

Biomarcador FLT3-ITD: perspectivas y retos

FLT3-ITD biomarker: perspectives and challenges

Heidys Garrote Santana^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-8449-1278>

¹Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: rchematologia@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: Las mutaciones del gen que codifica para el factor de la tirosina quinasa 3 (FLT3) son de especial importancia en la leucemia mieloide aguda debido a que sirven de guía para la confirmación del diagnóstico, la estimación del pronóstico y la toma de decisiones terapéuticas. Entre las alteraciones más importantes está la duplicación interna en tándem (FLT3-ITD). **Objetivo:** Exponer los aspectos más relevantes respecto al biomarcador FLT3-ITD en el contexto de la leucemia mieloide aguda.

Métodos: Se realizó una búsqueda de artículos científicos actualizados en los idiomas inglés y español, en PubMed, EMBASE, Google Scholar y SciELO. Se seleccionaron artículos publicados en los últimos cinco años. Se revisaron los aspectos más relevantes sobre el biomarcador en el contexto de la leucemia mieloide aguda, su base biológica, el impacto del tamaño de los fragmentos y la carga alélica en la estimación del pronóstico de los pacientes, las nuevas estrategias terapéuticas y los retos en cuanto a los métodos de laboratorio para su diagnóstico.

Análisis y síntesis de la información: Más allá de la positividad o no de dicho biomarcador, el tamaño de la duplicación interna en tándem, así como la carga alélica -determinada por la razón alelo mutado/alelo salvaje-, podrían tener un gran impacto en el pronóstico. Sin embargo, persisten diferencias en los criterios para establecer los algoritmos de predicción del riesgo, el punto de corte a utilizar como referencia y el protocolo de laboratorio específico para un estudio más detallado del biomarcador.

Conclusiones: La comunidad científica necesita seguir trabajando en el esclarecimiento de la utilidad práctica de estos parámetros, validándolos en series amplias y diversas epidemiológicamente. Se debe determinar el punto de corte exacto para comparar la razón y estandarizar los métodos de laboratorio más adecuados y factibles para su estudio.

Palabras clave: FLT3-ITD; factor de la tirosina quinasa 3; leucemia mieloide aguda; carga alélica; biomarcadores.

ABSTRACT

Introduction: Mutations in the tyrosine kinase 3 gene (FLT3) are of special importance in acute myeloid leukemia because they serve as a guide to confirm the diagnosis, estimate the prognosis, and make therapeutic decisions in the patient. Internal tandem duplication (FLT3-ITD) is the most important alteration of this gene.

Objective: To present the most relevant aspects regarding the FLT3-ITD biomarker in the context of acute myeloid leukemia.

Methods: a search was carried out for updated scientific articles, in English and Spanish, in PubMed, EMBASE, Google Scholar and SciELO. Articles published in the last five years were selected. The most relevant aspects of the biomarker in the context of acute myeloid leukemia, its biological basis, the impact of the size of the fragments and the allelic load in the estimation of the prognosis of the patients, the new therapeutic strategies and the challenges in regarding the laboratory methods for its diagnosis.

Information analysis and synthesis: Beyond the biomarker positivity or not, the size of the ITD, as well as the allelic ratio determined by the mutated allele / wild-type allele, could have a great impact on the prognosis of patients. However, differences persist in the criteria for establishing risk prediction algorithms, the cut-off point to be used as a reference, and the specific laboratory protocol for a more detailed study of the biomarker.

Conclusions: The scientific community needs to continue working to clarify the practical utility of these parameters, validating them in broad and epidemiologically diverse series. The exact cut-off point should be determined as a reference to compare the relationship and standardize the most suitable and feasible laboratory methods for its study.

Keywords: FLT3-ITD; tyrosine kinase 3 gene; acute myeloid leukemia; allelic ratio; biomarker.

Recibido: 14/05/2021

Aceptado: 17/08/2021

Introducción

La diferenciación y desarrollo de las células hematopoyéticas es el resultado de la interacción de diversos factores de crecimiento y sus respectivos receptores. Entre ellos se encuentra el receptor tirosina quinasa 3 (FLT3 del inglés *FMS- like tyrosine kinase 3*). La expresión de este receptor es indispensable para el desarrollo, diferenciación, proliferación y supervivencia de las células hematopoyéticas.^(1,2)

El gen FLT3 que codifica para este receptor se encuentra localizado en el cromosoma 13 (13q12) y está constituido por 24 exones. Normalmente, el FLT3 se expresa en los tejidos que forman células precursoras, como la médula ósea, órganos linfoides, hígado, el timo y la placenta. Se expresa en todas las células hematopoyéticas CD34+, en los progenitores de linfocitos B, en los progenitores de la estirpe mieloide y en los monocitos.^(1,2,3,4)

También se puede encontrar expresado y en altos niveles en un gran número de enfermedades hematológicas, como la mayoría de los subtipos de leucemia mieloide aguda (LMA), en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células B, en determinadas LLA de células T, así como en la crisis blástica de la leucemia mieloide crónica y los síndromes mielodisplásticos.^(5,6,7,8,9)

Entre las alteraciones más importantes de este gen destacan, por su frecuencia e implicación en el pronóstico de las enfermedades, las duplicaciones internas en tándem (FLT3-ITD, por sus siglas en inglés), que resultan de la duplicación de un fragmento en la región codificante del dominio yuxtamembrana y, las mutaciones puntuales en el dominio tirosina quinasa (FLT3-TKD por sus siglas en inglés).^(2,10,11)

El diagnóstico actual de la mayoría de las enfermedades oncohematológicas se basa en un análisis integrado usando la citomorfología, la citoquímica, el inmunofenotipo, la citogenética y la biología molecular. Aunque cada uno de estos estudios, aportan información para el diagnóstico, en los últimos años ha quedado bien establecido que la identificación de biomarcadores con base molecular, proporciona una gran definición de la enfermedad, relevancia en el pronóstico y mejor evaluación de la respuesta terapéutica.

El objetivo de esta revisión fue exponer los aspectos más relevantes respecto al biomarcador FLT3-ITD en el contexto de la LMA.

Métodos

Se realizó una revisión de artículos en los idiomas inglés y español en PubMed, EMBASE, Google Scholar y SciELO. Se seleccionaron artículos publicados en los últimos cinco años fundamentalmente y se complementó la búsqueda con bibliografía referenciada en los textos identificados inicialmente. Se revisaron aspectos sobre la base biológica del biomarcador, el impacto del tamaño de los fragmentos y la carga alélica en la estimación del pronóstico de los pacientes, las nuevas estrategias terapéuticas y los retos en cuanto a los métodos de laboratorio para su diagnóstico.

Análisis y síntesis de la información

Base biológica de las mutaciones del FLT3

Las mutaciones del gen FLT3 son de especial importancia en la LMA, debido a que frecuentemente sirven de guía para la toma de decisiones terapéuticas, dado su claro componente como marcadores de mal pronóstico.⁽⁵⁾ Nakao y otros,⁽¹²⁾ fueron los primeros en describirlas en una alta proporción de pacientes con LMA. En la LMA pediátrica, estas alteraciones aparecen en menor cuantía, aunque van incrementando su frecuencia del 5 % al 10 % en un período comprendido entre los 5 y los 10 años, seguido del 20 % en pacientes adultos jóvenes y, supera el 35 % en pacientes mayores de 55 años.^(2,5,13,14)

En condiciones normales, la duplicación segmental del dominio yuxtamembrana del FLT3 promueve la autodimerización y la autofosforilación del receptor que, en consecuencia, pasa a estar constitutivamente fosforilado.⁽¹¹⁾ La longitud del fragmento duplicado puede variar entre tres y cientos de nucleótidos y aunque en ocasiones se acompaña de inserciones, no suele afectar a la pauta de lectura.

Las mutaciones FLT3-TKD suceden con una frecuencia alrededor del 5 - 10 % en los pacientes con LMA y raramente coexisten con las FLT3-ITD.^(5,10) La mayoría de las FLT3-TKD tienen lugar en el exón 835 con una sustitución del ácido aspártico por la tirosina. Además de esta, se han descrito otras mutaciones puntuales, deleciones e inserciones, en este mismo exón, como en los adyacentes.^(5,10) Las FLT3-TKD promueven una proliferación independiente del ligando a través de la autofosforilación y la activación constitutiva del receptor similares a la FLT3-ITD, aunque con ciertas diferencias biológicas significativas.^(5,10)

Impacto pronóstico de las mutaciones del FLT3

Varias organizaciones, incluida la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Red Nacional Integral del Cáncer y la Red Europea de Leucemia, han establecido directrices para la clasificación y estratificación del riesgo de la LMA teniendo en cuenta la FLT3-ITD.^(5,15,16) Desde el punto de vista pronóstico, diversos estudios han demostrado que los pacientes positivos a la FLT3-ITD tienen un pronóstico adverso.^(17,18) Sin embargo, el impacto de la FLT3-TKD en el pronóstico no está bien definido.^(1,2,5)

Existe una relación entre la presencia de mutaciones del FLT3 y determinadas características biológicas de la LMA al diagnóstico. Los pacientes con FLT3-ITD suelen debutar con una cifra mayor de leucocitos y con un porcentaje de blastos, tanto en sangre periférica como en médula ósea, mayor que el de los pacientes FLT3-ITD negativos. Los pacientes positivos a la mutación suelen tener un pronóstico particularmente desfavorable, con un mayor riesgo de recaída y una supervivencia global (SG) más corta en comparación con los pacientes negativos.^(5,8,17)

Adicionalmente, se ha sugerido que el tamaño de la región amplificada en la ITD podría tener importancia en el pronóstico y aunque es algo que no queda claro, en general se plantea que existe un peor pronóstico cuanto mayor sea el fragmento duplicado.^(1,2,14)

Diversos estudios muestran que pacientes en los que la razón alelo mutado/alelo salvaje (WT del inglés *wild-type*) es elevada, evolucionan mal en cuanto a supervivencia libre de eventos y general. Este pronóstico es particularmente desfavorable en los pacientes en los que no se detecta el FLT3 WT, motivo por el que algunos protocolos han incorporado la determinación de esta razón en los pacientes con LMA, para poder inferir su pronóstico en base a esta y, en consecuencia, las pautas terapéuticas.^(1,2,5,10,14)

Sin embargo, no hay un valor claramente definido para establecer un punto de corte. Por ello, algunos autores consideran como referencia la mediana de la razón que presenta su correspondiente cohorte, otros toman valores previamente definidos como 0,8 o 0,5 lo que puede influir en las variaciones encontradas en las diferentes series de estudio.^(1,2,10,14,19)

Estrategias terapéuticas moleculares

En lo referente a los esquemas terapéuticos, los ensayos clínicos con inhibidores de la proteína FLT3, dirigidos tanto a las mutaciones FLT3-ITD como a las FLT3-TKD han abierto una puerta a la medicina de precisión.^(2,20) Varios inhibidores como el lestaurtinib, el sunitinib, el sorafenib y el midostaurin, han sido investigados en pacientes con LMA. Los ensayos clínicos que evaluaron estas drogas de primera generación como monoterapia, demostraron una actividad antileucémica limitada y al combinarlos con la quimioterapia convencional se incrementó la toxicidad en algunos casos.⁽²⁾ Para superar estos obstáculos, surgieron los inhibidores de nueva generación: gilteritinib, crenolanib, y quizartinib, con menores efectos adversos, mayor especificidad y potencia.⁽²⁾ No obstante, los pacientes han desarrollado resistencia a estos fármacos, ya sea por factores inherentes o adquiridos, lo que constituye un gran reto para los investigadores y médicos tratantes.

Nuevos métodos de diagnóstico

El creciente desarrollo de los métodos de diagnóstico en la última década, revela una enorme variabilidad molecular en las neoplasias hematológicas y en particular en la LMA, por lo que el estudio de marcadores específicos determina nuevas estrategias en el manejo individualizado de los pacientes.

Aunque la OMS identifica la FLT3-ITD como una alteración molecular que afecta significativamente el resultado clínico en pacientes con LMA, no agrupa las mutaciones del FLT3 en una sola categoría, sino que las divide en muchos subgrupos y sigue sin contemplar la razón FLT3 en la clasificación de dicha entidad.^(2,15)

Esto hace evidente que, a pesar de que algunos grupos de investigadores defienden el valor pronóstico que confiere la razón FLT3,^(1,5,14) en la actualidad hay grandes diferencias en los criterios para establecer algoritmos de estratificación del riesgo en los pacientes.

Desde el punto de vista de diagnóstico, el método clásico de detección de las variantes FLT3-ITD se basa en la amplificación del fragmento mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y posteriormente la visualización de la variante.⁽¹²⁾ Tradicionalmente, la lectura se realizaba mediante la electroforesis en gel de agarosa, un procedimiento sencillo y factible para cualquier laboratorio de biología molecular pero insuficiente para análisis superiores a la simple interpretación cualitativa.⁽¹⁾

Es por ello que se impone utilizar las nuevas tecnologías para desarrollar un análisis más profundo de la variante amplificada. No obstante, los métodos más actuales como la PCR en tiempo real y la secuenciación masiva no han sido exitosos, ya que el tamaño de la FLT3-ITD es variable de un paciente a otro, lo que supone un reto desde el punto de vista químico, bioinformático y de control de calidad.^(21,22,23,24,25)

La propuesta más factible para el análisis de este biomarcador es amplificarlo con la tradicional PCR de punto final y realizar la lectura posterior, basado en el principio de la electroforesis capilar, lo que permite conocer el tamaño del fragmento y calcular

el área bajo la curva de ambos picos (mutado y WT) para determinar la razón y por tanto la carga alélica acompañante.⁽²⁶⁾

La comunidad científica necesita seguir trabajando en el esclarecimiento de la utilidad práctica que tienen estos parámetros, validar dichos procedimientos en series amplias y diversas epidemiológicamente. Se debe determinar el punto de corte exacto como referencia para comparar el ratio FLT3 y estandarizar los métodos de laboratorio más adecuados y factibles para su estudio.

La caracterización de esta mutación, con el conocimiento de los detalles clínico hematológicos, el tamaño de los fragmentos duplicados y la carga alélica acompañante, puede ayudar al entendimiento del papel de este biomarcador en el proceso de leucemogénesis, mejorar los protocolos de diagnóstico, predecir la evolución de los pacientes y justificar el empleo de la medicina de precisión futura con el uso de terapias moleculares específicas.

Referencias bibliográficas

1. Cabrerizo R, Sánchez D, Gargallo P, Romano V, Montero V. Determinación de la mutación FLT3-ITD por dos métodos en pacientes con leucemia mieloide aguda: comparación e implementación de un nuevo método. Rev Hematología 2019 [acceso 07/03/2021];22(2):134-43. Disponible en: <https://revistahematologia.com.ar/index.php/Revista/article/view/17>
2. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. Leukemia. 2019;33(2):299-312. DOI: <https://10.1038/s41375-018-0357-9>
3. Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, *et al.* Identification of FLT3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. Cell. 2005;121:295-306.
4. Larráyoz MJ, Mañú A, Ariceta B, Vázquez I, Aguilera-Díaz A, Fernández-Mercado M, *et al.* Diagnóstico molecular de alteraciones en el gen FLT3: impacto clínico,

- retos y propuestas. *Genética Médica y Genómica*. 2019 [acceso 07/03/2021];3(3):31-9. Disponible en: https://genotipia.com/revista_gm/gmgo013-larrayoz-flt3/
5. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, *et al*. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel. *Blood*. 2017;129(4):1-55. DOI: <https://10.1182/blood-2016-08-733196>
6. Picharski GL, Andrade DP, Fabro ALMR, Lenzi L, Tonin FS, Ribeiro RC, *et al*. The Impact of Flt3 Gene Mutations in Acute Promyelocytic Leukemia: A Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9):1311. DOI: <https://10.3390/cancers11091311>
7. Zhang Y, Zhang Y, Wang F, Wang M, Liu H, Chen X, *et al*. The mutational spectrum of FLT3 gene in acute lymphoblastic leukemia is different from acute myeloid leukemia. *Cancer Gene Ther*. 2020;27(1):81-8 DOI: <https://10.1038/s41417-019-0120-z>
8. Cheng J, Qu L, Wang J, Cheng L, Wang Y. High expression of FLT3 is a risk factor in leukemia. *Mol Med Rep*. 2018;(2):2885-92. DOI: <https://10.3892/mmr.2017.8232>
9. Fan Y, Cao Y, Bai X, Zhuang W. The clinical significance of FLT3 ITD mutation on the prognosis of adult acute promyelocytic leukemia. *Hematology*. 2018;23(7):379-84. DOI: <https://10.1080/10245332.2017.1415717>
10. de Arruda VYN, Matsuzaki LN, Chauffaille ML. FMS-related tyrosine kinase 3 internal tandem duplication (FLT3-ITD): a villain among others. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2017;39(3):283-4. DOI: <https://10.1016/j.bjhh.2017.03.001>
11. Cao T, Jiang N, Liao H, Shuai X, Su J, Zheng Q. The FLT3-ITD mutation and the expression of its downstream signaling intermediates STAT5 and Pim-1 are positively correlated with CXCR4 expression in patients with acute myeloid leukemia. *Sci Rep*. 2019;9:12209. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48687-z>
12. Nakao M, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, *et al*. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10(12):1911-8.
13. Cornelissen JJ, Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood*. 2016 Jan;127(1):62-70. DOI: <https://10.1182/blood-2015-07-604546>
14. González E, Grille S, Vales V, Boada M, Zanella LM, Leal D, *et al*. Estudio del ratio de FLT3-ITD como factor pronóstico en leucemias agudas mieloides. *Rev Méd*

- Urug. 2016 [acceso 07/03/2021];32(3):145-51. Disponible en:
http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902016000300003&lng=es
15. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405. DOI: <https://10.1182/blood-2016-03-643544>
 16. O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, Altman JK, Appelbaum FR, Arber DA, *et al.* Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15(7):926-57. DOI: <https://10.6004/jnccn.2017.0116>
 17. Schranz K, Hubmann M, Harin E, Vosberg S, Herold T, Metzeler KH, *et al.* Clonal heterogeneity of FLT3-ITD detected by high-throughput amplicon sequencing correlates with adverse prognosis in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2018;9(53):30128-45. DOI: <https://10.18632/oncotarget.25729>
 18. Niparuck P, Limsuwanachot N, Pukiat S, Chantrathammachart P, Rerkamnuaychoke B, Magmuang S, *et al.* Cytogenetics and FLT3-ITD mutation predict clinical outcomes in nontransplant patients with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol Oncol*. 2019;8(3):1-14. DOI: <https://10.1186/s40164-019-0127-z>
 19. Sakaguchi M, Nakajima N, Yamaguchi H, Najima Y, Shono K, Marumo A, *et al.* The sensitivity of the FLT3-ITD detection method is an important consideration when diagnosing acute myeloid leukemia. *Leuk Res Rep*. 2020;13:1-4. DOI: <https://10.1016/j.lrr.2020.100198>
 20. Wang A, Hu C, Chen C, Liang X, Wang B, Zou F, *et al.* Selectively targeting FLT3-ITD mutants over FLT3-wt by a novel inhibitor for acute myeloid leukemia. *Hematological*. 2021;106(2):605-9. DOI: <https://10.3324/haematol.2019.244186>
 21. Sproul AM. Real-time PCR applications in hematology. In: *Real-time PCR*. Newcastle: Taylor& Francis; 2006. p. 277-301.
 22. Levis MJ, Perl AE, Altman JK, Gocke CD, Bahceci E, Hill J, *et al.* A next generation sequencing-based assay for minimal residual disease assessment in AML patients with FL T3-ITD mutation. *Blood Adv*. 2018;2(8):825-31. DOI: <https://10.1182/bloodadvances.2018015925>
 23. Patnaik MM. The importance of FL T3 mutational analysis in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(10):2273-86. DOI: <https://10.1080/10428194.2017.1399312>
 24. Schranz K, Hubmann M, Harin E, Vosberg S, Herold T, Metzeler KH, *et al.* Clonal heterogeneity of FL T3-ITD detected by high-throughput amplicon sequencing

correlates with adverse prognosis in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*.

2018;9(53):30128-45. DOI: <https://10.18632/oncotarget.25729>

25. Sophia Genetics. Myeloid Solution. The state of the art molecular diagnostic application for hematological disorders. 2018 [acceso 07/03/2021]. Disponible en:

<https://www.sophiagenetics.com>

26. Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, Geiger T, Cooper LC, Smith BD, *et al.* Detection of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay. *J Mol Diagn*. 2003;5(2):96-102.

DOI: [https://10.1016/S1525-1578\(10\)60458-8](https://10.1016/S1525-1578(10)60458-8)

Conflicto de intereses

La autora declara que no existe conflicto de intereses.