacientes con LMA

En el total de pacientes LMA estudiados (n=36), se halló una prevalencia del 16,7% de mutaciones FLT3 (6/36 casos). Todos los casos FLT3(+) correspondieron al grupo de LMA “*de novo*”: 21,4% (6/28 casos) en este grupo. No se observó ningún caso FLT3 positivo en el grupo de LMA secundarias a SMD. **Figura 2.**



**Figura 2. Prevalencia de mutaciones FLT3 en LMA “*de novo*”.**

El 100% de los casos FLT3 positivos correspondieron a la mutación FLT3/ITD, no observándose la presencia de mutaciones FLT3/TKD.

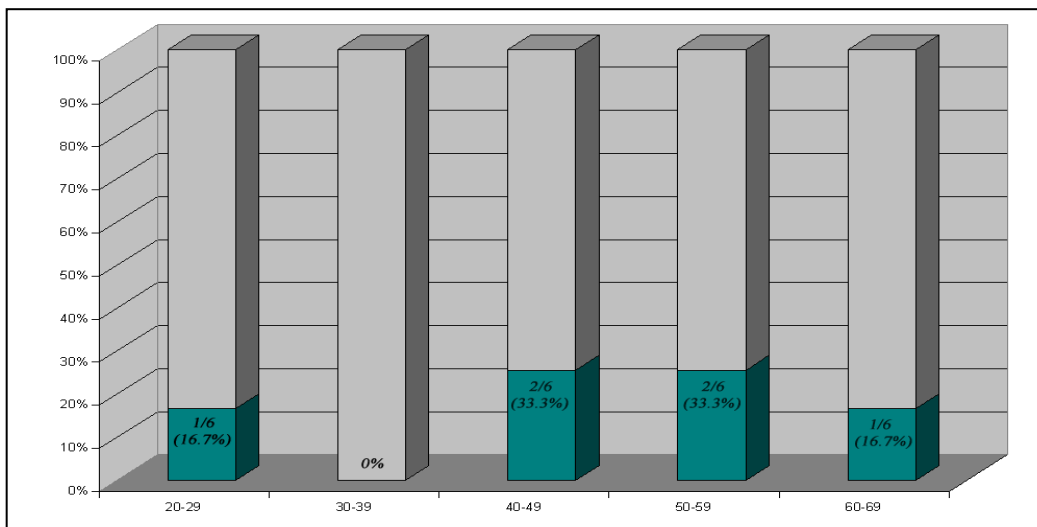
### Distribución por Edades y Sexo en pacientes con LMA-FLT3/ITD(+)

Los datos de edades y sexo recopilados de los pacientes LMA-FLT3/ITD(+) se encuentran en la **Tabla II**. Donde se puede observar que la frecuencia de mutaciones FLT3/ITD fue la misma entre hombres y mujeres: 50%, no hallándose predominio según el sexo.

**Tabla II. Pacientes con LMA FLT3/ITD(+) según Edad y Sexo**

	<b>EDAD (años)</b>	<b>SEXO</b>
<b>PACIENTE 1</b>	28	Hombre
<b>PACIENTE 2</b>	41	Mujer
<b>PACIENTE 3</b>	41	Mujer
<b>PACIENTE 4</b>	57	Hombre
<b>PACIENTE 5</b>	53	Mujer
<b>PACIENTE 6</b>	65	Hombre

Según la distribución de edades en los pacientes FLT3/ITD(+) (6 casos), se observó una mayor frecuencia del grupo de 40-49 años y de 50-59 años (33,3%), siendo menor los de 20-29 y 60-69 años (16,7%), no observándose pacientes de 30-39 años en los casos FLT3/ITD(+). Según esta distribución, el 83,3% de los casos FLT3/ITD(+) tenían > 40 años (5/6 casos) **Figura 3**.



**Figura 3. Frecuencia de Edades en pacientes FLT3(+)**

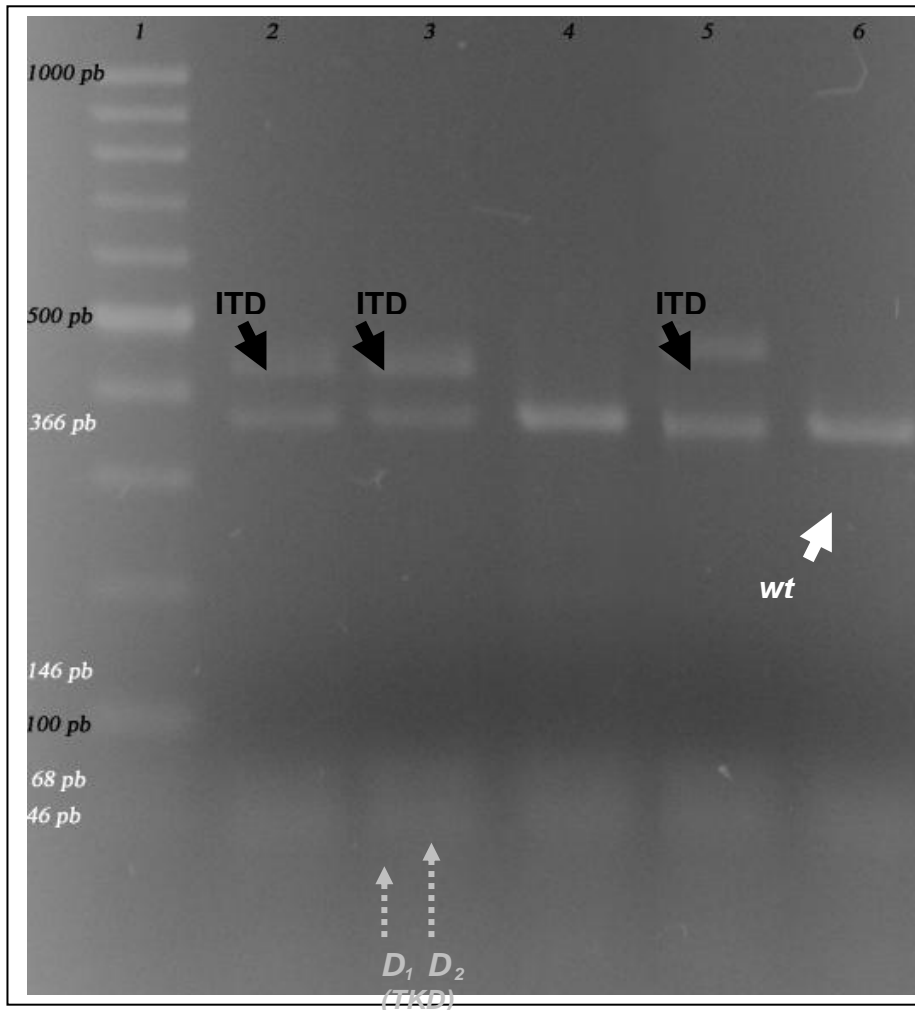
### **Análisis de las bandas observadas por PCR**

En el análisis de los productos de amplificación obtenidos por PCR Múltiple (Figura 4), se observó que todos los casos FLT3/ITD(+) exhibían una banda de 366pb correspondiente al alelo *wild-type* (*wt*) y una banda adicional de mayor peso molecular correspondiente a las duplicaciones internas en tándem (ITD). En un paciente se observó que la banda ITD exhibía



mayor peso molecular que el resto de los casos positivos. En todos los pacientes estudiados las bandas ITD fueron únicas, sin presencia de bandas múltiples.

Ningún caso analizado presentó fragmentos de 146pb correspondiente a la presencia de la mutación FLT3/TKD, observándose solo los fragmentos a 46 y 68pb correspondientes a la digestión del alelo *wt*.



**Figura 4. Gel de Agarosa de productos de RT-PCR Multiplex para mutaciones FLT3.** Se observan los productos de amplificación para las mutaciones FLT3 de 3 pacientes representativos (líneas 3-5). En la parte superior del gel se muestran las **mutaciones FLT3/ITD**: las bandas a 366pb corresponden al alelo *wt* (flecha blanca), y las bandas superiores a las ITD (flechas negras). En la parte inferior del gel se observan las bandas de los productos digeridos del alelo *wt* a 46 y 68pb ( $D_1$  y  $D_2$ , flechas grises punteadas), indicando la ausencia de **mutaciones TKD** (no se observa la banda a 146 pb). Línea 1: marcador de peso molecular. Línea 2: control positivo de ITD. Líneas 3 y 5: pacientes FLT3/ITD(+). Línea 4: paciente FLT3/ITD(-). Línea 6: control negativo de ITD.

### **Asociación de casos FLT3(+) a subtipos FAB de las LMA**

En las muestras **FLT3/ITD(+)** el 66,7% de los casos (4/6) presentaron compromiso de linaje monocítico (LMA-M4/M5), un caso 16,7% (1/6) correspondió a LA promielocítica (LMA-M3) y otro 16,7% (1/6) se asoció a LMA-M1/M2. En el total de LMA “*de novo*” estudiadas, 8 casos correspondieron a **LMA promielocítica (LMA-M3) con t(15;17) positiva** (28,6%) y, solo una de éstas (1/8) presentó positividad para FLT3/ITD (12,5%).

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

En el presente trabajo se estudiaron las mutaciones FLT3 en pacientes con LMA, encontrándose una prevalencia del 16,7%, menor a lo informado previamente por la literatura, donde se reportan las mutaciones en FLT3 como una de las más frecuentes, con una incidencia del 25-45% de pacientes LMA adultos (13, 17).

La prevalencia de mutaciones FLT3/ITD hallada en el grupo de pacientes con LMA “*de novo*” fue del 21,4%, coincidiendo con diferentes estudios que reportaron una incidencia global de mutaciones FLT3/ITD en adultos con LMA, independientemente de la edad, subtipo-FAB o clasificación citogenética, de aproximadamente del 24%, con un rango entre 13,2 y 35% (13-16, 23, 28-30).

No se encontró ningún caso FLT3 positivo en el grupo de pacientes con LMA secundarias a SMD, en contraposición a otros estudios como el de *Moreno y col, 2003*, que detectaron mutaciones FLT3 en el 17% (4/23 casos) de pacientes con LMA secundarias (2/4 casos FLT3/ITD y 2/4 casos FLT3/TKD) (30).

En la serie de pacientes analizada, no se encontró presencia de mutaciones puntuales en el dominio TKD, esto difiere de lo hallado por diversos estudios, que reportan una incidencia de mutaciones FLT3/TKD del 5 al 12% en pacientes LMA (13-15, 17, 20).

Se ha observado que la prevalencia de mutaciones FLT3/ITD en LMA es dependiente de la edad, siendo poco frecuente en infantes, aumentando a un 5-10% en edades de 5-10 años, al 20% en adultos jóvenes y más del 35% en pacientes >55 años. No ocurre lo mismo para las mutaciones FLT3/TKD, las cuales presentan una prevalencia constante a través del rango de edades (13, 17). En el grupo de pacientes estudiados, pudimos observar que el 83,3% de los casos FLT3/ITD(+) correspondió a pacientes > 40 años (5/6 casos).

En el análisis de las bandas correspondientes a las mutaciones FLT3/ITD, diversos estudios (*Kottaridis y col, 2001; Noguera y col, 2002; Thiede 2002*) reportaron una significativa proporción de pacientes (9-23%) con más de una mutación ITD, con frecuencia dos, pudiendo detectarse hasta cinco bandas adicionales. Las diferentes mutaciones ITD se deben que éstas difieren en las secuencias duplicadas (de 3 a >400pb) sugiriendo una inestabilidad genética subyacente (13-15, 19, 23, 28, 31). La presencia de más de una mutación ITD parece incidir en el pronóstico adverso de FLT3/ITD en LMA (23). En los pacientes FLT3/ITD analizados, solo se observaron bandas ITD simples (bandas entre 366 y 500pb), en ningún caso se observaron bandas múltiples. *Muñoz y col, 2003* observó en una serie de 156 pacientes LMA, la ausencia del alelo-*wt* en 2 casos, y en 4 casos la banda fue de intensidad muy débil (29). En otros estudios han sido reportadas evidencias de una parcial o casi total pérdida del alelo-*wt* en el 6-10% de los casos. En nuestros pacientes, hemos observado, además de la banda ITD, la presencia del alelo-*wt* en todos los casos (15, 23, 31, 32). Algunos trabajos sugieren que en pacientes LMA con cariotipo normal, la pérdida del alelo-*wt* sería un factor de pronóstico desfavorable independiente, más que la presencia de FLT3/ITD “*per se*” (14, 31, 32).

Si bien las mutaciones FLT3/ITD han sido reportadas en todos los subtipos FAB, diversos autores como *Kottaridis y col., Noguera y col., y Thiede y col.*, han asociado la presencia de mutaciones FLT3/ITD a los subtipos LMA-M3 (particularmente M3v) y LMA-M5 (especialmente M5b) (14, 15, 18, 23, 28-31). En el presente trabajo se observó una mayor incidencia de ésta mutación en LMA con compromiso monocítico.

La observación de solo un caso (12,5%) FLT3 positivo (FLT3/ITD) en el grupo de LMA promielocíticas con positividad para la t(15;17) (8 casos), difiere de los resultados publicados por varios estudios, donde fueron observados porcentajes mayores para las mutaciones FLT3/ITD+ (30-40%) y un bajo porcentaje (~ 8%) para mutaciones FLT3/TKD (D835) (28, 30, 33). Pudiendo ser necesario en nuestro trabajo el análisis de un mayor número de pacientes con LMA-M3 para arribar a conclusiones mas detalladas.

En conclusión la prevalencia de mutaciones FLT3/ITD en pacientes LMA (21,4%) fue similar a la reportada en la literatura, sin embargo no se encontraron pacientes con mutaciones FLT3/TKD. Entre los pacientes estudiados no hubo predominio de sexo, pero se observó mayor frecuencia en aquellos >40 años. Y un alto porcentaje (66,7%) presentaron compromiso de linaje monocítico (LMA-M4/M5). Consideramos que es necesario el estudio de un mayor número de pacientes para confirmar estos hallazgos en nuestro medio; y finalmente destacamos la relevancia clínica de la detección de alteraciones moleculares en el gen FLT3, ya que de acuerdo a los resultados de estudios clínicos publicados, éstas estarían asociadas a mal pronóstico y podrían representar un importante blanco para el desarrollo de nuevos tratamientos específicos, como los inhibidores de FLT3 recientemente desarrollados (16, 34).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rosnet O, Mattei M, Marchetto S, Birnbaum D. *Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene*. Genomics. 1991; 2: 380-385
2. Rosnet O, Marchetto S, deLapeyriere O, Birnbaum D. *Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family*. Oncogene. 1991; 6: 1641-1650
3. Matthews W, Jordan C, Wiegand G, Pardoll D, Lemischka I. *A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations*. Cell. 1991; 65: 1143-1152

4. Small D, Levenstein M, Kim E y col. ***STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells.*** Proceedings of the National Academy of sciences of the USA. 1994; 91: 459-463
5. Rosnet O, Birnbaum D. ***Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases.*** Critical Reviews in Oncology. 1993; 4:595-613
6. Agnès F, Shamoon B, Dina C, Rosnet O, Birnbaum D, Galibert F. ***Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III.*** Gene. 1994; 145: 283-288
7. Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ y col. ***Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells.*** Blood. 1993; 82: 1110-1119
8. Wang Z, Kim E, Chinault A, Civin C, Small D. ***Genomic organization of the human STK-1 (FLT3/FLK2) gene.*** Blood. 1996; 88: 111b (abstr, suppl 1)
9. Maroc N, Rottapel R, Rosnet O y col. ***Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase.*** Oncogene. 1993; 8: 909-918
10. Lyman SD, James L, Zappone J, Sleath PR, Beckmann MP, Bird T. ***Characterization of the protein encoded by the flt3 (flk2) receptor-like tyrosine kinase gene.*** Oncogene. 1993; 8: 815-822
11. Parcels B, Ikeda A, Simms-Waldrip T y col. ***FMS-like Tyrosine Kinase 3 in Normal Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia.*** Stem Cells. 2006; 24: 1174-1184
12. Lyman S, Jacobsen E. ***C-kit Ligand and Flt3 Ligand: Stem/Progenitor Cell Factors With Overlapping Yet Distinct Activities.*** Blood. 1998; 91: 1101-1134
13. Meshinchi S, Appelbaum F. ***Structural and functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid.*** Educational of: Clinical Cancer Research. 2009; 15: 4263-4269
14. Kottadiris D, Gale R, Linch D. ***FLT3 mutations and leukaemia.*** British Journal of Hematology. 2003; 122: 523-538
15. Naoe T, Kiyoi H. ***Normal and oncogenic FLT3.*** Cellular and Molecular Life Sciences. 2004; 61: 2932-2938
16. Small D, MD, PhD. ***Targeting FLT3 for treatment of leukemia.*** Seminars in hematology. 2008; 45:17-21
17. Gregory T, Wald D, Chen Y y col. ***Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetic.*** Journal of Hematology & Oncology. 2009; 2: 23-32
18. Guilliland D. & Griffin J. ***The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia.*** Blood. 2002; 100: 1532-1542

19. Nakao M, Yokota S, Iwai T y col. ***Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia.*** Leukemia. 1996; 10: 1911-1918
20. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S y col. ***Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies.*** Blood. 2001; 97: 2434-2439
21. Abu-Duhier F, Goodeve A, Wilson G, Care R, Peake I & Reilly J. ***Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia.*** British Journal of Haematology. 2001; 113: 983-988
22. Choudhary C, Schwable J, Brandts C y col. ***AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations.*** Blood. 2005; 106: 265-273
23. Kottaridis P, Gale R, Frew M, et al. ***The presence of 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: 1752-1579
24. Bienz M, Ludwig M, Leibundgut E y col. ***Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype.*** Clinical Cancer Research. 2005; 11: 1416-1424
25. Chomczynsky P & Sacchi N. ***Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol chloroform extraction.*** Analytical Biochemistry 1987; 162: 156-159
26. Cross N, Melo J, Feng L and Goldman J. ***An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of BCR-ABL fusion mRNA in hematological disorders.*** Leukemia. 1994; 8:186-189
27. Cross N. ***Detection of BCR-ABL in Hematological malignancies by RT-PCR.*** En: Molecular Diagnosis of Cancer. Coterr FE. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. 1996: 25-35
28. Noguera N, Breccia M, Divona M y col. ***Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol.*** Leukemia. 2002; 16: 2185-2189
29. Muñoz L, Aventin A, Villamor N, Juncà J, Acebedo G, Domingo A y col. ***Inmunophenotypic findings in acute mieloide leucemia with FLT3 internal tandem duplication.*** Haematologica/journal of hematology. 2003; 88: 637-645
30. Moreno I, Martin G, Bolufer P , Barragán E, Rueda E, Román J y col. ***Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutation in acute myeloid leukemia.*** Haematological Journal of hematology. 2003; 88: 19-24

31. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U y col. ***Analysis of FLT3-activating in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis.*** Blood 2002; 99: 4326-4335
32. Whitman S, Archer K, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson B y col. ***Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study.*** Cancer Research. 2001; 61: 7233–7239
33. Chillón MC, Santamaria C, Garcia-Sanz R y col. ***Long FLT3 internal tandem duplications and reduced PML-RAR alfa expresión at diagnosis characterize a high-risk subgroup of acute promyelocytic leukemia patients.*** Haematológica 2010; 95: 745-751
34. Knapper S. ***FLT3 inhibition in acute mieloide leukaemia.*** British Journal of Haematology. 2007; 138: 687-699