

# Determinación de la mutación FLT3-ITD por dos métodos en pacientes con leucemia mieloide aguda: comparación e implementación de un nuevo método

Determination of the FLT3-ITD mutation by two methods in patients with acute myeloblastic leukemia: comparison and implementation of a new method

Sánchez D, Gargallo P, Romano V, Montero V, Cabrerizo R

*Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas  
Norberto Quirno (CEMIC)*

rocabrerizo@gmail.com

*TRABAJO PRESENTADO EN SESIÓN ORAL EN EL MARCO DEL  
XXIII CONGRESO ARGENTINO DE HEMATOLOGÍA.*

Fecha recepción: 20/04/2018  
Fecha aprobación: 13/07/2018



ARTÍCULO  
ORIGINAL

HEMATOLOGÍA  
Volumen 22 n° 2: 134-143  
Mayo - Agosto 2018

**Palabras claves:** LMA,  
FLT3,  
PCR,  
análisis de fragmentos.

**Keywords:** AML,  
FLT3,  
PCR,  
fragment analysis.

## Resumen

La activación constitutiva en ausencia de ligando del receptor FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) se presenta con alta frecuencia en leucemia mieloide aguda (LMA) debido a dos tipos de mutaciones en su gen: duplicaciones internas en tándem (ITD) que afectan la región yuxtamembrana, o mutaciones puntuales que afectan el dominio tirosina quinasa (TKD). La primera se asocia con pronóstico desfavorable, mientras que para la segunda los resultados no son concluyentes.

En este trabajo se comparan dos métodos para la detección de FLT3-ITD: reacción en cadena de la po-

limerasa seguida de electroforesis en gel de agarosa (PCR+EGA) y reacción en cadena de la polimerasa seguida de análisis de fragmentos (PCR+AF), se evalúa la información adicional brindada por esta última metodología y se correlaciona el estado mutacional del gen FLT3 con múltiples variables.

Se estudiaron 63 pacientes con LMA para la búsqueda de la mutación FLT3-ITD por ambos métodos. Hubo buena concordancia entre las técnicas ( $k=0,85$ ). Se detectaron dos falsos negativos por PCR+EGA, así como un resultado indeterminado. En base al ensayo cuantitativo, PCR+AF, las re-

laciones alélicas encontradas fueron de 0,05 a 7,7 (mediana 0,81) y los tamaños ITD variaron entre 16 a 174 (mediana 34) pb. La frecuencia de aparición de la mutación fue de 20,6%, con predominio en pacientes con subtipo FAB M2. No se hallaron diferencias significativas en el recuento de leucocitos, neutrófilos, plaquetas, hemoglobina y blastos en sangre periférica entre pacientes portadores y no portadores de la mutación. La supervivencia global de los pacientes FLT3-ITD+ fue significativamente menor, con un riesgo relativo de muerte a los 6 meses de 1.45.

Por la relevante información extra que brinda el ensayo PCR+AF respecto de la PCR+EGA, la sencillez y el tiempo acotado de su procedimiento, resulta una técnica sólida para definir pronóstico de la enfermedad y redefinir riesgo, y factible de implementar en el laboratorio clínico.

### Abstract

Constitutive activation in the absence of FLT3 receptor ligand (FMS-like tyrosine kinase 3) occurs with high frequency in acute myeloid leukemia (AML) due to two types of mutations in its gene: internal tandem duplications (ITD) that affect the juxtamembrane region, or point mutations that affect the tyrosine kinase domain (TKD). The first one is associated with an unfavorable prognosis, whereas the second type gives inconclusive results.

In this work, two methods are compared for the detection of FLT3-ITD: polymerase chain reaction followed by agarose gel electrophoresis (PCR+AGE) and polymerase chain reaction followed by fragment analysis (PCR+FA), the additional information provided by the latter methodology is evaluated and the mutational state of the FLT3 gene is correlated with multiple variables.

We studied 63 patients with AML in search of the FLT3-ITD mutation by both methods. There was good agreement between the techniques ( $k = 0.85$ ). Two false negatives were detected by PCR+AGE, as well as an indeterminate result. Based on the quantitative assay, PCR+FA, the allelic ratios found were from 0.05 to 7.7 (median 0.81) and ITD length ranged from 16 to 174 (median 34). The frequency of appearance of the mutation was 20.6%, with predominance in patients with subtype FAB M2. No significant differences were found in the count of leukocytes, neutrophils, platelets, hemoglobin and blasts in peripheral blood between carriers and

non-carriers of the mutation. The overall survival of the FLT3-ITD+ patients was significantly lower, with a relative risk of death at 6 months of 1.45.

The relevant extra information provided by the PCR+FA compared with PCR+AGE, the simplicity and limited time of its procedure show it as a strong technique for forecasting the disease and redefining risk, and feasible to implement in the clinical laboratory.

### Introducción

FLT3 es un gen que codifica para un receptor miembro de la familia tirosina quinasa clase III. Se encuentra en el cromosoma 13q12.2. Normalmente es expresado por las células progenitoras hematopoyéticas y dicha expresión se pierde conforme éstas se diferencian. FLT3 tiene un rol importante en la supervivencia, diferenciación y proliferación celular<sup>(1)</sup>. Su ligando, FLT3-ligando, produce expansión sinérgica de las células progenitoras hematopoyéticas cuando se combina con otros factores de crecimiento *in vitro*, como trombopoyetina, interleuquina-3 y ligando KIT.

Las mutaciones en el gen FLT3 son una de las alteraciones somáticas genéticas más frecuentes en leucemia mieloide aguda (LMA)<sup>(2)</sup>. Se han identificado dos tipos de mutaciones: la duplicación interna en tándem (FLT3-ITD) de 3-400 pares de bases (pb) en la región yuxtamembrana, identificada en aproximadamente el 25% de las LMA, y mutaciones puntuales que generalmente involucran el ácido aspártico 835 del dominio quinasa (FLT3-TKD), identificadas en el 10% de las LMA<sup>(3,4)</sup>. Ambos tipos de mutaciones activan constitutivamente el receptor en ausencia de ligando, con la consecuente inducción de crecimiento celular e inhibición de la apoptosis a través de la activación de una cascada de señalización de diversas proteínas<sup>(5,6)</sup>.

Muchos estudios han demostrado que la presencia de la mutación FLT3-ITD tendría un rol patogénico y que conferiría peor pronóstico en pacientes con LMA<sup>(6-8)</sup>. Contrariamente, los pacientes con mutaciones puntuales en FLT3-TKD no parecen tener el mismo pronóstico adverso, aunque los estudios no son concluyentes<sup>(9-11)</sup>.

Estos hallazgos sobre FLT3 hacen que sea un blanco molecular atractivo para el desarrollo de nuevas terapias destinadas a inhibir su actividad descontrolada de tirosina quinasa.

La variable respuesta a la terapia que presentan las LMA y la diferencia sustancial existente en el desenlace clínico de la enfermedad en los pacientes que portan o no la mutación FLT3-ITD, ha motivado la búsqueda de distintos factores pronósticos además

del citogenético. De esta forma, la *European Leukemia Network* (ELN) desarrolló un sistema pronóstico que tiene en cuenta la identificación de determinadas alteraciones moleculares (**Tabla 1**)<sup>(12)</sup>.

**Tabla 1.** Clasificación de la European Leukemia Network (ELN) de los pacientes con LMA en grupos pronóstico, según citogenético y perfil molecular

Riesgo <sup>(a)</sup>	Anormalidades genéticas
<b>Favorable</b>	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 Mutado NPM1 sin FLT3-ITD o con FLT3-ITD <sup>bajo(b)</sup> Mutación bialélica CEBPA
<b>Intermedio</b>	Mutado NPM1 y FLT3-ITD <sup>alto(b)</sup> NPM1 de tipo salvaje sin FLT3-ITD o con FLT3-ITD <sup>bajo(b)</sup> t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A Anormalidades citogenéticas no clasificadas como favorables o adversas
<b>Adverso</b>	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); rearreglo KMT2A t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2,MECOM(EV11) -5 o del(5q); 7; -17/abn(17p) Cariotipo complejo <sup>(c)</sup> , cariotipo monosomal <sup>(d)</sup> NPM1 de tipo salvaje y FLT3-ITD <sup>alto(b)</sup> RUNX1 mutado <sup>(e)</sup> ASXL1 mutado <sup>(e)</sup> TP53 mutado <sup>(f)</sup>

<sup>a</sup> El impacto pronóstico de un marcador depende del tratamiento y puede cambiar con nuevas terapias.

<sup>b</sup> Relación alélica baja (<0.5); relación alélica alta (≥0.5).

<sup>c</sup> 3 o más anomalías cromosómicas no relacionadas en ausencia de 1 de las translocaciones o inversiones recurrentes designadas por la OMS, es decir, t(8;21), inv(16) o t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) o t(3;3); LMA con BCR-ABL1.

<sup>d</sup> Definido por la presencia de 1 monosomía única (excluida la pérdida de X o Y) en asociación con al menos 1 monosomía adicional o anomalía estructural.

<sup>e</sup> Estos marcadores no deben usarse como marcador de pronóstico adverso si coocurren con subtipos de LMA de riesgo favorable.

<sup>f</sup> Las mutaciones TP53 están significativamente asociadas con LMA con cariotipo complejo y monosomal.

El abordaje más comúnmente usado para el rastreo de FLT3-ITD consiste en realizar una reacción en cadena de la polimerasa seguida de electroforesis en gel de agarosa (PCR+EGA). Si bien es un método ampliamente utilizado, relativamente económico y sencillo de llevar a cabo, presenta varias limitaciones dependiendo de la concentración de agarosa utilizada en el gel y el número de pares de bases duplicadas.

Una alternativa metodológica de mayor sensibilidad y rapidez se obtiene analizando los productos ampli-

ficados mediante análisis de fragmentos (PCR+AF) en secuenciador por electroforesis capilar, técnica que permite separar con un polímero de alta resolución diferentes moléculas según su relación masa/carga y detectarlas por fluorescencia. En este procedimiento se efectúa la PCR con uno de los cebadores marcados con el fluorocromo. Es una técnica más sólida en lo que respecta a parámetros analíticos y de la cual puede obtenerse valiosa información adicional, como tamaños ITD (TI) y relaciones alélicas (RA)<sup>(9,13,14)</sup>.

Varios estudios han examinado el impacto del TI en el gen mutado en lo que respecta al desenlace clínico. El TI medio reportado en la mayoría de estudios va desde 39 a 54 pb y se ha encontrado que, a mayor TI, menor es el porcentaje de remisión y peor la supervivencia general<sup>(9,15)</sup>. Un estudio reciente asocia TI > 70 pb como peor pronóstico<sup>(16)</sup>.

En cuanto a las RA (alelos que portan la mutación/alelo normal o *wild-type* (WT)), estudios previos han sugerido un rol pronóstico también a este nivel, con una asociación entre una carga alélica alta, considerando RA > 0,50 y a veces pérdida del alelo WT, con un pronóstico desfavorable. En contraste, el impacto pronóstico de un RA bajo o intermedio es controvertido<sup>(15,17,18)</sup>.

PCR-AF es en la actualidad la técnica propuesta internacionalmente para el análisis de la mutación FLT3-ITD, ya que es la única metodología capaz de brindar la información TI y RA necesaria para la estratificación actual de LMA<sup>(12)</sup>.

En este trabajo se comparan dos métodos de detección de la mutación FLT3-ITD: PCR+EGA versus PCR+AF, se evalúa la información adicional brindada por la nueva metodología y se correlaciona el

estado mutacional con múltiples variables.

### Materiales y métodos

Se realizó un estudio retrospectivo de 63 pacientes diagnosticados con LMA primarias (*de novo*) y secundarias, en el servicio de Hematología de CEMIC, C.A.B.A., Argentina. Para ello, se aisló el ADN de muestras de médula ósea (MO) y/o sangre periférica (SP) al momento de la presentación (n=54), y otras al momento de la recaída (n=9). La extracción del material genético fue realizada mediante el método automatizado MagNAPure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I® y MagNAPure Compact Instrument®, utilizando el principio de separación de lisis celular y la unión de los ácidos nucleicos a partículas magnetizadas.

El ADN de cada muestra fue amplificado por PCR en Termociclador Veriti, Applied Biosystem®, utilizando los cebadores especificados en la **Tabla 2**, uno de ellos marcado con fluorocromo FAM, que permiten amplificar directamente los exones 14 y 15 del gen FLT3. Cada ensayo incluyó control positivo, control negativo y blanco de reacción.

**Tabla 2.** Cebadores utilizados para la amplificación de FLT3-ITD

<i>Forward</i> FLT3-ITD Fluo	5' - FAM-GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC - 3'
<i>Reverse</i> FLT3-ITD	5' - CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC - 3'

Los productos de PCR fueron detectados por ambas metodologías: PCR+EGA al 4% teñido con bromuro de etidio y visualización en transiluminador UV, empleando un marcador de peso molecular de ADN de 50 pb (CincuentaMarker, Biodynamics®) y paralelamente por PCR+AF en analizador genético ABI 310®, en un ensayo basado en electroforesis capilar. Para este caso, las muestras fueron analizadas con el programa ABI GeneScane y empleando un marcador de peso molecular, ROX (35-500 pb), se calcularon los tamaños de los fragmentos.

### Análisis estadísticos

Se utilizó el estadístico t para comparar medias poblacionales entre variables cuantitativas. Para variables cualitativas se utilizó el test exacto de Fischer, e índice kappa de Cohen para evaluar concordancia. La significancia estadística se definió como  $p < 0,05$ .

### Resultados

El producto de PCR obtenido es un fragmento de 329 pb y corresponde al alelo normal. Cuando se está en presencia de la mutación FLT3-ITD se observa otro producto de mayor tamaño que se visualiza en el gel de agarosa, mientras que por análisis de fragmentos las señales se manifiestan como picos.

Al comparar ambas metodologías, se halló que hubo buena concordancia. De las 63 muestras procesadas, 49 fueron negativos para la mutación por ambos métodos y 11 positivas. Sin embargo se obtuvieron 3 resultados discordantes entre las metodologías (**Tabla 3**). Se cotejaron los pacientes que fueron discordantes para inferir sobre las causas de la detección de la mutación por un método y no por el otro, y se obtuvo la información expresada en la **Tabla 4**.

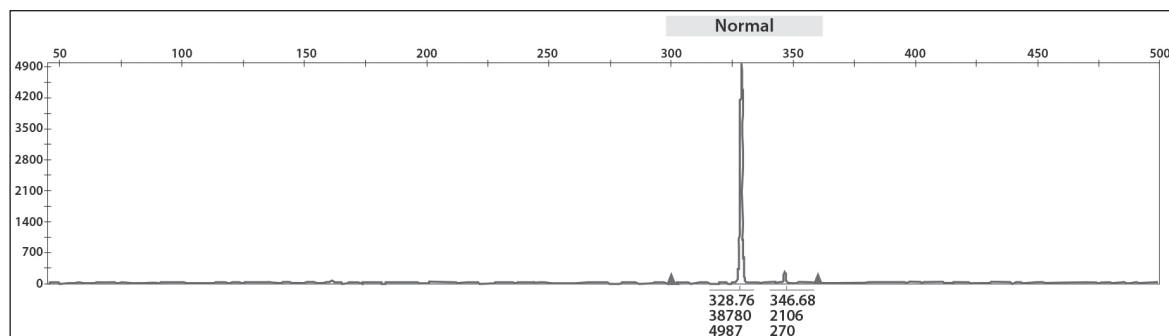
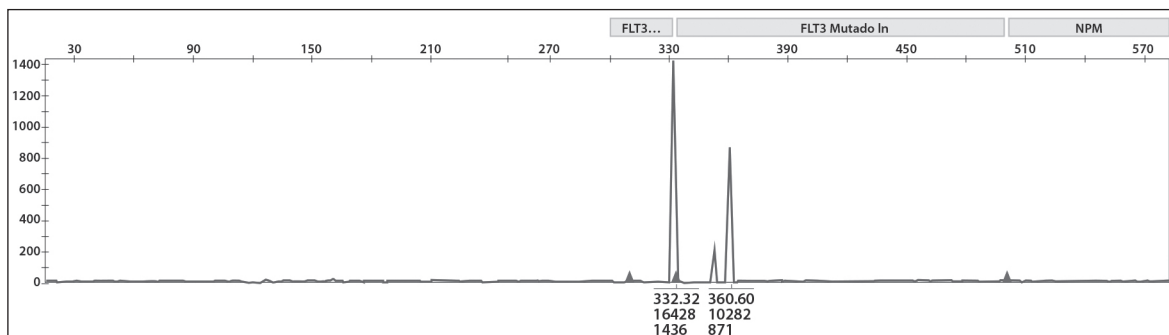
En el primer caso, el paciente #247 presentó por PCR+AF, además de su alelo WT, un alelo mutado cuyo clon es muy pequeño, según la información brindada por esta metodología (**Figura 1**).

**Tabla 3.** Tabla de contingencia

	PCR-AF FLT3-ITD+	PCR-AF FLT3-ITD-	TOTAL
PCR+EGA FLT3-ITD+	11	1	12
PCR+EGA FLT3-ITD-	2	49	51
TOTAL	13	50	63

**Tabla 4.** Pacientes discordantes entre metodologías

Paciente	Metodología	Observaciones
#247	PCR + AF	2 señales, alelo WT y alelo mutado TI=17 pb; RA=0,05
	PCR + EGA	Banda única correspondiente al alelo WT
#128	PCR + AF	3 señales, alelo WT y 2 clones mutados TI=20 y 28 pb; RA=0,63
	PCR + EGA	Banda única correspondiente al alelo WT
#135	PCR + AF	Señal única correspondiente al alelo WT
	PCR + EGA	Banda correspondiente al alelo WT y mucha suciedad, se consideró dudoso o indeterminado (corrida realizada por duplicado)

**Figura 1.** Paciente #247 analizado por PCR + AF.**Figura 2.** Paciente #128 analizado por PCR + AF

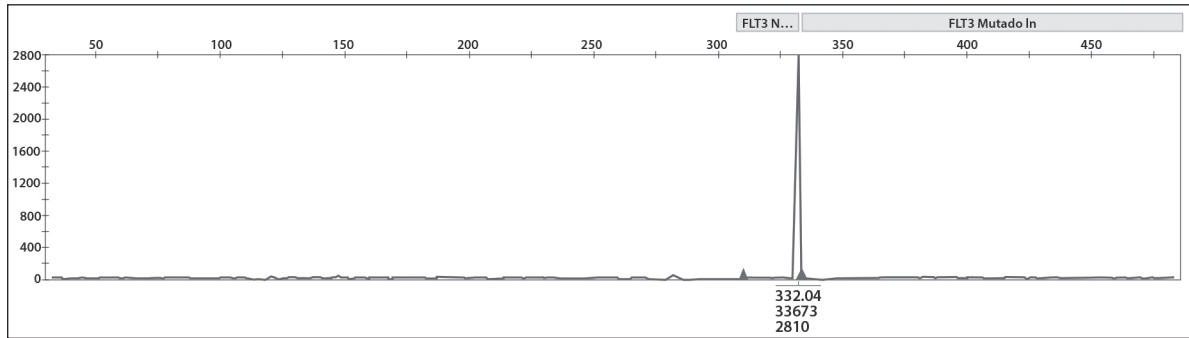


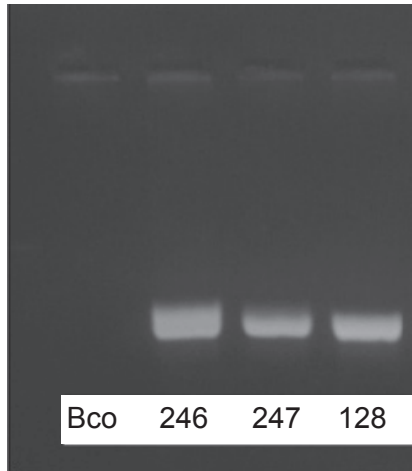
Figura 3. Paciente #135 analizado por PCR + AF

Tabla 5. Características clínicas y hematológicas de la población estudiada

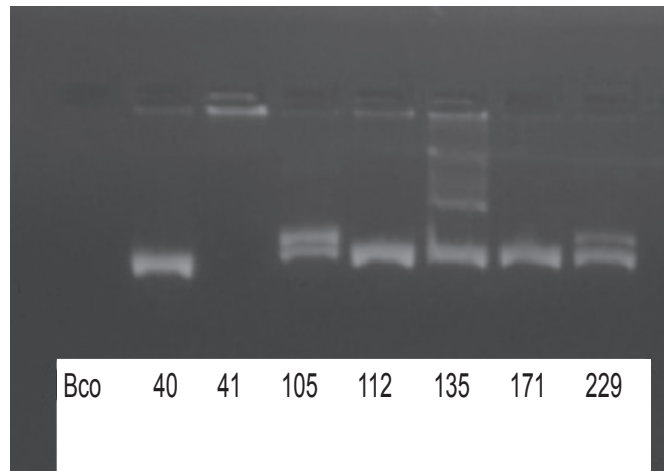
Parámetros	Totales (N=63)	FLT3-ITD+ (N=13)	FLT3-ITD-(N=50)
Edad (mediana y rango)	61 (25-92)	55 (40-92)	63 (25-89)
Sexo (M-F)	37;26	10;3	27;23
<b>Tipo de leucemia</b>			
De novo (%)	87	20	80
Secundaria (%)	13	25	75
<b>FAB</b>			
M0	2	0	2
M1	10	3	7
M2	17	5	12
M3	5	1	4
M4	6	2	4
M5	7	0	7
M6	5	0	5
Bifenotípicas	2	0	2
No evaluable	9	2	7
<b>Recuento en SP</b>			
Leucocitos x 10 <sup>9</sup> /L (mediana y rango)	8,12 (0,64-358,37)	10,29 (1,19-177,62)	8,12 (0,64-358,37)
% Ne (mediana y rango)	11 (0-59)	10,5 (0,4-53)	11 (0-59)
% Bl (mediana y rango)	40 (0-96)	67 (10-96)	40 (0-95)
Hb g/dL (mediana y rango)	8,4 (5,3-13,2)	7,6 (6,1-12,1)	8,65 (5,3-13,2)
PLT x 10 <sup>9</sup> /L (mediana y rango)	34,50 (1,40-675,00)	20,50 (3,00-212,00)	35,50 (1,40-675,00)
<b>Parámetros AF</b>			
TI (mediana y rango)		34 (16-174)	
RA (mediana y rango)		0,81 (0,05-7,7)	

AF, análisis de fragmentos; Bl, blastos; F, femenino; FAB, clasificación Franco-Americano-Británica; Hb, hemoglobina; M, masculino; Ne, neutrófilos; PLT, plaquetas; RA, radio alélico; SP, sangre periférica; TI, tamaño ITD.

Deducimos que ésta es la causa probable por la cual no se vio la banda correspondiente al alelo mutante al analizarla por PCR+EGA, ya que es una técnica menos sensible (**Figura 4**). El paciente #128 al ser evaluado por PCR+AF reveló la presencia de dos mutaciones FLT3-ITD diferentes, además de su alelo WT (**Figura 2**). Ninguna de ellas fueron de-



**Figura 4.** Pacientes #247 y #128 analizados por PCR+EGA



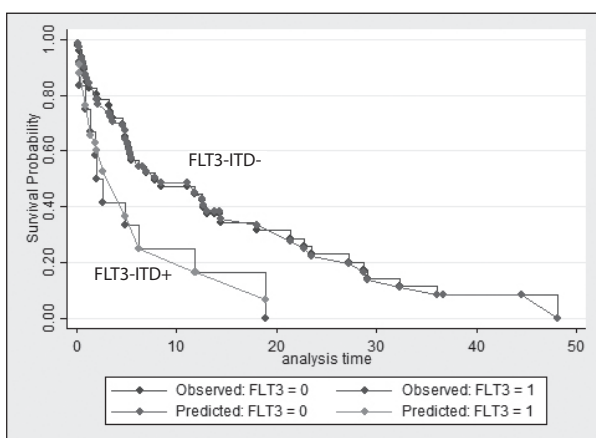
**Figura 5.** Paciente #135 analizado por PCR+EGA

tectadas por PCR+EGA (**Figura 4**). Para el paciente #135, cuando se lo evaluó por PCR+EGA se lo consideró dudoso o indeterminado ya que presentó bandas de mayor peso con mucha suciedad (**Figura 5**). Sin embargo, PCR+AF manifestó sólo la existencia del fragmento correspondiente al alelo WT (**Figura 3**).

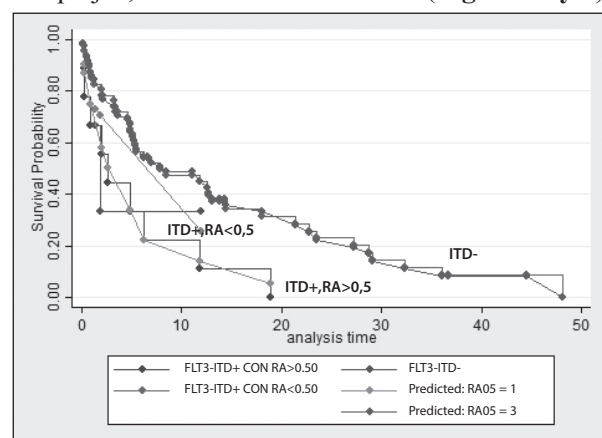
Mediante PCR+AF se obtuvo información relevante a través del área; la literatura propone que se realice la relación del área del alelo mutado respecto al WT. Las RA obtenidas darían información sobre el tamaño del clon mutante presente en el paciente. En nuestra población estudiada, la frecuencia de aparición de la mutación FLT3-ITD fue de 20,6%, correlacionándose con lo mencionado en la literatura. La misma tendencia de aparición de la mutación fue encontrada en los pacientes con LMA primarias y LMA secundarias (20 y 25% respectivamente). La mediana para las RA calculadas en estos pacientes

fue de 0,81 (0,05-7,7), y para los TI fue de 34 pb (16-174).

La sobrevida global de los pacientes FLT3-ITD+ fue marcadamente menor, con un riesgo relativo de muerte antes de los 6 meses de 1.45 (**Figura 6**). Al correlacionar la sobrevida global de los pacientes FLT3-ITD+ con el RA y TI, se vio heterogeneidad en los resultados sin ninguna tendencia ni valor de corte asociado. Esto podría explicarse por el bajo n total, bajo n en los subgrupos evaluados (RA > 0.50 y TI > 70) y la presencia de cariotipos alterados y/o complejos, asociados a la mutación (**Figuras 7 y 8**).



**Figura 6.** Sobrevida global de pacientes FLT3-ITD+ y FLT3-ITD-



**Figura 7.** Sobrevida global vs RA

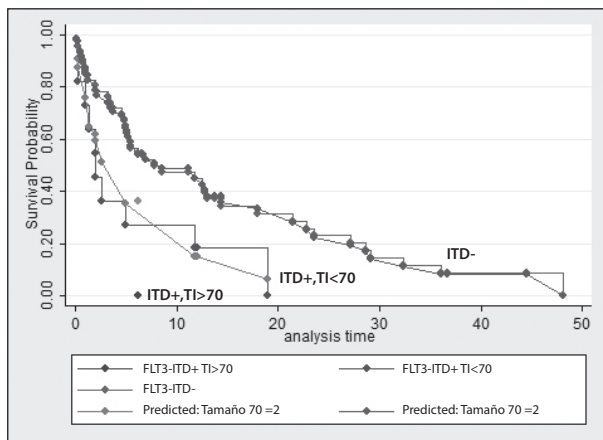


Figura 8. Sobrevida global vs TI

En cuanto a las características hematológicas, se compararon los recuentos en SP de leucocitos, plaquetas, hemoglobina, porcentaje de neutrófilos y de blastos en la población FLT3-ITD+ versus FLT3-ITD-. El recuento medio de leucocitos y blastos en SP fue mayor en el grupo portador de la mutación respecto del WT y menor para los parámetros hemoglobina, plaquetas y porcentaje de neutrófilos. A pesar de estas diferencias a priori, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de estos parámetros (Tabla 5). Se muestran también los subtipos FAB encontrados, siendo mayoritario el subtipo M2, tanto en el total general de pacientes estudiados como en los portadores de la mutación. No obstante, la bibliografía refiere que la

presencia de la mutación FLT3-ITD se asocia principalmente a linaje monocítico (M4 y M5)<sup>(11,17)</sup>. La mutación FLT3-ITD ha sido sugerida como un “hit” en el proceso de leucemogénesis, ya que ha sido vista en pacientes con síndrome mielodisplásico (SMD) al evolucionar éstos a leucemia aguda<sup>(3,4,6,10)</sup>. Ha sido reportado también que el estado mutacional del gen FLT3 puede cambiar al momento de la recaída de la LMA, positivizarse o negativizarse, o bien, que la RA al momento de la recaída difiere de la encontrada al diagnóstico en un paciente con la mutación<sup>(8)</sup>. Es por ello que se decidió evaluar en nuestra población el estado mutacional de FLT3 en pacientes al diagnóstico y recaída, en 6 pacientes en que se contaba con dicha información. De este grupo de pacientes, 1 presentaba mutación tanto al diagnóstico como a la recaída, presentando el mismo clon mutante, y al comparar las RA a los distintos momentos se vio que en la etapa de la recaída fue menor. De todas maneras, tanto al diagnóstico como a la recaída, la RA fue mayor de 0,5. En 2 pacientes se encontró que adquirieron la mutación al momento de la recaída.

En los restantes 3 pacientes, no se detectó mutación del gen ni al diagnóstico ni en la recaída. La sobrevida de los pacientes FLT3-ITD+ tanto al diagnóstico como a la recaída fue significativamente menor que los FLT3-ITD- (Tabla 6).

Tabla 6. Estado mutacional de FLT3 al momento del diagnóstico y recaída

Paciente	Estado mutacional FLT3-ITD				Sobrevida (meses)
	D	R	TI (D y R)	RA (D y R)	
1	M	M	60 – 60	1,65 - 1,53	4,90
2	NM	NM	-	-	22,77
3	NM	NM	-	-	12,77
4	NM	M	174	7,7	6,22
5	NM	M	33	0,86	0,93
6	NM	NM	-	-	23,53

D, diagnóstico; M, mutado; NM, no mutado; R, recaída; RA, relación alélica; TI, tamaño ITD.

### Discusión y conclusión

La LMA, a pesar del desarrollo creciente de fármacos dirigidos a blancos moleculares específicos, sigue teniendo alta tasa de morbilidad y mortalidad relacionada a la toxicidad farmacológica y a las re-

caídas tempranas. Los diferentes índices pronósticos ayudan a identificar pacientes con alto riesgo de recaída y enfermedad resistente. Las mutaciones de tipo ITD en el gen FLT3 han sido asociadas con mal



pronóstico y han adquirido un rol importante en la toma de decisiones sobre tratamiento. Es por ello que la detección temprana de la misma, así como su correcta determinación por una técnica adecuada, beneficiaría al paciente.

En este trabajo demostramos fortalezas y debilidades de dos métodos que actualmente se utilizan para la detección de FLT3-ITD, los comparamos tomando como información verdadera la aportada por análisis de fragmentos<sup>(20)</sup> y justificamos que la PCR+AF ha mostrado ser un método rápido y sensible, que emplea cantidades mínimas de muestra y, a diferencia de PCR+EGA, es un procedimiento menos laborioso y no requiere la manipulación de reactivos tóxicos.

A pesar de los costos, la técnica PCR+AF, a través de la automatización, permite estandarizar los ensayos, por lo que sería de gran utilidad su implementación masiva. Cabe destacar que esta técnica permite una fácil interpretación de los datos, así como el manejo de los mismos, situación contrapuesta con respecto a la PCR+EGA, ya que la interpretación de los datos depende de muchos factores, como ser: la concentración de agarosa utilizada en el gel, la ejecución de la corrida electroforética y la visualización de las bandas, hecho controvertido porque depende de los pares de bases insertados en el fragmento amplificado, el tamaño del clon, así como de la agudeza visual del operador.

Consideramos que la implementación de la técnica de PCR+AF es un ensayo que, basado en la capacidad de discriminar fragmentos de 1 pb de diferencia, aportando datos tan valiosos como RA y TI, es un ensayo sensible, rápido, altamente reproducible y sujeto a automatización, que es capaz de sustituir la PCR+EGA y, de esta manera, realizar un aporte inequívoco desde el laboratorio a la categorización del paciente, para la futura evaluación e implementación de la terapéutica adecuada.

No es menor destacar que, contando con una técnica como PCR+AF, es posible testear otros genes de interés en los pacientes con LMA y evaluarlos simultáneamente<sup>(13,14,19)</sup>.

#### **Declaración de conflictos de interés:**

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

#### **Bibliografía**

1. \* 136351 fms-related tyrosine kinase 3; FLT3. OMIM web 1, 1–7 (2018).
2. Jaffe ES, Lee Harris N, Stein H et al. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. WHO. 2008; p351.
3. Gary Gilliland D, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002; 100:1532-1542.
4. Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nature*. 2003; 3:650-663.
5. Hayakawa F et al. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene*. 2000; 19:624-631.
6. Small D. FLT3 Mutations : Biology and Treatment. American Society of Hematology. 2006; 1:178-184.
7. Port M, Böttcher M, Thol F et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years : a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol*. 2014; 93:1279-1286.
8. McCormick SR et al. FLT3 Mutations at Diagnosis and Relapse in Acute Myeloid Leukemia. *Arch Pathol Lab. Med*. 2010; 134:1143-1151.
9. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia : what is the best approach in 2013 ? *Am Soc Hematol*. 2013; 1:220-226.
10. Cuervo-Sierra J, Jaime-Pérez JC, Gómez-Almaguer D. Mutaciones del módulo FLT3 en leucemia aguda mieloblástica. *Rev Hematol*. 2012; 13:177-184.
11. Gaich P, Sastre D, Rodriguez C. Prevalencia de Mutaciones FLT3 en Leucemias Mieloblásticas Agudas. Publicaciones científicas Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Córdoba, [www.cobico.com.ar/publicaciones](http://www.cobico.com.ar/publicaciones). (2011).
12. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017; 129: 424-447.

13. Zhang Q, Bai S, Vance G. Molecular genetic tests for FLT3, NPM1, and CEBPA in acute myeloid leukemia. *Methods Mol Biol.* 2013; 999:105-121.
14. Noguera NI et al. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2015; 19:1479-1482.
15. Schlenk RF et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood.* 2014; 124:3441-3450.
16. Kim Y et al. Quantitative fragment analysis of FLT3 -ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length. *Blood Cancer J.* 2015; 5:, e336-7.
17. Thiede C 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; 99:4326-4336.
18. Kroschinsky FP et al. Cup-like acute myeloid leukemia: new disease or artificial phenomenon? *Hematologica.* 2008; 93:283-286.
19. Abel H et al. Detection of FLT3 Internal Tandem Duplication in Targeted, Short-Read-Length, Next-Generation Sequencing Data *J Mol. Diagnostics.* 2013; 15:80-93.
20. Gulley ML, Shea TC, Fedoriw Y et al. Genetic Tests To Evaluate Prognosis and Predict Therapeutic Response in Acute Myeloid Leukemia. *J Mol Diagnostics.* 2010; 12:3-16.